



Universitat de Lleida

# Metabolismo de compuestos fenólicos en olivas y estudio de aceites de oliva singulares de la provincia de Lleida

Maria Casanovas Castro

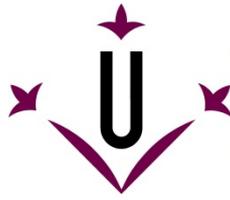
Dipòsit Legal: L.1412-2012

<http://hdl.handle.net/10803/95892>



*Metabolismo de compuestos fenólicos en olivas y estudio de aceites de oliva singulares de la provincia de Lleida* està subjecte a una llicència de [Reconeixement-NoComercial-SenseObraDerivada 3.0 No adaptada de Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/)

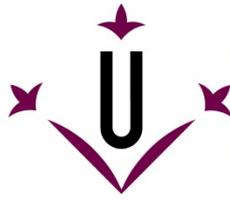
(c) 2012, Maria Casanovas Castro



**Universitat de Lleida**  
**Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària**  
**Departament de Tecnologia dels Aliments**

**Metabolismo de compuestos fenólicos en olivas y  
estudio de aceites de oliva singulares de la  
provincia de Lleida**

**Maria Casanovas Castro**  
**Tesis Doctoral**  
**Julio 2012**



**Universitat de Lleida**  
**Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària**  
**Departament de Tecnologia dels Aliments**

**Doctorat en Ciència i Tecnologia Agrària i Alimentària**

**Metabolismo de compuestos fenólicos en olivas y  
estudio de aceites de oliva singulares de la  
provincia de Lleida**

Memoria presentada por Maria Casanovas Castro para optar al Grado  
de Doctora por la Universidad de Lleida

Tesis dirigida por:

Dra. M<sup>a</sup> Alba Macià i Puig  
Dra. M<sup>a</sup> Paz Romero Fabregat

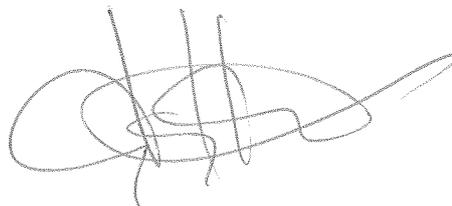
Las Dras. M<sup>a</sup> Alba Macià i Puig y M<sup>a</sup> Paz Romero Fabregat, directoras de la Tesis, autorizan la presentación de la Tesis Doctoral "Metabolismo de compuestos fenólicos en olivas y estudio de aceites de oliva singulares de la provincia de Lleida", realizada por Maria Casanovas Castro.

Lleida, 18 de mayo de 2012

Las directoras:



Dra. M<sup>a</sup> Alba Macià i Puig



Dra. M<sup>a</sup> Paz Romero Fabregat

La candidata al Grado de Doctora



Maria Casanovas Castro

Este trabajo se ha realizado en el grupo de Antioxidants de la Unitat de Tecnologia de Productes Vegetals en el Departament de Tecnologia dels Aliments de la Universitat de Lleida. El trabajo se enmarca dentro de los proyectos:

- “Metabolismo de clorofilas y fenoles en frutos de olivo: implicación en el perfil intrínseco de componentes menores del aceite de oliva virgen. Estudio de la fracción fenólica”. Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias, Ministerio de Educación y Ciencia, (AGL2007-66139-C02-02).
- “Un estudio comparativo plurianual para la evaluación de la composición, calidad nutricional y perfil organoléptico del aceite de oliva virgen obtenido a partir de olivas cultivadas en la provincia de Lleida mediante técnicas de producción ecológica y técnicas tradicionales”. Ayudas a Proyectos de Investigación en Producción y Alimentación Ecológica, Universitat de Lleida

La financiación de la candidata a doctora fue una beca predoctoral de la Universitat de Lleida (de julio a diciembre de 2008) y una beca predoctoral de Formación de Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Ciencia e Innovación (de enero de 2009 a junio de 2012) con referencia AP2007-01921.

Durante la formación, se realizó una estancia de investigación en el “Centro di Ricerca per l’Olivicoltura e l’Industria Olearia”, Città Sant’Angelo (Pescara), Italia. La estancia fue financiada por el Ministerio de Educación, Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario, Ayudas para Estancia Breves.

*Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo.*

*Un esfuerzo total es una victoria completa.*

*(Mahatma Gandhi)*

*Investigar es ver lo que todo el mundo ha visto*

*Y pensar lo que nadie más ha pensado.*

*(Albert Szent-Györgyi)*

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
2.1. El olivo	3
2.2. El fruto	4
2.3. El aceite de oliva	5
2.3.1. Composición del aceite de oliva	7
2.3.1.1. Fracción glicérida y derivados	8
2.3.1.2. Compuestos minoritarios no glicéridos	9
2.4. Pigmentos	12
2.4.1. Pigmentos clorofílicos	12
2.4.1.1. Formación de los derivados clorofílicos	14
2.4.2. Pigmentos carotenoides	15
2.4.3. Pigmentos en el fruto y en el aceite de oliva	18
2.5. Compuestos fenólicos	19
2.5.1. Clasificación de los compuestos fenólicos	20
2.5.2. Los compuestos fenólicos en los alimentos	20
2.5.3. Compuestos fenólicos en el fruto y en el aceite de oliva	21
2.5.4. Rutas de biosíntesis de los compuestos fenólicos en oleáceas	24
2.5.4.1. Ruta de los fenilpropanoides	25
2.5.4.2. Ruta del ácido mevalónico	29
2.5.4.3. Implicación de la betaglucosidasa en el metabolismo de los compuestos fenólicos	31
2.6. Factores que influyen en la composición fenólica y pigmentaria del fruto y del aceite	34
2.6.1. Influencia de la variedad de la oliva	34
2.6.2. Influencia del grado de madurez de la oliva	37
2.6.3. Influencia de los factores ambientales	39
2.6.4. Influencia de los factores tecnológicos	42
2.6.5. Influencia de las prácticas culturales	44
2.7. Productos ecológicos frente a productos convencionales	46
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>51</b>

<b>4. PLAN DE TRABAJO</b>	<b>53</b>
<b>5. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>55</b>
5.1. Experiencias sobre el fruto	55
5.1.1. Localización de las parcelas	55
5.1.2. Caracterización climática	56
5.1.3. Material vegetal	56
5.1.4. Toma de muestras	57
5.1.4.1. Muestreo de frutos durante la maduración en la campaña 2008/09	57
5.1.4.2. Muestreo de frutos durante la maduración en la campaña 2009/10	58
5.2. Experiencias sobre el aceite	59
5.2.1. Toma de muestras	59
5.2.1.1. Muestreo de aceites de <i>Arbequina</i> ecológicos comerciales	59
5.2.1.2. Muestreo de aceites ecológicos monovarietales	60
5.2.1.3. Muestreo de aceites ecológicos de variedades en recuperación (Slow Food)	60
5.3. Métodos analíticos	61
5.3.1. Métodos analíticos en fruto	61
5.3.1.1. Determinación del índice de madurez	61
5.3.1.2. Cálculo del porcentaje de hueso	62
5.3.1.3. Humedad de la pulpa	62
5.3.1.4. Obtención del polvo acetónico	62
5.3.1.5. Actividad enzimática $\beta$ -glucosidasa	63
5.3.1.6. Localización <i>in situ</i> de la enzima $\beta$ -glucosidasa	63
5.3.1.7. Determinación de compuestos fenólicos en la pulpa	64
5.3.1.7.1. Extracción de compuestos fenólicos	64
5.3.1.7.2. Identificación y cuantificación por HPLC-ESI-MS/MS	65
5.3.1.7.3. Obtención de los patrones	70
5.3.1.7.3.1. Obtención de 3,4-DHPEA-EDA y otros fenoles	70
5.3.1.7.3.2. Obtención de 3,4-DHPEA-EA	71
5.3.2. Métodos analíticos en aceite	72
5.3.2.1. Obtención del aceite en planta piloto (Abencor)	72
5.3.2.2. Humedad de la pasta de olivas	73
5.3.2.3. Materia grasa de la pasta de olivas	73

5.3.2.4. Grado de acidez .....	73
5.3.2.5. Índice de peróxidos .....	74
5.3.2.6. Absorbancia en el UV ( $K_{270}$ y $K_{232}$ ) .....	74
5.3.2.7. Perfil de ácidos grasos .....	75
5.3.2.8. Estabilidad frente a la oxidación .....	76
5.3.2.9. Medida de las coordenadas cromáticas de color .....	76
5.3.2.10. Pigmentos fotosintéticos totales .....	76
5.3.2.11. Determinación del perfil pigmentario .....	77
5.3.2.11.1. Extracción de pigmentos en el aceite .....	77
5.3.2.11.2. Identificación y cuantificación por HPLC-DAD .....	78
5.3.2.11.3. Obtención de patrones .....	81
5.3.2.12. Contenido en fenoles totales (Folin) .....	81
5.3.2.13. Determinación del perfil fenólico .....	82
5.3.2.13.1. Extracción por el método A .....	82
5.3.2.13.2. Extracción por el método B (método COI) .....	82
5.3.2.13.3. Identificación y cuantificación por HPLC-DAD .....	82
5.3.2.13.4. Identificación y cuantificación por HPLC-ESI-MS/MS .....	84
5.3.2.14. Determinación de $\alpha$ -tocoferol .....	84
5.3.2.15. Análisis sensorial .....	85
5.3.2.16. Determinación de la capacidad antioxidante por el método ORAC .....	85
5.3.3. Métodos estadísticos .....	85
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>87</b>
<b>6.1. Metabolitos implicados en la acumulación de oleuropeína y su degradación en frutos de <i>Olea europaea</i> L. en las variedades <i>Hojiblanca</i> y <i>Arbequina</i> .....</b>	<b>87</b>
6.1.1. Desarrollo del fruto .....	87
6.1.2. Cambios metabólicos durante la acumulación y la degradación de oleuropeína. Implicación de la enzima $\beta$ -glucosidasa .....	88
6.1.2.1. Variedad <i>Hojiblanca</i> .....	92
6.1.2.2. Variedad <i>Arbequina</i> .....	97
<b>6.2. Formación y transformación de compuestos fenólicos durante el crecimiento y desarrollo de los frutos del olivo (<i>Olea europaea</i> L.) de variedad <i>Arbequina</i>: comparación entre cultivo ecológico y cultivo convencional .....</b>	<b>101</b>
6.2.1. Desarrollo del fruto .....	101

6.2.2. Formación y transformación de oleuropeína.....	103
6.2.2.1. Cambios metabólicos durante la acumulación y degradación de oleuropeína.....	103
6.2.2.2. Implicación de la enzima $\beta$ -glucosidasa en la degradación de oleuropeína.....	108
6.2.2.3 Influencia del tipo y la zona de cultivo.....	111
6.2.3. Formación y transformación de lignanos y flavonoides.....	113
6.2.3.1. Flavonoides.....	114
6.2.3.2. Lignanos.....	118
6.2.3.3. Relación entre la biosíntesis de lignanos y flavonoides.....	121
6.2.4. Evolución de compuestos fenólicos en dos campañas sucesivas.....	124
<b>6.3. Localización tisular de la enzima <math>\beta</math>-glucosidasa en olivas de la variedad <i>Arbequina</i>.....</b>	<b>131</b>
6.3.1. Desarrollo del fruto.....	131
6.3.2. Localización de la enzima $\beta$ -glucosidasa.....	133
6.3.3. Conclusión.....	139
<b>6.4. Estudio de aceites de oliva ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de la provincia de <i>Lleida</i> durante las campañas oleícolas 2009/10 y 2010/11.....</b>	<b>141</b>
6.4.1. Parámetros de calidad.....	141
6.4.2. Perfil de ácidos grasos.....	144
6.4.3. Color y perfil pigmentario.....	148
6.4.4. Contenido fenólico.....	154
6.4.5. Contenido en $\alpha$ -tocoferol y estabilidad oxidativa.....	163
6.4.6. Análisis sensorial.....	165
6.4.7. Clasificación de los aceites.....	168
6.4.8. Conclusión.....	170
<b>6.5. Caracterización de aceites de oliva de las variedades en retroceso <i>Negral</i>, <i>Verdal</i>, <i>Mançanenc</i>, <i>Arbre Blanc</i>, <i>Grossal</i> y <i>Becarut</i> de producción ecológica durante las campañas oleícolas 2009/10 y 2010/11.....</b>	<b>173</b>
6.5.1. Características de los frutos.....	173
6.5.2. Parámetros de calidad.....	175
6.5.3. Perfil pigmentario.....	181
6.5.4. Perfil fenólico.....	189
6.5.5. Estabilidad oxidativa.....	195

6.5.6. Tocoferol.....	195
6.5.7. Perfil sensorial.....	196
6.5.8. Conclusión.....	198
<b>6.6. Caracterización de aceites de oliva virgen de variedades en retroceso cultivadas en La Noguera.....</b>	<b>199</b>
6.6.1. Características de los frutos.....	199
6.6.2 Parámetros de calidad.....	200
6.6.3 Perfil de ácidos grasos.....	201
6.6.4 Fenoles totales, tocoferol y otros parámetros relacionados con la oxidación.....	208
6.6.5. Fracción fenólica.....	212
6.6.6. Pigmentos.....	217
6.6.7. Evaluación sensorial.....	218
6.6.8. Valoración global de los aceites.....	220
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>223</b>
<b>8. ANEJO.....</b>	<b>227</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>229</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Límites legales de los parámetros de calidad del aceite de oliva virgen (AOV) y aceite de oliva virgen extra (AOVE).....	6
<b>Tabla 2.</b> Límites legales de los parámetros de pureza del aceite de oliva (AOV y AOVE).....	6
<b>Tabla 3.</b> Familias de compuestos presentes en el aceite de oliva virgen.....	7
<b>Tabla 4.</b> Familias de compuestos fenólicos.....	20
<b>Tabla 5.</b> Zona de cultivo, variedad y tipo de cultivo de las muestras de fruto en las campañas 2008/09 y 2009/10.....	55
<b>Tabla 6.</b> Datos climáticos correspondientes a los años 2008 y 2009 en Cabra (Córdoba), Écija (Sevilla) y Els Torms (Lleida).....	56
<b>Tabla 7.</b> Tabla descriptiva de los muestreos de olivas de cultivo convencional de las variedades <i>Arbequina</i> y <i>Hojiblanca</i> realizados en Córdoba durante la campaña 2008/09.....	58
<b>Tabla 8.</b> Tabla descriptiva de los muestreos de olivas de cultivo ecológico y convencional de la variedad <i>Arbequina</i> realizados en Lleida durante la campaña 2008/09.....	58
<b>Tabla 9.</b> Tabla descriptiva de los muestreos de olivas ecológicas y convencionales de la variedad <i>Arbequina</i> realizados en Sevilla y en Lleida durante la campaña 2009/10.....	59
<b>Tabla 10.</b> Aceites monovarietales ecológicos muestreados durante las campañas 2009/10 y 2010/11.....	60
<b>Tabla 11.</b> Escala para la determinación del índice de madurez en olivas.....	61
<b>Tabla 12.</b> Gradiente utilizado para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en extractos de pulpa de oliva mediante HPLC-ESI-MS/MS.....	65
<b>Tabla 13.</b> Condiciones optimizadas para el análisis de los compuestos fenólicos mediante HPLC-ESI-MS/MS.....	67
<b>Tabla 14.</b> Condiciones cromatográficas utilizadas para la obtención de 3,4-DHPEA-EDA y otros fenoles mediante cromatografía líquida semipreparativa.....	71
<b>Tabla 15.</b> Condiciones cromatográficas utilizadas para la obtención de 3,4-DHPEA-EA mediante cromatografía líquida semipreparativa.....	72
<b>Tabla 16.</b> Condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de pigmentos en aceite de oliva mediante HPLC-DAD.....	79
<b>Tabla 17.</b> Características espectrales de los distintos pigmentos cloroplásticos según el sistema de HPLC-DAD empleado para la separación de pigmentos en aceite de oliva.....	80
<b>Tabla 18.</b> Condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de fenoles mediante HPLC-DAD.....	83

<b>Tabla 19.</b> Concentraciones individuales y totales de las formas agliconas de oleuropeína y ligustrósido durante el ciclo vegetativo del fruto del olivo <i>Olea europaea</i> L. de las variedades <i>Hojiblanca</i> y <i>Arbequina</i> .....	94
<b>Tabla 20.</b> Concentraciones individuales y totales de las formas agliconas dialdehídicas de oleuropeína y ligustrósido durante el ciclo vegetativo del fruto del olivo <i>Olea europaea</i> L. de las variedades <i>Hojiblanca</i> y <i>Arbequina</i> .....	95
<b>Tabla 21.</b> Valores medios y rangos de los parámetros de calidad, estabilidad oxidativa, $\alpha$ -tocoferol y fenoles totales de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	141
<b>Tabla 22.</b> Valores medios y rangos de los porcentajes (%) de ácidos grasos individualmente y porcentajes de ácidos grasos saturados (SAF), monoinsaturados (MUFA), poliinsaturados (PUFA) y relación MUFA/PUFA de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	145
<b>Tabla 23.</b> Valores medios y rangos del contenido en pigmentos totales determinados por espectrofotometría (mg/kg de aceite), del perfil pigmentario por HPLC (mg/kg de aceite) y de las coordenadas CIELAB de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	149
<b>Tabla 24.</b> Valores medios y rangos del perfil fenólico por HPLC (mg/kg de aceite) de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	156
<b>Tabla 25.</b> Valores medios de los atributos amargo, picante y frutado en aceites de <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	165
<b>Tabla 26.</b> Matriz de correlación entre atributos sensoriales, parámetros de calidad y compuestos fenólicos.....	168
<b>Tabla 27.</b> Características de los frutos en el momento de cosecha de las campañas 2009/10 y 2010/11.....	174
<b>Tabla 28.</b> Parámetros de calidad de los aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.....	177
<b>Tabla 29A.</b> Perfil de ácidos grasos (expresados en %) determinados mediante cromatografía de gases de los aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.....	178
<b>Tabla 29B.</b> Perfil de ácidos grasos (expresados en %) determinados mediante cromatografía de gases de los aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.....	179
<b>Tabla 30.</b> Características del perfil de ácidos grasos de los aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.....	180

<b>Tabla 31A.</b> Perfil pigmentario (expresado en mg/kg aceite) determinado mediante HPLC-DAD de los aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.....	183
<b>Tabla 31B.</b> Perfil pigmentario (expresado en mg/kg aceite) determinado mediante HPLC-DAD de los aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.....	184
<b>Tabla 31C.</b> Perfil pigmentario (expresado en mg/kg aceite) determinado mediante HPLC-DAD de los aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.....	185
<b>Tabla 32.</b> Parámetros relacionados con la fracción pigmentaria y coordenadas de color CIELAB en aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.....	187
<b>Tabla 33.</b> Matriz de correlación entre las coordenadas de color y los pigmentos totales.....	189
<b>Tabla 34.</b> Estabilidad oxidativa y contenido total de algunos compuestos antioxidantes de los aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.....	190
<b>Tabla 35A.</b> Perfil fenólico (expresado en mg/kg de aceite) determinado mediante HPLC-DAD de aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.....	191
<b>Tabla 35B.</b> Perfil fenólico (expresado en mg/kg de aceite) determinado mediante HPLC-DAD de aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.....	192
<b>Tabla 35C.</b> Perfil fenólico (expresado en mg/kg de aceite) determinado mediante HPLC-DAD de aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.....	193
<b>Tabla 36.</b> Datos de los frutos de las variedades en retroceso sometidos a extracción en el sistema Abencor.....	200
<b>Tabla 37.</b> Parámetros de calidad básicos de los aceites de las variedades en retroceso.....	201
<b>Tabla 38A.</b> Porcentajes (%) de la composición de ácidos grasos determinados mediante cromatografía de gases de los aceites de las variedades en retroceso.....	203
<b>Tabla 38B.</b> Porcentajes (%) de la composición de ácidos grasos determinados mediante cromatografía de gases de los aceites de las variedades en retroceso.....	204
<b>Tabla 39.</b> Análisis de varianza para el ácido palmítico de los aceites de las variedades en retroceso.....	207
<b>Tabla 40.</b> Pruebas de Múltiple Rangos para ácido palmítico por variedad (p: 95%).....	208
<b>Tabla 41.</b> Parámetros relacionados con actividad antioxidante de los aceites de las variedades en retroceso.....	210
<b>Tabla 42.</b> Correlación entre parámetros relacionados con los procesos de oxidación.....	211
<b>Tabla 43.</b> Evaluación sensorial de los aceites de oliva de las variedades en retroceso.....	219
<b>Tabla 44.</b> Valoración global de los aceites de las variedades en retroceso.....	221



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura de los tocoferoles.....	10
<b>Figura 2.</b> Estructura de la molécula de las clorofilas.....	13
<b>Figura 3.</b> Ruta de formación de los pigmentos clorofílicos.....	14
<b>Figura 4.</b> Esquema de degradación de la molécula de clorofila.....	15
<b>Figura 5.</b> Estructura química de los principales pigmentos carotenoides del aceite de oliva.....	16
<b>Figura 6.</b> Ruta de formación de los pigmentos carotenoides.....	17
<b>Figura 7.</b> Principales compuestos fenólicos del aceite de oliva.....	22
<b>Figura 8.</b> Estructura química básica de los flavonoides y sus principales subgrupos.....	24
<b>Figura 9.</b> Estructura química básica de los lignanos.....	24
<b>Figura 10.</b> Rutas biosintéticas implicadas en la formación de los compuestos fenólicos.....	25
<b>Figura 11.</b> Ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides.....	26
<b>Figura 12.</b> Biosíntesis de los fenilpropanoides: biosíntesis de los monolignoles (Ruta A).....	27
<b>Figura 13.</b> Biosíntesis de los fenilpropanoides: biosíntesis de los flavonoides (Ruta B).....	28
<b>Figura 14.</b> Ruta de biosíntesis de la oleuropeína propuesta por Damtoft et al. (1993, 1995a).....	30
<b>Figura 15.</b> Fotografía aérea de las parcelas situadas en Els Torms (Lleida).....	55
<b>Figura 16.</b> Cromatograma HPLC-DAD ( $\lambda = 410$ nm) del extracto de pigmentos clorofílicos y xantofilas del aceite de oliva de la variedad <i>Arbequina</i> .....	80
<b>Figura 17.</b> Cromatograma HPLC-DAD ( $\lambda = 278$ nm en negro, $\lambda = 339$ nm en azul) del extracto de fenoles del aceite de oliva de la variedad <i>Arbequina</i> .....	84
<b>Figura 18.</b> Cambios en el peso del fruto y del hueso (g) y en la humedad (%) durante los diferentes estados de maduración de las variedades <i>Hojiblanca</i> (A) y <i>Arbequina</i> (B).....	88
<b>Figura 19.</b> Cambios en el contenido fenólico total durante el ciclo vegetativo de los frutos ( $\mu\text{mol/g}$ de pulpa seca) de las variedades <i>Hojiblanca</i> y <i>Arbequina</i> .....	89
<b>Figura 20.</b> Cambios en la concentración en compuestos fenólicos ( $\mu\text{mol/g}$ de pulpa seca) implicados en las rutas de síntesis y degradación durante el ciclo vegetativo de los frutos de las variedades <i>Hojiblanca</i> y <i>Arbequina</i> .....	90
<b>Figura 21.</b> Reacciones propuestas para la implicación de $\beta$ -glucosidasa en el metabolismo de la oleuropeína en frutos de las variedades <i>Hojiblanca</i> y <i>Arbequina</i> .....	91
<b>Figura 22.</b> Cambios en la actividad $\beta$ -glucosidasa ( $\mu\text{kat/g}$ de polvo acetónico) durante el ciclo vegetativo del fruto de las variedades <i>Hojiblanca</i> (A) y <i>Arbequina</i> (B).....	93

<b>Figura 23.</b> Evolución del peso del fruto y del hueso (g) y de la humedad de la oliva (%) durante el periodo de maduración en frutos de la variedad <i>Arbequina</i> cultivada en la provincia de Lleida .....	102
<b>Figura 24.</b> Cromatograma de masas de los iones cuantificados en la oliva mediante la técnica HPLC-MS/MS .....	104
<b>Figura 25.</b> Cambios en la concentración de fenoles ( $\mu\text{mol/g}$ de pulpa seca) durante el ciclo vegetativo de oliva <i>Arbequina</i> de Lleida .....	105
<b>Figura 26.</b> Cambios en la actividad $\beta$ -glucosidasa durante el ciclo vegetativo del fruto ( $\mu\text{kat/g}$ de polvo acetónico) en muestras de oliva <i>Arbequina</i> procedente de cultivo tradicional y ecológico .....	108
<b>Figura 27.</b> Concentración teórica de oleuropeína en ausencia de la enzima $\beta$ -glucosidasa (estimada como la suma de oleuropeína y sus formas agliconas) ( $\mu\text{mol/g}$ ) en las plantaciones de Lleida .....	112
<b>Figura 28.</b> Concentración teórica de oleuropeína en ausencia de la enzima $\beta$ -glucosidasa (estimada como la suma de oleuropeína y sus formas agliconas) ( $\mu\text{mol/g}$ ) en las plantaciones de Sevilla .....	113
<b>Figura 29A.</b> Evolución de flavonoides (mg/kg pulpa seca) a lo largo de la maduración de frutos de la variedad <i>Arbequina</i> .....	115
<b>Figura 29B.</b> Evolución de flavonoides (mg/kg pulpa seca) a lo largo de la maduración de frutos de la variedad <i>Arbequina</i> .....	116
<b>Figura 29C.</b> Evolución de flavonoides (mg/kg pulpa seca) a lo largo de la maduración de frutos de la variedad <i>Arbequina</i> .....	117
<b>Figura 30A.</b> Evolución de pinoresinol (mg/kg pulpa seca) a lo largo de la maduración de frutos de la variedad <i>Arbequina</i> en cultivo ecológico y tradicional .....	119
<b>Figura 30B.</b> Evolución de acetoxipinoresinol (mg/kg pulpa seca) a lo largo de la maduración de frutos de la variedad <i>Arbequina</i> en cultivo ecológico y tradicional .....	120
<b>Figura 30C.</b> Evolución del derivado del acetoxipinoresinol (mg/kg pulpa seca) a lo largo de la maduración de frutos de la variedad <i>Arbequina</i> en cultivo ecológico y tradicional .....	120
<b>Figura 31.</b> Concentración de lignanos ( $\mu\text{mol/g}$ pulpa seca) durante en la etapa de cuajado y endurecimiento del hueso .....	121
<b>Figura 32.</b> Concentración de flavonoides ( $\mu\text{mol/g}$ pulpa seca) en la etapa de cuajado y endurecimiento del hueso .....	122

<b>Figura 33.</b> Concentración de compuestos fenólicos totales (mg/kg de pulpa seca) en frutos de oliva de cultivo ecológico y convencional en cuatro estados de madurez a lo largo de las campañas 2008/09 y 2009/10 .....	125
<b>Figura 34.</b> Concentración de compuestos secoiridoides (mg/kg de pulpa seca) en frutos de oliva de cultivo ecológico y convencional en cuatro estados de madurez a lo largo de las campañas 2008/09 y 2009/10 .....	125
<b>Figura 35.</b> Concentración de flavonoides no antocianicos (mg/kg de pulpa seca) en frutos de oliva de cultivo ecológico y convencional en cuatro estados de madurez a lo largo de las campañas 2008/09 y 2009/10 .....	126
<b>Figura 36.</b> Concentración de alcoholes fenólicos (mg/kg de pulpa seca) en frutos de oliva de cultivo ecológico y convencional en cuatro estados de madurez a lo largo de las campañas 2008/09 y 2009/10 .....	126
<b>Figura 37.</b> Concentración de ácidos fenólicos (mg/kg de pulpa seca) en frutos de oliva de cultivo ecológico y convencional en cuatro estados de madurez a lo largo de las campañas 2008/09 y 2009/10 .....	127
<b>Figura 38.</b> Concentración de lignanos (mg/kg de pulpa seca) en frutos de oliva de cultivo ecológico y convencional en cuatro estados de madurez a lo largo de las campañas 2008/09 y 2009/10 .....	127
<b>Figura 39.</b> Concentración de cianidinas (mg/kg de pulpa seca) en frutos de oliva de cultivo ecológico y convencional en cuatro estados de madurez a lo largo de las campañas 2008/09 y 2009/10 .....	128
<b>Figura 40A.</b> Fotografías correspondientes a las olivas de la variedad <i>Arbequina</i> en las diferentes fechas de muestreos de cultivo ecológico y de cultivo convencional .....	132
<b>Figura 40B.</b> Fotografías correspondientes a las olivas de la variedad <i>Arbequina</i> en las diferentes fechas de muestreos de cultivo ecológico y de cultivo convencional .....	133
<b>Figura 41.</b> Fotografías de las secciones de los frutos: Fig 41A (40X) sección del segundo muestreo; Fig 41B (40X) sección del segundo muestreo; Fig 41C (40X) sección del tercer muestreo; Fig 41D (40X) sección del séptimo muestreo .....	134
<b>Figura 42.</b> Fotografías de las secciones de los frutos en la parte del hueso: Fig 42A (400X) sección del segundo muestreo; Fig 42B (400X) sección del tercer muestreo; Fig 42C (400X) sección del cuarto muestreo; Fig 42D (400X) sección del séptimo muestreo .....	135
<b>Figura 43.</b> Fotografías de las secciones de los frutos: Fig 43A (400X) sección del tercer muestreo; Fig 43B (400X) sección del cuarto muestreo; Fig 43C (400X) sección del	

quinto muestreo; Fig 43D (400X) sección del sexto muestreo; Fig 43E (400X) sección del séptimo muestreo; Fig 43F (400X) sección del séptimo muestreo.....	136
<b>Figura 44.</b> Fotografías de las secciones de los frutos a 1000X: Fig 44A y 44B parte del hueso; Fig 44C y 44D parte de la pulpa; Fig 44E y 44F parte de la piel.....	138
<b>Figura 45.</b> Valores de acidez e índice de peróxidos por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	142
<b>Figura 46.</b> Valores de $K_{232}$ y $K_{270}$ por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	143
<b>Figura 47.</b> Valores de los porcentajes de ácido oleico, palmítico y linoleico por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	146
<b>Figura 48.</b> Valores de la relación MUFA/PUFA por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	147
<b>Figura 49.</b> Valores de la suma de pigmentos determinados por HPLC por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	151
<b>Figura 50.</b> Valores de los parámetros CIELAB por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	153
<b>Figura 51.</b> Valores de fenoles totales por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	154
<b>Figura 52.</b> Valores de la suma de fenoles determinados por HPLC por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	157
<b>Figura 53A.</b> Valores de los derivados secoiridoides determinados por HPLC por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	158
<b>Figura 53B.</b> Valores de los derivados secoiridoides determinados por HPLC por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	159
<b>Figura 54A.</b> Valores de la suma de fenoles por familias determinados por HPLC por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	160
<b>Figura 54B.</b> Valores de la suma de fenoles por familias determinados por HPLC por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	161
<b>Figura 55.</b> Valores de $\alpha$ -tocoferol por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	163
<b>Figura 56.</b> Valores de estabilidad oxidativa por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010.....	165

<b>Figura 57.</b> Valores de amargo, picante y frutado por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010 .....	167
<b>Figura 58.</b> Análisis de componentes principales de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010 basado en los principales parámetros de estudio .....	169
<b>Figura 59.</b> Análisis de componentes principales de los aceites ecológicos de la variedad <i>Arbequina</i> de las campañas 2009 y 2010 basado en los principales parámetros de estudio .....	170
<b>Figura 60.</b> Porcentaje (%) de ácido palmítico en los aceites de las variedades en retroceso .....	205
<b>Figura 61.</b> Porcentaje (%) de ácido oleico en los aceites de las variedades en retroceso .....	205
<b>Figura 62.</b> Porcentaje (%) de ácido linoleico en los aceites de las variedades en retroceso .....	205
<b>Figura 63.</b> Valores medios del porcentaje (%) de ácido palmítico de los aceites de las variedades en retroceso en dos campañas sucesivas .....	207
<b>Figura 64.</b> Concentraciones de los compuestos fenólicos (mg/kg de aceite) en los aceites de las variedades en retroceso .....	213
<b>Figura 65.</b> Concentraciones de compuestos secoiridoides (mg/kg aceite) en los aceites de las variedades en retroceso .....	214
<b>Figura 66.</b> Concentraciones de flavonoides, alcoholes fenólicos y ácidos fenólicos (mg/kg aceite) en los aceites de las variedades en retroceso .....	215
<b>Figura 67.</b> Concentraciones de lignanos (mg/kg aceite) en los aceites de las variedades en retroceso .....	215
<b>Figura 68.</b> Correlación entre ORAC y secoiridoides totales según el modelo propuesto .....	216
<b>Figura 69.</b> Correlación entre estabilidad oxidativa (Rancimat) y secoiridoides totales según el modelo propuesto .....	217
<b>Figura 70.</b> Pigmentos totales (mg/kg aceite) determinados por espectrofotometría en los aceites de las variedades en retroceso .....	218



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

3,4-DHPEA	Hidroxitirosol ó 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol
3,4-DHPEA-AC	2-(3,4-dihidroxifenil) etil acetato
3,4-DHPEA-EA	Forma aldehídica del ácido elenólico unido al hidroxitirosol u oleuropeína aglicona
3,4-DHPEA-EDA	Forma dialdehídica del ácido elenólico unida al hidroxitirosol
4CL	<i>p</i> -cumaril:CoA ligasa
A	Absorbancia
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
AAPH	2,2'- azobis (2-amidino-propano) dihidrocloruro
AOV	Aceite de oliva virgen
AOVE	Aceite de oliva virgen extra
AUC	Área bajo la curva
C4H	Cinamato-4-hidroxilasa
CAD	Cinamil alcohol deshidrogenasa
CCPAE	Consejo Catalán de la Producción Agraria Ecológica
CCR	Cinamil-CoA reductasa
CHS	Calcona sintasa
CoA	Coenzima A
COI	Consejo Oleícola Internacional
COMT	Cafeico O-metil transferasa
DAD	Detector de fotodiodos
DAPP	Dimetilalilpirofosfato
DMF	N,N-dimetilformamida
DOP	Denominación de Origen Protegida
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Etilendiamino tetraacético
F5H	Ferúlico 5-hidroxilasa
FAMEs	Ésteres metílicos de ácidos grasos
FAEEs	Ésteres etílicos de ácidos grasos
FT	Contenido en fenoles totales
ESI	Ionización por electrospray
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GC	Cromatografía de gases

GGPP	Geranil-geranil pirofosfato
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IM	Índice de madurez
IP	Índice de peróxidos
IPP	Isopentenilpirofosfato
L	Ácido linoleico
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
n.d.	No detectado
O	Ácido oleico
OMG	Organismo Modificado Genéticamente
ORAC	Capacidad de Absorción de Radicales de Oxígeno
P	Ácido palmítico
PDA	Detector de fotodiodos
PAL	Fenilalanina amonio liasa
<i>p</i> -HPEA	Tirosol ó 2-(4-hidroxifenil)etanol
<i>p</i> -HPEA-EDA	Forma dialdehídica del ácido elenólico unida al tirosol
<i>p</i> -HPEA-EA	Forma aldehídica del ácido elenólico unido al tirosol
PM	Peso molecular
PMSF	Fluoruro sulfonil de fenilmetano
<i>p</i> NPG	<i>p</i> -nitrofenil-β-D-glucopiranosido
POD	Peroxidasa
POX	Polifenol oxidasa
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RSD	Desviación estándar relativa
S	Ácido esteárico
SRM	<i>Selected reaction monitoring</i>
TQD	Detector de triple cuadrupolo
UV	Ultravioleta
UPLC	Cromatografía líquida de ultra resolución
X-Glc	5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-glucopiranosido



# 1. INTRODUCCIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

El sector del aceite de oliva virgen ha ido ganando consumidores a nivel mundial. Hay varias razones que justifican esta situación, entre las que destacan el deseo de la población por consumir productos saludables y también que las mejoras tecnológicas en las empresas extractoras han permitido aumentar la calidad de los productos que se ofertan. El mercado del aceite de oliva virgen comercializa mayoritariamente aceites de oliva virgen (AOV) y virgen extra (AOVE) básicos, y los aceites de oliva virgen extra avalados por una denominación de origen (DOP). En los últimos años, las empresas españolas están haciendo una gran labor con estrategias muy distintas pero con una enorme proyección, siendo la diversificación de la oferta una de ellas. Entre las alternativas para conseguir diversificar la oferta de aceites de oliva virgen destaca la elaboración de aceites de producción ecológica, la producción de aceites de frutos deshuesados, los aceites infusionados o aromatizados, la elaboración de aceites monovarietales de variedades reconocidas, así como el uso de variedades que por diferentes causas cayeron en desuso e incluso la recuperación de aceites de olivos ancestrales.

En los últimos años existe una tendencia creciente en el consumo de alimentos procedentes de la agricultura ecológica, también conocida como biológica u orgánica. La agricultura ecológica está definida como el sistema de producción que mantiene y mejora la salud de los suelos, los ecosistemas y las personas; se basa fundamentalmente en los procesos ecológicos, la biodiversidad y los ciclos adaptados a las condiciones locales, sin usar insumos que tengan efectos adversos, y combina tradición, innovación y ciencia para favorecer el medio ambiente y promover relaciones justas y una buena calidad de vida para todos los que participan en ella. Algunas limitaciones de este tipo de cultivo son el uso de agua libre de contaminantes químicos, la fertilización del suelo mediante el cultivo de leguminosas y el uso de estiércol en lugar de fertilizantes sintéticos, el uso de aperos mecánicos en lugar de herbicidas sintéticos y la prohibición del uso de Organismos Modificados Genéticamente (OMG).

La agricultura ecológica está en expansión, tal y como evidencian las cifras. En el mundo, la superficie agrícola dedicada al cultivo ecológico ha aumentado en las dos últimas décadas hasta 35 millones de hectáreas en 2008 (Willer, 2010a). En España, la producción agrícola ecológica también ha aumentado, alcanzando los 1.6 millones de hectáreas en 2009, lo que la sitúa en la primera posición respecto a los países de la Unión Europea y sexto en el mundo (Willer, 2010a, 2010b). Sin embargo, a pesar de ser un productor importante, más del 70% de los alimentos ecológicos españoles se destinan al mercado exterior. En España, menos de un 1% del gasto en alimentación es destinado a alimentos ecológicos, un porcentaje mucho más bajo que en otros países europeos. Un estudio reciente de Vega-Zamora et al. (2011) afirma que los principales factores que limitan la adquisición de productos ecológicos por parte de la población española son su alto coste, su difícil accesibilidad y la falta de información sobre ellos.

Los expertos en mercados argumentan que este incremento en la adquisición de alimentos ecológicos se apoya principalmente en tres razones:

a) Sensibilización hacia el respeto por el medio ambiente: la agricultura cada vez posee una menor superficie de cultivo y de menor calidad, debido básicamente a la acción del hombre y la desertificación. Por otra parte, los suelos son cada vez menos fértiles, lo que provoca menores cosechas. Esto, sumado a que se espera que la población mundial sea de 9 mil millones de habitantes en 2030 (FAO, 2003; Smil, 2000), pone en una difícil situación al suministro de alimentos a toda la población. Es por estas razones que la FAO ha realizado varios llamamientos para fomentar la producción de alimentos disminuyendo el impacto sobre el medio ambiente (FAO 2002, 2003, 2004), utilizando los recursos naturales de una manera óptima y promocionando el desarrollo local sostenible en la zona, con el objetivo de preservar la biodiversidad de plantas y animales.

b) Preocupación por la ingestión de productos químicos sintéticos como los pesticidas o los nitratos y de OMGs. Por ello, los alimentos procedentes de la agricultura ecológica son una buena opción para el consumidor, ya que tienen limitado el uso de productos químicos y prohibido el cultivo de OMGs.

c) Creencias populares: Entre los consumidores existe la percepción de que los alimentos procedentes de la agricultura ecológica poseen una mayor calidad nutricional.

Es cierto que los productos de producción ecológica presentan ventajas indiscutibles frente a los productos convencionales, como son el respeto al medio ambiente y la garantía de que los residuos de tratamientos fitosanitarios en los alimentos que se ingieren sean mínimos. Pero podríamos preguntarnos si la calidad de los productos de la producción ecológica es mejor, o si con dicha técnica de producción se modifican los metabolismos de la planta hasta el punto de que pueda repercutir en la composición y las propiedades sensoriales de los alimentos. Probablemente, después de una exhaustiva revisión bibliográfica no encontraríamos resultados concluyentes. Con este trabajo se ha intentado avanzar en el conocimiento de los aceites de oliva de producción ecológica, intentando aportar evidencias científicas que ayuden a dar respuesta a las preguntas anteriores. Por ello se abordará desde un completo estudio sobre el metabolismo de compuestos fenólicos en frutos de producción ecológica y convencional, hasta un análisis de aceites ecológicos del mercado de la variedad *Arbequina* y de otras variedades tradicionales hoy en casi desuso. Se completará con un estudio hecho con aceites en planta piloto sobre los aceites procedentes de variedades en retroceso, tanto de producción tradicional como de producción ecológica.



## 2. ANTECEDENTES

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. EL OLIVO

El origen del cultivo del olivo, *Olea europaea* L., se sitúa probablemente en la antigua Mesopotamia, siendo los griegos y fenicios los responsables de su expansión por todos los países de la cuenca mediterránea, aunque en España fueron los romanos quienes dieron continuidad al cultivo y lo extendieron de una manera considerable a partir del siglo II a.C. Posteriormente, los árabes intensificaron y perfeccionaron su cultivo, que perduró a lo largo de los siglos. En el siglo XV, con el descubrimiento de América, el cultivo del olivo pasó al Nuevo Mundo, y hoy en día, se encuentra extendido por todos los continentes.

El olivo pertenece a la familia botánica *Oleaceae*, que comprende una treintena de especies, como el fresno, el aligustre, la forsitia o la lila. Existen dos tipos de *Olea europaea* L., el olivo silvestre o acebuche y el olivo cultivado. El acebuche es un arbusto de ramas enmarañadas y espinosas, casi cuadrangulares, cuyos frutos son muy pequeños, amargos y con poca cantidad de aceite. Las variedades actuales de olivo proceden seguramente de este olivo silvestre, a fuerza de poda, cuidados y selección. El olivo cultivado, desde el punto de vista morfológico, es un árbol de tamaño mediano, de unos 4 a 8 metros de altura según la variedad, de crecimiento lento y de una longevidad extraordinaria. Es una especie de hoja perenne, pequeña y de textura coriácea, con una estructura anatómica que la protege de la pérdida de agua. El tronco es grueso y la corteza de color gris a verde grisáceo. La copa es redondeada, aunque más o menos lobulada; la ramificación natural tiende a producir una copa bastante densa, pero las diferentes técnicas de poda lo aclaran y favorecen el incremento del vuelo y de la cobertura superficial del árbol en detrimento a la altura, facilitando así la penetración de la energía del sol, el crecimiento de las ramas más jóvenes y la recolección del fruto. Es un árbol polimórfico, con fase juvenil, durante la cual tiene un mayor potencial para el enraizamiento, y fase adulta, en la que se manifiesta su capacidad reproductiva.

El ciclo vegetativo del olivo muestra ciertas particularidades. Aunque el crecimiento de brotes y el desarrollo de frutos son fenómenos cíclicos en el olivo que se repiten anualmente, el crecimiento de los brotes se completa dentro del mismo año, mientras que los procesos que conducen a la fructificación requieren dos estaciones consecutivas. En la primera, tiene lugar la formación de las yemas y su inducción floral. Tras el reposo, en la segunda estación, tienen lugar la floración y el crecimiento y desarrollo de los frutos que concluye con la maduración.

La floración del olivo se produce en primavera y desde la aparición de la primera flor a la floración completa pueden transcurrir de dos a tres semanas, en función de la variedad y las condiciones topográficas y climáticas de cada zona. La polinización de las flores se efectúa mediante el viento o los insectos, y tras la fecundación, se produce el cuajado y se forma el fruto.

## 2.2. EL FRUTO

El fruto del olivo, llamado oliva o aceituna, es una drupa de forma elipsoidal a globosa, que normalmente mide de 1 a 4 cm de longitud y de 0.6 a 2 cm de diámetro. Está formada por tres partes diferenciadas: endocarpo o hueso, mesocarpo o pulpa y exocarpo o piel. Estas tres partes tienen su origen en la pared del ovario, mientras que la única semilla que contiene se encuentra en el interior del endocarpo y es de origen embrionario.

El fruto empieza a desarrollarse después de la fecundación, siguiendo un modelo doble sigmoidal que tradicionalmente se divide en tres fases. La fase I se caracteriza por la alta actividad de división celular. El endocarpo alcanza prácticamente su tamaño definitivo, representando el 80% del volumen del fruto y hay un bajo desarrollo del mesocarpo. En la fase II, también llamada esclerificación, el crecimiento se ralentiza manteniéndose el tamaño del fruto constante y ocurre el endurecimiento del endocarpo previo al desarrollo de la semilla, debido a la deposición de una gruesa pared secundaria con un alto contenido en lignocelulosa. Por último, en la fase III, se produce un rápido crecimiento del mesocarpo y exocarpo hasta la madurez fisiológica del fruto, debido en mayor parte al incremento del tamaño de las células más que a la multiplicación celular. En esta fase ocurre la acumulación de aceite y paralelamente la maduración del fruto.

El hueso de la oliva está formado por lignocelulosa, con celulosa, hemicelulosa y lignina como componentes mayoritarios (Heredia-Moreno et al., 1987). La celulosa es un polisacárido constituido por una cadena lineal de  $\beta(1\rightarrow4)$  D-glucosas, mientras que la hemicelulosa es un heteropolímero con una cadena principal como la celulosa, pero con cadenas ramificadas conteniendo otros azúcares como D-xilosas o D-galactosas. La lignina es un polímero complejo formado principalmente por tres estructuras más pequeñas: alcohol *p*-cumarílico, alcohol coniferílico y alcohol sinapílico. Estas estructuras, llamadas monolignoles, son derivadas del ácido cinámico por la ruta general de los fenilpropanoides (esta ruta se explica más adelante en el apartado 2.5.4.1.), en la cual ocurren reacciones de hidroxilación/metilación y oxidación/reducción hasta la formación de los alcoholes (Whetten y Sederoff, 1995). Los monolignoles más comunes en el polímero lignina son los alcoholes coniferílico y sinapílico, que dan lugar a residuos guaiacilo (G) y siringilo (S) respectivamente; mientras el alcohol *p*-cumarílico, que da lugar a residuos *p*-hidroxifenilos (H), no es un residuo muy común en la lignina. Los monolignoles son sintetizados en el citoplasma de la célula y transportados hacia la pared celular a lignificar (Boerjan et al., 2003; Marjamaa et al., 2007). La formación de los monolignoles en el citoplasma implica la acción de enzimas glucosiltransferasas, que los glucosilan como paso previo a su almacenamiento y transporte, lo que reduce su toxicidad y reactividad. Estos monolignoles glucosilados son entonces transportados a la pared celular. Una vez en la pared celular, una enzima  $\beta$ -glucosidasa cataliza los monolignoles glucosilados a sus formas agliconas (Lewis et al., 1998). Posteriormente, ocurre la polimerización de la lignina mediante un mecanismo de unión oxidativa, donde los radicales de los monolignoles

reaccionan con radicales de la lignina. Sin embargo, existe controversia sobre si la glucosilación de los monolignoles se produce realmente para su transporte, disminuyendo así su reactividad y facilitando su llegada a la pared celular para la lignificación, o bien si se glicosilan para actuar como sustancias de reserva. El caso es que esta glucosilación existe y se cree que la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa podría regular el almacenamiento de los monolignoles o su movilización para la síntesis de lignina (Miao y Liu, 2010).

El tejido carnoso de la oliva está formado por células parenquimáticas, que durante el desarrollo del mesocarpo, experimentan un gran aumento en tamaño y simultáneamente, la formación de notables espacios intercelulares. El almacenamiento del aceite ocurre en las vacuolas de estas células (King, 1938).

El exocarpo es la capa exterior más fina del fruto. Este tejido está compuesto por la epidermis y su cutícula. La cutícula es fina en la época de floración y polinización, cuando el ovario se encuentra todavía protegido por los pétalos, pero rápidamente se desarrolla para formar una gruesa capa protectora. En la superficie de la piel se forma una sustancia cerosa, que está compuesta principalmente de triglicéridos y triterpenos (mayoritariamente ácido oleanólico) (Bianchi et al., 1992).

### 2.3. EL ACEITE DE OLIVA

La definición técnica del aceite de oliva virgen se publicó en el Reglamento CEE 136 de 1966 sobre la Organización Común de Mercados (OCM) de las materias grasas, según la cual se considera aceite de oliva virgen al obtenido del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos u otros medios físicos, en condiciones, especialmente térmicas, que no ocasionen la alteración del aceite, y que no hayan sufrido tratamiento alguno distinto del lavado, la decantación, el centrifugado y el filtrado, con exclusión expresa de los aceites obtenidos con disolventes, con procedimientos de reesterificación o por cualquier mezcla de aceites de otra naturaleza. En aquella redacción de la OCM ya constaba la categorización comercial de aceites de oliva y sus especificaciones, que a lo largo de los años ha ido teniendo sucesivas modificaciones.

El marco legal actual está basado en el Reglamento de la Comisión de las Comunidades Europeas nº 2568/1991 y sus correspondientes modificaciones, en las que se define las actuales categorías de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva, así como sus métodos de análisis. Estos métodos de análisis incluyen tanto determinaciones físico-químicas como organolépticas, según las cuales los aceites de oliva se clasificarán en: *aceite de oliva virgen extra*, *aceite de oliva virgen*, *aceite de oliva lampante*, *aceite de oliva refinado*, *aceite de oliva*, *aceite de orujo de oliva bruto*, *aceite de orujo de oliva refinado* y *aceite de orujo de oliva*. Los aceites de las dos primeras categorías, el *aceite de oliva virgen extra* y el *aceite de oliva virgen*, cuyas especificaciones se detallan en las Tablas 1 y 2, pueden ser destinados

directamente al consumo. El *aceite de oliva lampante* no puede ser consumido tal y como se produce, siendo necesaria una refinación. El *aceite de oliva refinado* obtenido, cuyas características sensoriales son prácticamente neutras al carecer de olor y sabor, sirve de base para la preparación de *aceite de oliva*, consistente en una mezcla de aceite refinado y aceite de oliva virgen, que sí puede ser comercializado. Además, la legislación también recoge los diferentes grados de calidad de aceites obtenidos a partir de un subproducto de la almazara, el orujo. El orujo es el residuo sólido resultante del proceso de extracción del aceite, pero que todavía contiene gran parte de materia grasa. Este *aceite de orujo de oliva bruto*, que se extrae mediante disolventes orgánicos a partir del orujo o por una segunda centrifugación, necesita ser refinado antes de su comercialización ya que no es apto para el consumo, dando lugar al *aceite de orujo de oliva refinado*. De la mezcla de *aceite de orujo de oliva refinado* con *aceite de oliva virgen*, se obtiene el *aceite de orujo de oliva*, que es el que llega al consumidor.

**Tabla 1.** Límites legales de los parámetros de calidad del aceite de oliva virgen (AOV) y aceite de oliva virgen extra (AOVE).

PARÁMETROS	ESPECIFICACIONES	
	AOVE	AOV
Acidez (%)	≤0.8	≤2.0
Índice de peróxidos (meq O <sub>2</sub> /kg)	≤20	≤20
K <sub>232</sub>	≤2.50	≤2.60
K <sub>270</sub>	≤0.22	≤0.25
Delta-K	≤0.01	≤0.01
Evaluación organoléptica: Mediana del defecto (Md)	Md=0	Md≤2.5
Evaluación organoléptica: Mediana del atributo frutado (Mf)	Mf>0	Mf>0

**Tabla 2.** Límites legales de los parámetros de pureza del aceite de oliva (AOV y AOVE).

PARÁMETROS	ESPECIFICACIONES
Estigmastadieno (mg/kg)	≤0.10
Isómeros <i>trans</i> de ácidos grasos (%)	tC18:1 ≤ 0.05 t(C18:2+C18:3) ≤0.05
Esteres metílicos y etílicos de ácidos grasos (limitado sólo para AOVE)	Σ FAMES + FAEEs ≤ 75 mg/kg o 75 mg/kg < Σ FAMES + FAEEs ≤ 150 mg/kg y (FAEEs/FAMES) ≤ 1,5
Composición de ácidos grasos (en %)	
Palmítico	7.5-20.0
Palmitoleico	0.3-3.5
Heptadecanoico	≤ 0.3
Heptadecenoico	≤0.3

Esteárico	0.5-5
Oleico	55.0-83.0
Linoleico	3.5-21.0
Mirístico	≤0.05
Linolénico	≤1.0
Araquídico	≤0.6
Eicosenoico	≤0.4
Behénico	≤0.2
Lignocérico	≤0.2
Diferencia ECN42 (HPLC) y ECN42 (cálculo teórico)	≤0.2
<b>Composición de esteroides</b>	
Colesterol (%)	≤0.5
Brassicasterol (%)	≤0.1
Campesterol (%)	≤4.0
Estigmasterol (%)	< Campesterol
β-sitosterol (%)	≥ 93.0
δ-7-estigmastenol (%)	≤ 0.5
Esteroides totales (mg/kg)	≥ 1000
Eritrodiol + Uvaol (%)	≤ 4.5

### 2.3.1. COMPOSICIÓN DEL ACEITE DE OLIVA

El aceite de oliva virgen está constituido principalmente por una fracción glicérida formada principalmente por triglicéridos y por una pequeña proporción de componentes minoritarios de naturaleza heterogénea. En la Tabla 3 se enumeran las principales familias de componentes del aceite.

**Tabla 3.** Familias de compuestos presentes en el aceite de oliva virgen.

<b>Fracción glicérida y derivados (98%)</b>	<b>Compuestos minoritarios (2%)</b>
Triglicéridos	Esteroides y terpenos
Monoglicéridos	Alcoholes alifáticos
Diglicéridos	Esteres no glicéridos
Fosfátidos	Hidrocarburos
Ácidos grasos libres	Compuestos volátiles
	Ceras
	Tocoferoles
	Pigmentos
	Fenoles

### 2.3.1.1. FRACCIÓN GLICÉRIDA Y DERIVADOS

Una de las particularidades del aceite de oliva es su perfil de ácidos grasos, con un alto contenido en ácido oleico (C18:1) (56-84%), y la presencia de los ácidos linoleico (C18:2) (3-21%) y linolénico (C18:3) (0.1-1.5%). Los restantes ácidos grasos más abundantes son el ácido palmítico (C16:0) (6-21%), el ácido palmitoleico (C16:1) (0.3-3.5%) y el ácido esteárico (C18:0) (0.3-5.3%). Los ácidos linoleico y linolénico son ácidos grasos esenciales que el organismo debe adquirir de la dieta, aunque su presencia en los aceites vegetales los hace muy susceptibles de ser oxidados. El aceite de oliva, rico en ácido oleico, es más resistente frente a la oxidación que otros aceites de semillas más polinsaturados (Aparicio et al., 1999).

La mayor parte de estos ácidos grasos del aceite de oliva están esterificados a una molécula de glicerol, formando los triacilglicéridos o triglicéridos, aunque también están presentes en un porcentaje minoritario formando parte de mono y diglicéridos, fosfátidos y ácidos grasos libres. Los diglicéridos (1-3%) y monoglicéridos ( $\leq 0.25\%$ ) pueden formarse por biosíntesis incompleta de los triglicéridos o por hidrólisis química o enzimática. Los ácidos grasos libres provienen de los glicéridos por reacciones hidrolíticas que tienen lugar en el fruto durante el proceso de extracción del aceite.

El aceite de oliva virgen recién producido puede contener cantidades pequeñas de fosfolípidos, entre 40 y 135 mg/kg, principalmente fosfatidilcolina, fosfatidietanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina (Cert et al., 1994). El ácido oleico es el ácido graso predominante en la estructura de los fosfolípidos, siendo el patrón de ácidos grasos similar al de los triglicéridos.

Una de las características que definen la composición grasa de los aceites de oliva virgen es la composición de los triglicéridos. Debido a una cuestión de configuración espacial, en la posición central del glicerol siempre se encuentran ácidos grasos con una o más insaturaciones, debido a que las moléculas que contienen insaturaciones tienen una conformación plana, mientras la conformación de las moléculas saturadas es tetraédrica. De las veinte especies de triglicéridos identificadas, solo algunas están en proporciones significativas en el aceite de oliva: OOO (43.5%), POO (18.4%), OOL (6.8%), POL (5.9%) y SOO (5.1%) (O: ácido oleico, P: ácido palmítico, L: ácido linoleico, S: ácido esteárico) (Fedeli, 1977).

Varios estudios han demostrado que la composición en ácidos grasos es muy variada y depende de múltiples factores, destacando factores agronómicos como el estado de maduración de la oliva, la variedad o las condiciones agroclimáticas de la zona de producción (Aguilera et al., 2005; Beltrán et al., 2004; Fiorino et al., 1996; Hermoso et al., 2001; Mousa et al., 1996; Osman et al., 1994; Uceda et al., 2004).

### 2.3.1.2. COMPUESTOS MINORITARIOS NO GLICÉRIDOS

Bajo la tradicional, aunque erróneamente, denominada fracción insaponificable del aceite de oliva, se engloba toda una serie de compuestos de tipología muy diversa, entre los que se encuentran esteroides, alcoholes alifáticos, ésteres no-glicéridos, hidrocarburos, tocoferoles, compuestos fenólicos, pigmentos (clorofilas y carotenoides), compuestos volátiles y ceras. Estos compuestos, a pesar de su baja concentración, entre el 0,5 % y el 1,5 %, tienen una gran importancia desde el punto de vista del valor biológico y de la conservación del aceite.

El principal hidrocarburo presente en el aceite de oliva es el escualeno, siendo el aceite vegetal más rico en este compuesto, que es uno de los compuestos principales de la fracción insaponificable (40-50%) y un precursor bioquímico de la síntesis de los esteroides.

En el aceite de oliva, dentro de la fracción de esteroides, destaca la presencia de  $\beta$ -sitosterol, compuesto que interfiere en la absorción intestinal del colesterol. El análisis composicional de la fracción de los esteroides permite evaluar el grado de pureza del aceite y la ausencia de mezclas con otros aceites vegetales. También permite clasificar entre aceite virgen, refinado y de orujo. Otros esteroides presentes son el campesterol, estigmasterol,  $\Delta$  5-avenasterol y  $\Delta$  7-avenasterol.

También han sido identificados alcoholes triterpénicos: el eritrodiool y el uvaol, que proceden principalmente de la cutícula de los vegetales y que por tanto están presentes en mayor concentración en los aceites de orujo.

Los principales alcoholes alifáticos de cadena larga presentes en el aceite de oliva son el dicosanol, el tetracosanol, el hexacosanol y el octacosanol, aunque también pueden encontrarse trazas de alcoholes alifáticos con número impar de átomos de carbono.

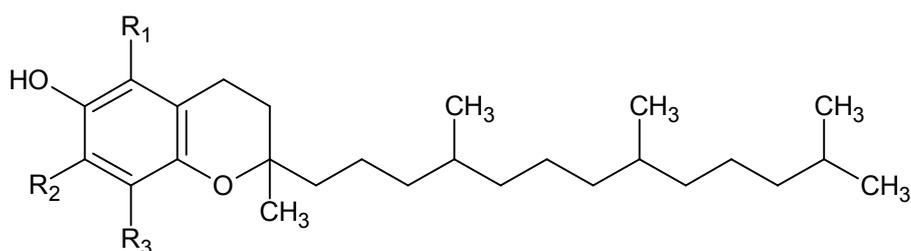
La mayor parte de los ácidos grasos presentes en el aceite de oliva virgen se encuentran esterificados con el glicerol, como ya se ha dicho, formando los triglicéridos. Sin embargo, pequeñas cantidades de éstos forman ésteres con diferentes alcoholes como metanol, etanol y otros alcoholes de cadena larga, así como con esteroides como  $\beta$ -sitosterol, campesterol, estigmasterol y alcoholes triterpénicos. Los ésteres de metilo y etilo se están utilizando actualmente para la identificación de aceites desodorizados en aceites de oliva comercializados como virgen extra, por haberse demostrado que su concentración podría verse incrementada durante la refinación.

Los compuestos volátiles son los principales responsables del aroma característico de los aceites de oliva y tienen un efecto muy importante en la determinación de la calidad del producto. De hecho, el aceite de oliva virgen es el alimento en el que la legislación es más exigente en cuanto a los controles organolépticos que ha de superar. La fracción aromática está formada por compuestos de naturaleza química diversa como alcoholes, ésteres, cetonas

y aldehídos entre otros. Los compuestos responsables del aroma frutado del aceite se forman a partir de los ácidos grasos poliinsaturados linoleico y linolénico a través de una cascada de reacciones llamada ruta de la lipooxigenasa (Olías et al., 1993). En el caso del aceite de oliva, esta ruta se activa durante la molienda y el batido de la pasta. Así, el aroma del aceite depende en gran parte de los niveles de actividad de las enzimas que componen esta ruta, que depende de la variedad (Luna et al., 2006; Ranalli et al., 2008), el estado de madurez del fruto (Aparicio y Morales, 1998) y las condiciones de extracción del aceite (Salas y Sánchez, 1999).

Las ceras son ésteres de los ácidos grasos con alcoholes alifáticos de cadena larga, y se localizan en la superficie del fruto y las hojas. Las ceras más frecuentes en el aceite de oliva son C<sub>40</sub>, C<sub>42</sub>, C<sub>44</sub> y C<sub>46</sub>. La medida del contenido en ceras del aceite se utiliza para detectar posibles adulteraciones en aceites de oliva virgen con aceites obtenidos extraído de olivas o semillas mediante el uso de disolventes orgánicos (Pérez-Camino et al., 2003).

Los tocoferoles son una familia de compuestos poliprenoides cuya estructura consta de un sistema cíclico (llamado cromano) y una cadena poliprenoide saturada. Los distintos tocoferoles se caracterizan según los sustituyentes que aparecen en el anillo del cromano. Se conocen ocho compuestos en la serie de tocoferoles derivados del 6-cromanol. Esta serie está formada por cuatro compuestos con una estructura tocol que tiene una cadena saturada isoprenoide de C<sub>16</sub> y cuatro compuestos con una estructura tocotrienol que tiene tres enlaces dobles en la cadena C<sub>16</sub>. En el aceite de oliva, la forma más abundante de tocoferol es  $\alpha$ -tocoferol, representando el 95% del total de tocoferoles.  $\alpha$ -tocoferol es el principal homólogo de las formas de vitamina E presente en el aceite de oliva. El 5% restante lo constituyen las formas  $\beta$ -,  $\gamma$ - y  $\delta$ -tocoferol (Figura 1). Estos compuestos contribuyen de forma importante a dar estabilidad al aceite.



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	Compuesto
CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	$\alpha$ - tocoferol
CH <sub>3</sub>	H	CH <sub>3</sub>	$\beta$ - tocoferol
H	CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	$\gamma$ - tocoferol
H	H	CH <sub>3</sub>	$\delta$ - tocoferol

**Figura 1.** Estructura de los tocoferoles.

El contenido en tocoferol depende mucho de la variedad de la aceituna, la climatología, los factores ambientales y el estado de maduración, así como de los factores tecnológicos (Gómez-Rico et al., 2009a; Lavelli et al., 2006; Lavelli y Bondesan, 2005; Salvador et al., 2003; Sicari et al., 2010). En las últimas dos décadas, han aumentado los trabajos de investigación relacionados con la presencia de  $\alpha$ -tocoferol en aceites de oliva virgen en todo el mundo. En términos generales, el contenido en  $\alpha$ -tocoferol de los aceites varía entre 5 y 300 mg de  $\alpha$ -tocoferol/kg de aceite. No obstante, aceites de oliva de alta calidad analizados justo después de su extracción, contienen entre 100 y 300 mg de  $\alpha$ -tocoferol/kg de aceite, aunque se pueden encontrar aceites de olivas de ciertas variedades con niveles mayores a 350 mg de  $\alpha$ -tocoferol/kg de aceite, siempre extraídos de olivas sanas y a escala de laboratorio (Kiritsakis et al., 1998a; Salvador et al., 1998). En aceites comerciales, estos niveles son más bajos (Psomiadou et al., 2000).

El color del aceite de oliva virgen se atribuye a la presencia de pigmentos fotosintéticos, que se describirán con mayor detalle más adelante. Su intensidad está relacionada principalmente con aspectos varietales y con la madurez del fruto. El perfil pigmentario del aceite de oliva virgen se ha propuesto como herramienta de trazabilidad de los aceites, dado que la presencia de los productos de degradación de los pigmentos del aceite recién extraído se relaciona con tratamientos térmicos y/o oxidativos.

En las olivas se encuentran también sustancias de carácter fenólico, que pasan en una pequeña proporción al aceite durante el periodo de extracción, principalmente durante la molienda y el batido, quedando el resto en las aguas de vegetación y los orujos. Los compuestos fenólicos constituyen una fracción muy compleja, formada por más de 8000 compuestos de muy diversa tipología. El aceite de oliva es prácticamente el único aceite comestible que contiene cantidades notables de sustancias fenólicas naturales, ya que los restantes tipos de aceites suelen perder estos compuestos durante el proceso de refinación. Los compuestos fenólicos que contiene el aceite son muy variados, desde fenoles simples, ácidos fenólicos, difenoles, hasta moléculas complejas de polifenoles. Forman parte de la llamada fracción polar del aceite de oliva, que se separa del aceite mediante una extracción con mezclas de metanol y agua. El contenido en polifenoles del aceite de oliva es muy variable, según estudios realizados por diversos autores suele variar entre 50 y 500 ppm (expresado en ácido cafeico), siendo menor cuando el aceite procede de frutos muy maduros o cuando está oxidado.

Dada la importancia de las familias de pigmentos y fenoles en este estudio, a continuación se presenta un análisis del conocimiento actual sobre ambas fracciones con mayor detalle.

## 2.4. PIGMENTOS

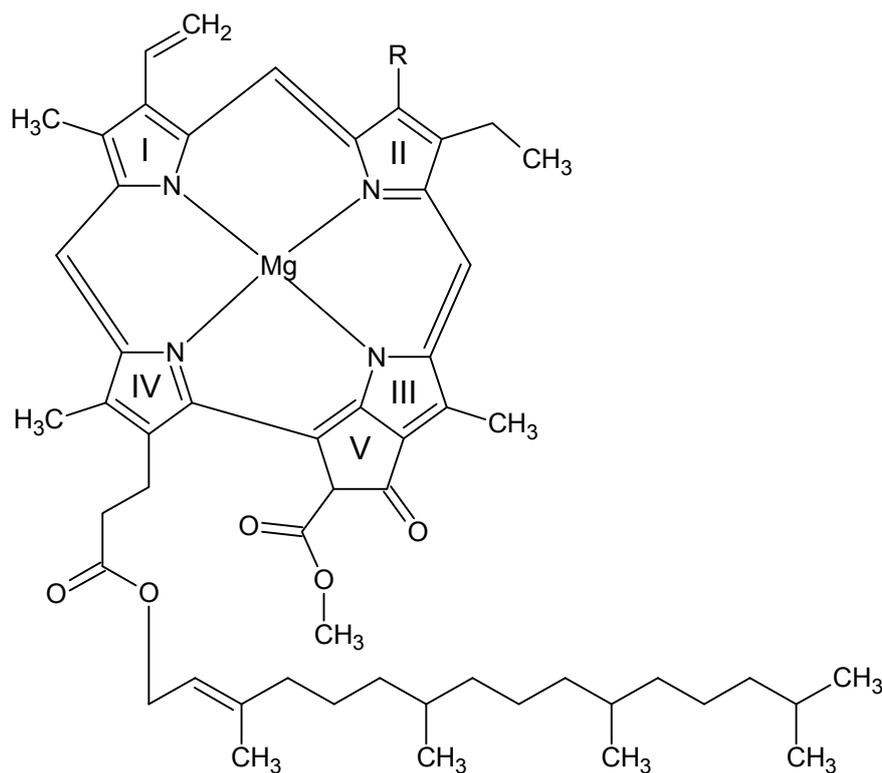
Los pigmentos fotosintéticos son una serie de compuestos presentes en las plantas, que les permiten la realización de la fotosíntesis. La fotosíntesis es la función por la que las plantas verdes sintetizan carbohidratos a partir del agua y del CO<sub>2</sub>, mediante el uso de la energía radiante de la luz solar, concretamente la parte del espectro que va desde el violeta ( $\lambda=380\text{nm}$ ) al rojo ( $\lambda=750\text{nm}$ ).

La fotosíntesis se realiza en los tilacoides, que son unas estructuras en forma de sacos apilados que se encuentran en el interior de los plastidios de las células. Los tilacoides están formados en un 50% de proteínas, un 38% de lípidos y un 12% de pigmentos cloroplásticos (10% de clorofilas y 2% de carotenoides) (Mínguez-Mosquera, 1997). Los pigmentos fotosintéticos se clasifican en dos grandes grupos: clorofilas y carotenoides. Si los plastidios contienen mayoritariamente clorofilas, se denominan cloroplastos; en cambio, si son los carotenoides los pigmentos mayoritarios, se denominan cromoplastos.

### 2.4.1. PIGMENTOS CLOROFÍLICOS

Las clorofilas son los principales fotorreceptores de la fotosíntesis, siendo su función la de transformar la energía captada por los fotones en poder reductor. Son las responsables del color verde de las plantas superiores.

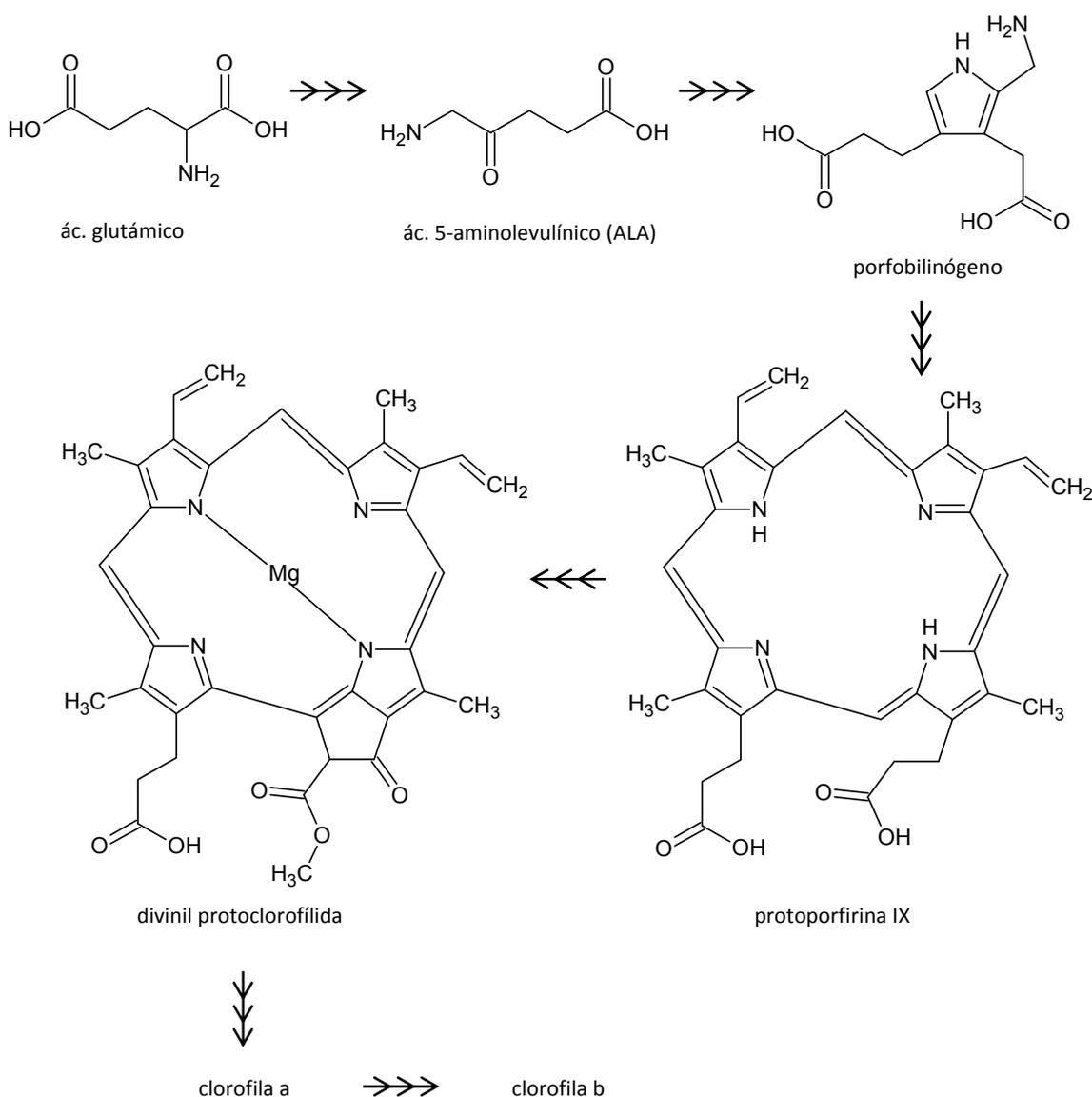
La estructura de las clorofilas consiste en cuatro anillos pirrólicos (denominados del I al IV), uno de los cuáles está reducido (Figura 2). Estos cuatro anillos están ligados en forma de anillo tetrapirrol mediante sus cuatro átomos de nitrógeno con un átomo de Mg<sup>2+</sup> en el centro, formando un complejo esencialmente planar muy estable. El anillo IV se encuentra esterificado con un fitol, lo que confiere carácter hidrofóbico a la molécula. Unido al anillo III, existe un quinto anillo, el V. La diferencia entre las clorofilas a y b estriba en que la a contiene un grupo metilo en el C3, mientras que la clorofila b posee un grupo formilo (Mínguez-Mosquera, 1997).



Compuesto	Mg	Fitol	R
Clorofila a	+	+	CH <sub>3</sub>
Clorofila b	+	+	CHO
Clorofílida a	+	-	CH <sub>3</sub>
Clorofílida b	+	-	CHO
Feofitina a	-	+	CH <sub>3</sub>
Feofitina b	-	+	CHO
Feofórbido a	-	-	CH <sub>3</sub>
Feofórbido b	-	-	CHO

**Figura 2.** Estructura de la molécula de las clorofilas.

La ruta de biosíntesis de las clorofilas empieza en la síntesis del ácido 5-aminolevulínico (ALA) a partir del ácido glutámico. Seguidamente, dos moléculas de ALA se condensan para formar por deshidratación una molécula de porfobilinógeno. La unión de cuatro moléculas de éste con la pérdida de NH<sub>3</sub> (catalizada por porfobilinógeno desaminasa) dan el tetrapirrol. Un cambio en la posición de los sustituyentes y sucesivas descarboxilaciones y dehidrogenaciones llevan hasta la protoporfirina IX, que compleja el catión Mg<sup>2+</sup> formando la divinil protoclorofílida. Ésta, en dos hidrogenaciones sucesivas, forma la clorofílida a, que al ser esterificada con fitol da lugar a clorofila a. La sustitución del grupo metilo del carbono C<sub>3</sub> de la clorofila a por un grupo formilo, mediada por una oxigenasa, lleva a la formación de la clorofila b (Figura 3).

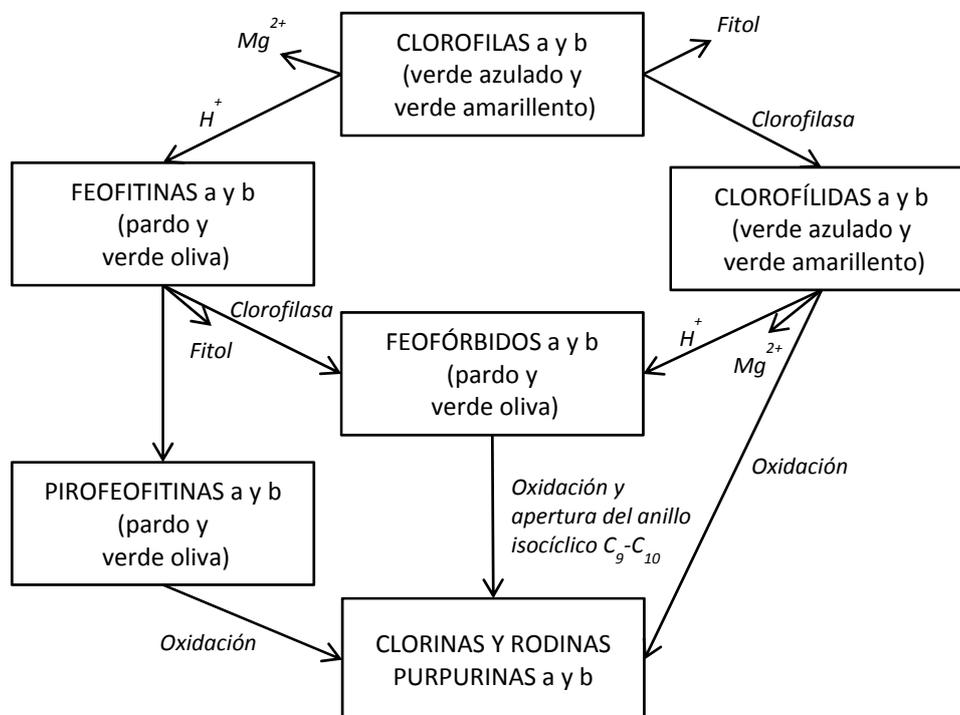


**Figura 3.** Ruta de formación de los pigmentos clorofílicos.

### 2.4.1.1. FORMACIÓN DE LOS DERIVADOS CLOROFÍLICOS

En su ambiente natural, en el cloroplasto de las olivas, las clorofilas son bastante estables. Sin embargo, cuando se produce una pérdida de las condiciones fisiológicas (por ejemplo, con la ruptura de las células y la liberación de ácidos durante la molienda y el batido en la extracción de aceite), las clorofilas pueden cambiar su configuración, como se puede observar en la Figura 4. En este caso, debido al medio ácido, el átomo central de  $Mg^{2+}$  es sustituido por un ión hidrógeno, dando lugar a las feofitinas. Por una parte, si estas feofitinas sufren un calentamiento prolongado, se transforman en pirofeofitinas. En cambio, si sufren la acción de la enzima clorofilasa, pierden el grupo fitol y se transforman en feofórbido a.

Cuando las clorofilas sufren la acción de la enzima clorofilasa, se transforman en clorofilidas. Si estas clorofilidas se encuentran en un medio ácido, se produce la sustitución del ión  $Mg^{2+}$  central por un ión hidrógeno formándose los feofórbidos (Mínguez-Mosquera, 1997). Si las pirofeofitinas, feofitinas y clorofilidas son oxidadas, aparecen las clorinas, rodinas y purpurinas.



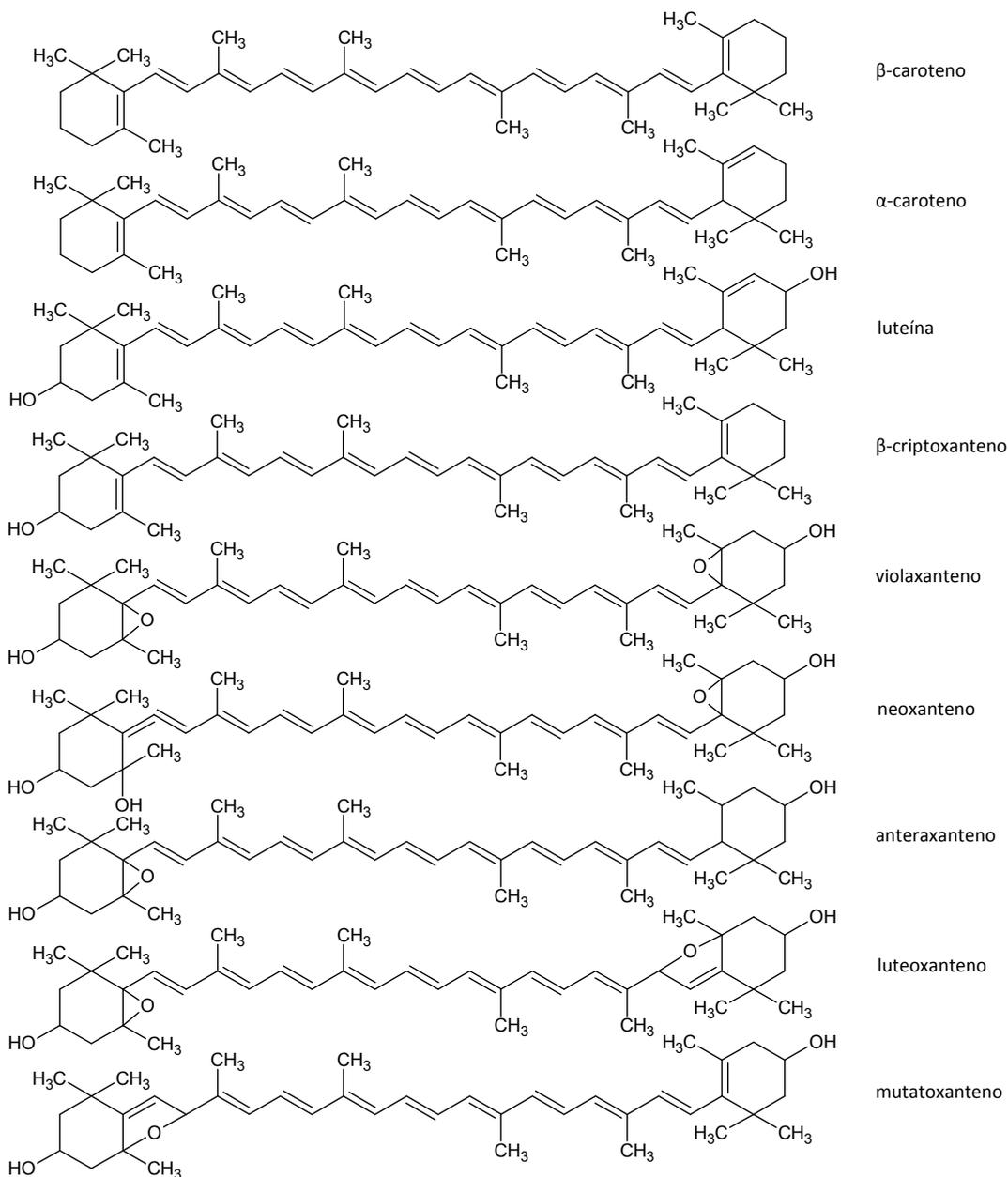
**Figura 4.** Esquema de degradación de la molécula de clorofila.

#### 2.4.2. PIGMENTOS CAROTENOIDES

La función principal de los carotenoides es servir de captadores de energía lumínica, que luego transfieren a las clorofilas que se encargan de transluirla en el proceso fotosintético (Mínguez-Mosquera, 1997).

Los carotenoides son los responsables de la mayoría de colores amarillos, anaranjados y rojos de frutos y hortalizas. Químicamente, se clasifican como terpenoides. Su estructura básica se compone de 40 carbonos, formando ocho unidades de isopreno, de tal forma que la unión de cada unidad se invierte en el centro de la molécula. Como resultado de ello, los dos grupos metilo centrales de la cadena de polieno están separados por seis átomos de carbono, mientras que el resto lo están por cinco. Este esqueleto básico puede modificarse por hidrogenación, deshidrogenación, ciclación, migración del doble enlace, acortamiento o extensión de la cadena, reordenación, isomerización, introducción de funciones oxigenadas o por combinaciones de estos procesos, dando como resultado una gran diversidad de estructuras (Criado, 2005).

Los pigmentos carotenoides pueden dividirse en dos grandes grupos: los carotenos (formados por C y H) y las xantofilas (formadas por C, H y O) (Mínguez-Mosquera, 1997). Los carotenos presentes en el aceite de oliva son  $\beta$ -caroteno y  $\alpha$ -caroteno, mientras que algunas xantofilas son luteína,  $\beta$ -criptoxanteno, violaxanteno, neoxanteno, anteraxanteno, luteoxanteno y mutatoxanteno (Figura 5).



**Figura 5.** Estructura química de los principales pigmentos carotenoides del aceite de oliva.

Algunos carotenoides presentan actividad de provitamina A (Isler, 1971; Simpson 1983). Sin embargo, de los carotenoides naturales, solo un 10% poseen esta actividad, entre ellos el  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxanteno. El  $\beta$ -caroteno es el que presenta una mayor actividad de provitamina A, pues su molécula se escinde por la mitad dando lugar a dos moléculas de retinol. Los demás carotenoides nombrados, tienen menor rendimiento como



### 2.4.3. PIGMENTOS EN EL FRUTO Y EN EL ACEITE DE OLIVA

La composición y contenido en pigmentos de la oliva serán los que después serán transferidos al aceite determinando su color. El color del aceite ha sido excluido de la categorización comercial; sin embargo, el color es uno de los atributos básicos que tiene en cuenta el consumidor a la hora de seleccionar un aceite.

La oliva contiene de forma natural clorofilas, carotenos, xantofilas y antocianinas, que son los pigmentos responsables de su color, cambiando sus concentraciones a lo largo de la maduración. En cambio, el aceite extraído no contiene toda la cantidad de pigmentos que contenía el fruto, debido a que estos se reparten entre la fase sólida y la fase líquida durante la extracción del aceite. Los compuestos antociánicos no se transfieren al aceite debido a su naturaleza lipófila. Además, durante el batido de la pasta, las membranas lipoproteicas que envuelven las gotas de aceite en las células se rompen y se vuelven a formar continuamente, provocando la formación de diminutas gotas de aceite que se emulsionan con el agua de una forma estable, lo que hace imposible su recuperación mediante procedimientos mecánicos. Esta emulsión, y los pigmentos contenidos en ella, es arrastrada con los subproductos del proceso (Ranalli et al., 2003).

En el aceite se encuentran compuestos derivados de los pigmentos contenidos en el fruto. Aunque los pigmentos en la oliva son bastante estables, cuando se extrae el aceite, durante la molienda y el batido de la pasta, se rompen las paredes celulares, exponiendo el contenido celular a las enzimas, oxigenación y calor. En consecuencia, ocurren procesos químicos y enzimáticos que cambian el perfil pigmentario de la oliva. Las clorofilas que contenía el fruto se transforman en feofitinas, debido a la sustitución del ión  $Mg^{2+}$  que une los anillos pirrólicos de la estructura de la clorofila por  $H^+$ . Esta reacción ocurre por la acidificación del medio y visualmente es muy llamativa, ya que afecta directamente al grupo cromóforo de la clorofila, y el color de la pasta de olivas cambia de verde claro a pardo durante el proceso de batido. Por tanto, las feofitinas del aceite son el componente mayoritario de la fracción clorofílica en la mayoría de aceites (Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera, 1996a), aunque hay estudios en los que los aceites retienen gran parte de las clorofilas en su forma nativa (Criado et al., 2007a; Criado et al., 2008). Si en el aceite recién extraído quedan clorofilas, éstas pueden transformarse en feofitinas durante el almacenamiento del aceite (Criado et al., 2008; Gallardo-Guerrero et al., 2005). En algunos aceites se han detectado derivados clorofílicos oxidados en el C13 (hidroxifeofitinas y lactonafeofitinas), cuya presencia puede ser debida a dos causas: a la actividad de las enzimas oxidativas del fruto como clorofilasa (Roca y Mínguez-Mosquera, 2003a) o a las condiciones propias del proceso de obtención del aceite. En aceites procedentes de frutos con alta actividad clorofilasa, como los de la variedad *Arbequina*, se pueden encontrar también clorofílicas y feoforbidas (Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera, 1996b; Roca et al., 2007). Estos compuestos son producto de la desesterificación del fitol en las moléculas de clorofila y de feofitina, respectivamente (Roca y Mínguez-Mosquera, 2001a).

## 2.5. COMPUESTOS FENÓLICOS

Por definición, los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios derivados de la ruta del ácido shikímico y del metabolismo de los fenilpropanoides (Obied et al., 2008), que poseen en su estructura un grupo aromático con uno o más grupos –OH (Shahidi y Naczk, 2004). Como metabolitos secundarios no son esenciales para el crecimiento, desarrollo o reproducción de la planta, pero que juegan un papel importante en la relación entre la planta y su entorno. Los fenoles son sintetizados como respuesta de la planta a estrés biótico o abiótico y se le atribuyen un gran número de funciones:

1. Protección contra los rayos ultravioleta: las plantas sintetizan fenoles para protegerse de la radiación ultravioleta-B (UV-B) (280-320nm), que provoca la alteración del metabolismo de la planta mediante la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los compuestos fenólicos actúan como una pantalla en la capa de células epidérmicas y ajustando los sistemas antioxidantes, tanto a nivel celular como de organismo (Carletti et al., 2003; Winkel-Shirley, 2002).
2. Señales químicas entre plantas y microorganismos: la presencia y concentración de compuestos fenólicos puede ser determinante en la competencia entre plantas, o entre plantas y microorganismos. La infección por parte de hongos micorrízicos, la absorción de nutrientes y el crecimiento de las plantas pueden verse afectados por compuestos fenólicos específicos liberados por los competidores (Hättenschwiler y Vitousek, 2000).
3. Atrayentes de animales polinizadores y/o diseminadores de semillas: algunos compuestos fenólicos, como antocianinas, calconas o flavonas, actúan como pigmentos en flores y frutos, lo que sirve como señal visual para los animales, que posteriormente dispersan el polen o la semilla de la planta.
4. Protección contra patógenos microbianos: altas concentraciones de compuestos fenólicos se asocian habitualmente a una alta resistencia de la planta a patógenos fúngicos, bacteriológicos y virales (Lorenc-Kukula et al., 2005; Nicholson y Hammerschmidt, 1992).
5. Protección contra herbívoros (insectos o vertebrados): la biosíntesis de compuestos fenólicos sirve para reducir o destruir el sabor agradable de la planta (Castellanos y Espinosa-García, 1997; Ehrlich y Raven, 1964; Thorsteinson, 1960; Zagrobelny et al., 2004), lo que disuade a muchos insectos y herbívoros de comérsela.

### 2.5.1. CLASIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS

La clasificación de los compuestos fenólicos no es fácil. De entre todas las familias de fenoles, el grupo de los flavonoides es el más abundante en la naturaleza, por lo que en algunas ocasiones se clasifican como flavonoides y no flavonoides (Crozier et al., 2009). Según Harborne (1989), los compuestos fenólicos se pueden clasificar en base a su estructura, tal y como se indica en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Familias de compuestos fenólicos.

Número de átomos de carbono	Estructura	Clasificación
6	$C_6$	Fenoles simples; Benzoquinonas
7	$C_6 - C_1$	Ácidos benzoicos
8	$C_6 - C_2$	Ácidos fenilacéticos; Acetofenonas
9	$C_6 - C_3$	Ácidos hidroxicinámicos; Polipropenos; Cumarinas
10	$C_6 - C_4$	Naftoquinonas
13	$C_6 - C_1 - C_6$	Xantonas
14	$C_6 - C_2 - C_6$	Estilbenos; Antraquinonas
15	$C_6 - C_3 - C_6$	Flavonoides; Isoflavonoides
18	$(C_6 - C_3)_2$	Lignanós; Neolignanós
30	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$	Biflavonoides
n	$(C_6)_n$	Catecolmelaminas
	$(C_6 - C_3)_n$	Ligninas
	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$	Taninos condensados

### 2.5.2. LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN LOS ALIMENTOS

Los compuestos fenólicos están presentes en los alimentos habituales de la dieta humana, y a pesar de su baja concentración, se consideran componentes importantes tanto desde el punto de vista organoléptico como nutricional. Estos compuestos son los principales causantes del sabor amargo y la astringencia, propiedades sensoriales tan apreciadas en alimentos como el vino, la cerveza, etc. Además, las antocianidinas, un grupo de compuestos clasificados como flavonoides, están relacionadas con la pigmentación de los alimentos y su coloración en tonos rojo, azul, violeta, naranja y púrpura (Belitz y Grosch, 1988).

Desde el punto de vista nutricional, en los últimos años, los compuestos fenólicos han sido centro de muchos estudios por parte de la comunidad científica debido al gran número de actividades biológicas que se les ha atribuido. Los compuestos fenólicos, a bajas concentraciones, funcionan como antioxidantes. Esta propiedad es beneficiosa tanto para el

alimento en sí como en el organismo después de haberlo ingerido, ya que en ambos casos evitan la oxidación de otros componentes importantes del alimento o de las células del cuerpo humano. Esta actividad antioxidante está relacionada con el efecto que se le atribuye a los fenoles como antiarterioescleróticos, cardioprotectores, neuroprotectores, antiinflamatorios, antimutagénicos, anticarcinogénicos, moduladores hormonales, protectores endoteliales, protectores del sistema inmunológico, antialérgicos y antidiabéticos (Cicerale et al., 2010; Han et al., 2007). La función biológica de los fenoles es hoy día un tema de debate, dado que se están conociendo con mayor detalle los metabolitos y se está investigando la causa de por qué dichos metabolitos pueden provocar beneficios para la salud. Algunos metabolitos de los fenoles son moléculas con escasa o nula actividad antioxidante, sin embargo podrían desempeñar alguna otra función biológica que explicaría los beneficios mostrados.

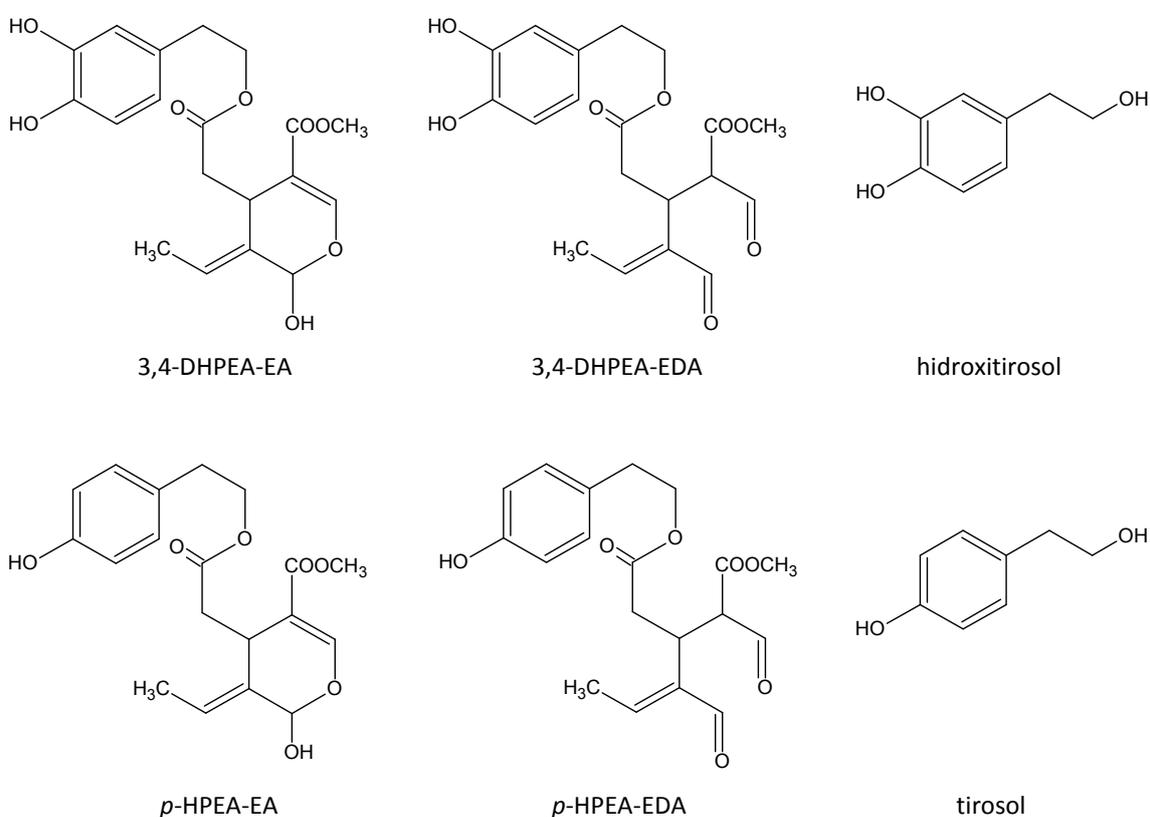
### 2.5.3. COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL FRUTO Y EN EL ACEITE DE OLIVA

El fruto del olivo, como otras plantas oleáceas, se caracteriza por su alto contenido en un tipo de compuestos fenólicos llamados secoiridoides. Los iridoides son compuestos muy abundantes en oleáceas y otras plantas (Kumarasamy et al., 2003; Rodriguez et al., 1995; Rodriguez et al., 1998; Vishwakarma et al., 2004), y deben su nombre a que fueron detectados por primera vez en unas hormigas pertenecientes al género *Iridomirmex*. Los secoiridoides son un grupo de monoterpenos bicíclicos (C<sub>10</sub>) que derivan de los iridoides por apertura del anillo aromático a partir de diversas reacciones enzimáticas y oxidativas (Dinda et al., 2007). Además, el aceite contiene ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, flavonoides y lignanos. Mientras que la pulpa de la oliva contiene elevadas concentraciones de compuestos fenólicos (2-5 g/100g pulpa), los aceites obtenidos contienen valores mucho menores, debido a que los fenoles son polares y tienden a perderse con la fase acuosa durante su extracción (Artajo, 2006).

En el fruto, la mayoría de los compuestos fenólicos están glicosilados, con una o más moléculas de azúcar. Los compuestos secoiridoides principales en el fruto del olivo son oleuropeína y ligustrósido, que son formas glucosiladas de ésteres del ácido elenólico con 2-(3,4-dihidroxifenil) etanol (hidroxitirosol) y 2-(4-hidroxifenil)etanol (tirosol), respectivamente (Soler-Rivas et al., 2000). Otro compuesto secoiridoide presente en la oliva es la demetiloleuropeína (Gómez-Rico et al., 2008; Ragazzi et al., 1973), que corresponde a la forma ácida de oleuropeína. Aunque la mayoría de compuestos fenólicos contenidos en el fruto del olivo se encuentran en la pulpa, algunos compuestos como la nuzhenida, la nuzhenida oleósido o el salidrósido han sido identificados en la parte del hueso de la oliva (Maestro-Duran et al., 1994; Servili et al., 2007a; Silva et al., 2010). Otros compuestos de carácter fenólico identificados en el fruto son el verbascósido y flavonoides glicosilados como luteolina-7-glucósido, apigenina-7-glucósido, quercetina-3-ramnósido y quercetina-3-rutinósido (Romani et al., 1999; Vlahov, 1992).

El perfil cualitativo de los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva no coincide con el del fruto, debido a que la ruptura de las células del fruto en la extracción conlleva la acidificación del medio y el inicio de actividad de varias enzimas, como la polifenoloxidasas (POX), peroxidasa (POD) y otras enzimas hidrolíticas, lo que implica reacciones de oxidación y de fraccionamiento de moléculas que cambian la composición fenólica (Sciancalepore, 1985; Servili et al., 1996). Por otra parte, no todos los fenoles del fruto se transfieren al aceite en igual medida durante la extracción, sino que debido a su polaridad el reparto entre alperujo y aceite presenta notables diferencias entre compuestos.

Así, los compuestos más importantes del aceite de oliva son la oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EA), el ligustrósido aglicona (*p*-HPEA-EA), la forma dialdehídica del ácido elenólico unido al hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EDA), la forma dialdehídica del ácido elenólico unido al tirosol (*p*-HPEA-EDA), el hidroxitirosol (3,4-DHPEA) y el tirosol (*p*-HPEA) (Figura 7).



**Figura 7.** Principales compuestos fenólicos del aceite de oliva.

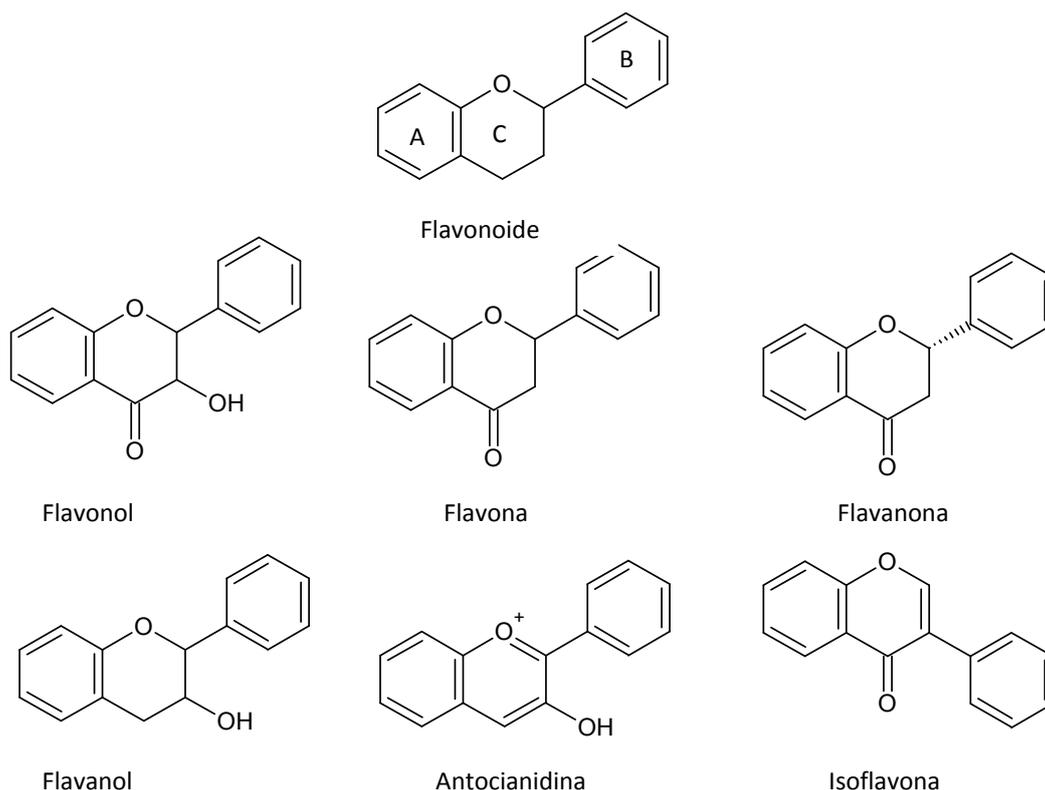
Tanto en el fruto como en el aceite, se encuentran algunos fenoles simples en concentraciones mucho menores, como el ácido *p*-cumárico o el ácido clorogénico.

Uno de los compuestos fenólicos del aceite de oliva cuyo estudio ha generado un mayor interés ha sido el hidroxitirosol. Varios estudios han confirmado que este compuesto inhibe la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Covas et al., 2006; Soler Cantero, 2009; Visioli y Galli, 1994), así como su efecto protector frente a la muerte celular de las células

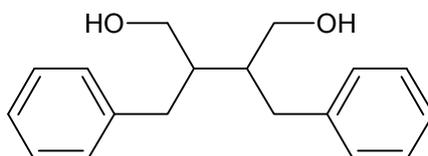
endoteliales (Soler Cantero, 2009). Gran parte de los derivados secoiridoides presentes en el aceite de oliva, son transformados a tirosol e hidroxitirosol durante la digestión. Estos compuestos son absorbidos en el intestino y sus metabolitos son posteriormente detectados en el plasma sanguíneo (Rubió et al., 2012; Soler Cantero, 2009). Otro de los compuestos más estudiados en los últimos años ha sido la forma dialdehídica del ácido elenólico unida al tirosol, abreviado habitualmente como *p*-HPEA-EDA y también conocido como oleocantal, ya que se ha observado que tiene una actividad antiinflamatoria que lo hace muy similar al ibuprofeno (Beauchamp et al., 2005). Sin embargo, aunque se han hecho algunos estudios del efecto de los compuestos por separado, es más razonable pensar que son posibles acciones sinérgicas entre algunos compuestos las que provienen al aceite de sus efectos beneficiosos (Covas, 2007).

Los flavonoides constituyen otra de las familias importantes en oliva y aceite de oliva. Se trata de la familia más numerosa de compuestos fenólicos cuya estructura básica está constituida por 2 anillos bencénicos (anillos A y B) conectados mediante un anillo heterocíclico, piran o pirona si tiene un doble enlace en la posición 4 (anillo C) (Figura 8). Se clasifican en flavonoles, flavonas, flavanoles, antocianidinas, flavanonas e isoflavonas. Por lo general, los flavonoides no aparecen en forma libre en las plantas, sino que suelen estar ligados a azúcares o incluso a algunos ácidos. Los flavonoides son muy comunes en las frutas y verduras destacando su elevada concentración en la cebolla, el brócoli, el puerro y los arándanos. También son especialmente abundantes en el té y en el vino tinto (hasta 45 mg flavonoides/L de vino tinto). Las olivas maduras contienen antocianidinas, que no están presentes en el aceite por su insolubilidad.

También han sido identificados en el aceite y la oliva algunos lignanos, compuestos formados por 2 unidades fenilpropanoides unidas mediante puentes de hidrógeno (Figura 9). Son monómeros y dímeros del ácido hidroxicinámico y del alcohol cinámico (Chesson et al., 1997). Las principales fuentes de estos compuestos son los cereales así como plantas oleaginosas como el lino y el sésamo apareciendo en valores de trazas en vegetales y leguminosas. Los lignanos son compuestos que son metabolizados a enterodiol y enterolactona en el organismo debido a la actuación de la microflora intestinal. Estos compuestos aparecen posteriormente en el plasma y en la orina lo que demuestra su biodisponibilidad en el organismo (Heinonen et al., 2001). Los lignanos presentes en la oliva y en el aceite son el pinoresinol y el acetoxipinoresinol (Brenes et al., 2000).



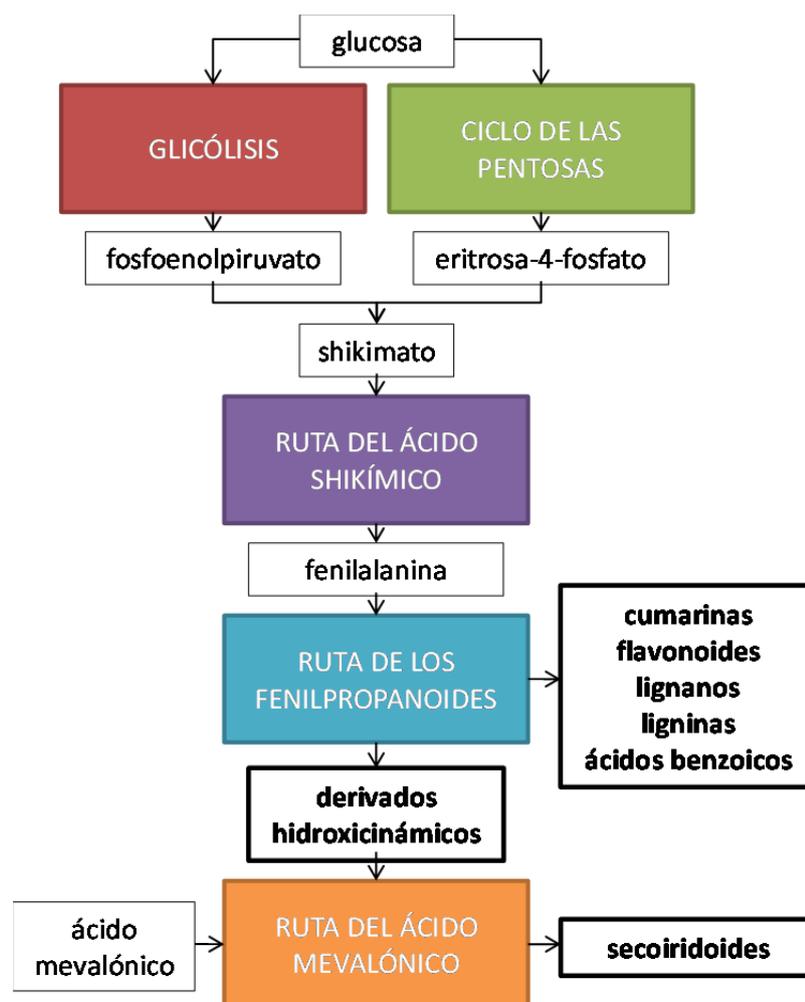
**Figura 8.** Estructura química básica de los flavonoides y sus principales subgrupos.



**Figura 9.** Estructura química básica de los lignanos.

#### 2.5.4. RUTAS DE BIOSÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS EN OLEÁCEAS

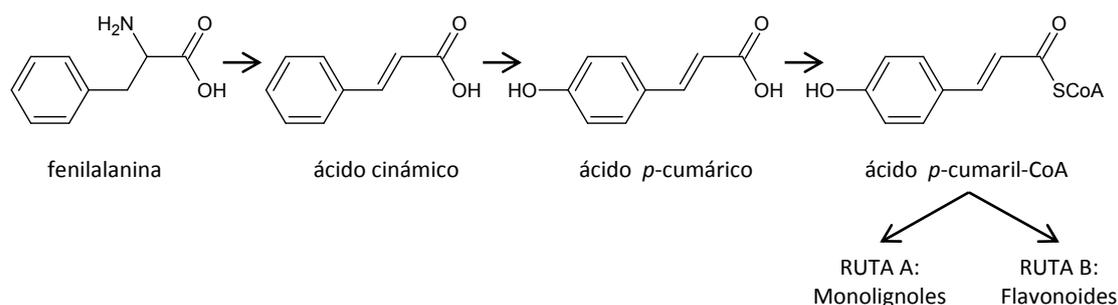
Las rutas biosintéticas de formación de los compuestos fenólicos se inicia con la *ruta del ácido shikímico*, que toma como precursores el fosfoenolpiruvato procedente de la glicólisis y la eritrosa-4-fosfato procedente del ciclo de las pentosas y da como resultado la fenilalanina. Esta fenilalanina entra en la *ruta de los fenilpropanoides*, dando lugar a una gran cantidad de compuestos fenólicos como cumarinas, flavonoides, lignanos, ácidos benzoicos y derivados hidroxicinámicos. Sin embargo, es necesaria la acción de otra ruta, la del *ácido mevalónico*, para que partiendo del ácido deoxilogánico e incorporando los derivados hidroxicinámicos, se formen los compuestos secoiridoides (Figura 10).



**Figura 10.** Rutas biosintéticas implicadas en la formación de los compuestos fenólicos.

#### 2.5.4.1. RUTA DE LOS FENILPROPANOIDES

En la Figura 11 se muestra en detalle la ruta de los fenilpropanoides, que ha sido bien documentada en algunos estudios (Dixon et al., 2002; La Camera et al., 2004; Noel et al., 2005). En la ruta, tres actuaciones enzimáticas transforman la fenilalanina en el tioester *p*-cumaril-CoA, a partir del cual se desencadenan dos rutas de biosíntesis de compuestos, monolignoles y flavonoides. Con la pérdida del grupo amino de la fenilalanina por acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), se forma el ácido cinámico, la estructura básica de los fenilpropanoides. La enzima cinamato-4-hidroxilasa (C4H) cataliza la introducción de un grupo hidroxilo en la posición *para* del anillo aromático del ácido cinámico, produciendo ácido *p*-cumárico. El grupo carboxilo del ácido *p*-cumárico es entonces activado con la formación de un enlace tioester con CoA, un proceso catalizado por la enzima *p*-cumaril:CoA ligasa (4CL). A partir del ácido *p*-cumaril-CoA, se forman dos tipos de compuestos: los monolignoles (Ruta A) y los flavonoides (Ruta B).



**Figura 11.** Ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides

A partir del compuesto ácido *p*-cumaril-CoA se sintetizan los monolignoles (Figura 12), que son los componentes de la lignina y precursores de los lignanos. Brevemente, los monómeros de la lignina son derivados del alcohol *p*-cumarílico, al alcohol coniferílico y del alcohol sinápico. A partir de la molécula de *p*-cumaril-CoA, se desarrolla una ruta compleja con multitud de compuestos. El resultado es la síntesis de los tres monolignoles, los alcoholes sinápico, coniferílico y *p*-cumarílico. Estos derivan de los ésteres del ácido sinápico, del ácido ferúlico y del ácido *p*-cumárico con CoA (formados con la ayuda de la enzima 4-cumarato:CoA ligasa (4CL)), que son reducidos en dos pasos catalizados por las enzimas cinamil-CoA reductasa (CCR) y cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD). Para la metoxilación del ácido *p*-cumárico a los ácidos ferúlico y sinápico, se requiere una secuencia de reacciones de las enzimas ácido cafeico *O*-metiltransferasa (COMT) y ácido ferúlico 5-hidroxilasa (F5H).

La biosíntesis de lignanos empieza con la unión de dos moléculas de alcohol coniferílico, formándose el pinosresinol. Este compuesto es la estructura básica a partir de la cual se forman el resto de lignanos, que se caracterizan por ser moléculas formadas por la unión de dos unidades C<sub>6</sub>C<sub>3</sub> mediante un enlace 8-8'.

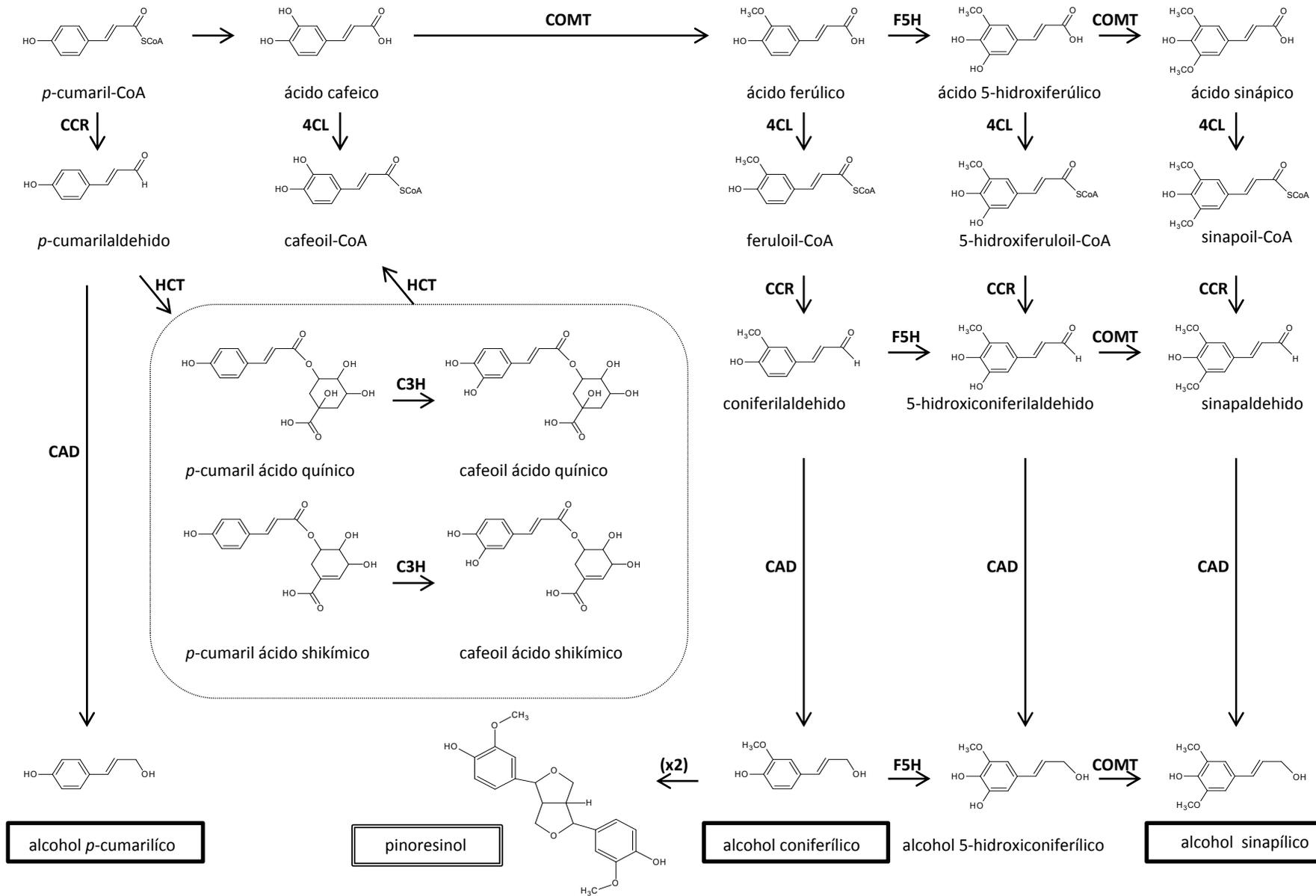
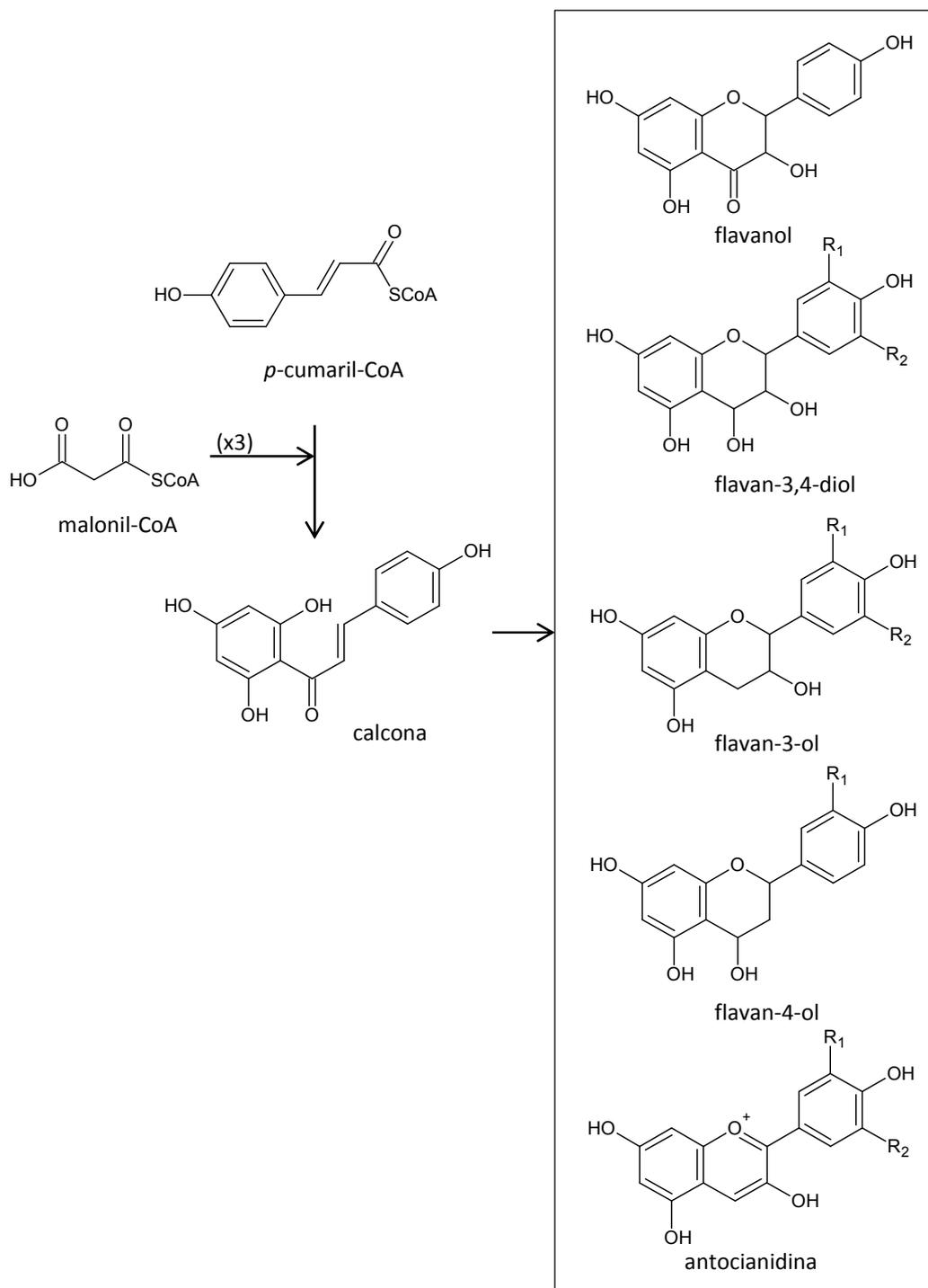


Figura 12. Biosíntesis de los fenilpropanoides: biosíntesis de los monolignoles (Ruta A).

A partir de la misma ruta de los fenilpropanoides, se forman los flavonoides (Figura 13). Los flavonoides son derivados de la calcona, que es sintetizada por la enzima calcona sintasa (CHS) a partir de una molécula de *p*-cumaril-CoA con tres moléculas de malonil-CoA. Después de la acción de la CHS, un conjunto de isomerasas, reductasas, hidroxilasas, glicosiltransferasas y aciltransferasas actúan sobre la estructura básica de los flavonoides, la calcona, dando lugar a la gran variedad de flavonoides existentes.



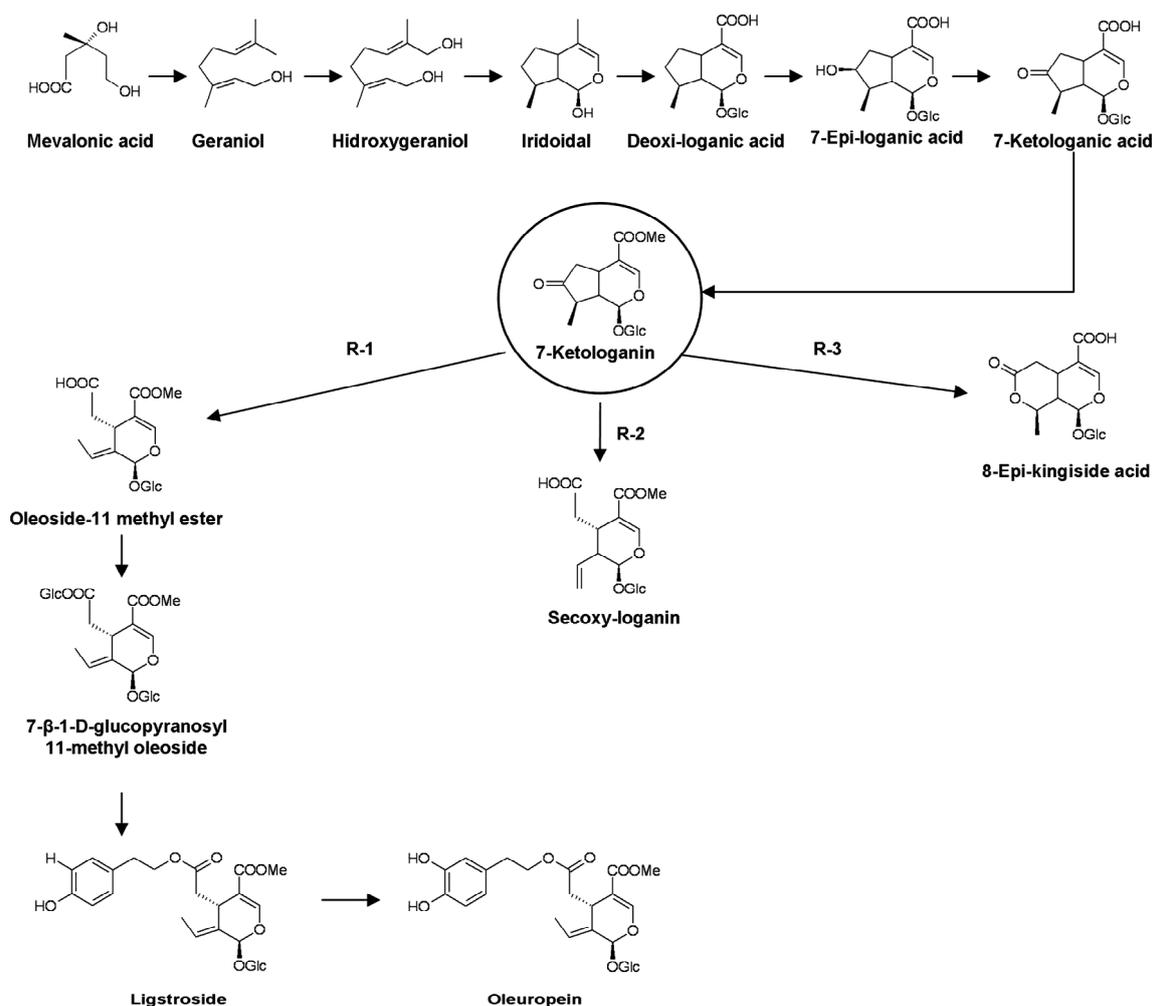
**Figura 13.** Biosíntesis de los fenilpropanoides: biosíntesis de los flavonoides (Ruta B).

#### 2.5.4.2. RUTA DEL ÁCIDO MEVALÓNICO

Mientras los ácidos fenólicos, los fenoles simples, flavonoides, lignanos, etc. se encuentran en muchos vegetales pertenecientes a diferentes familias botánicas, los secoiridoides son compuestos propios de la familia *Oleaceae*.

La biosíntesis de la oleuropeína y el ligustrósido, los compuestos secoiridoides mayoritarios en la oliva, es compleja y aun no dilucidada completamente (Ryan et al., 2002b). El uso de precursores radiomarcados en los estudios metabólicos no es del todo adecuado por sus impredecibles ratios de incorporación, pero continúa siendo uno de los métodos más utilizados para la elucidación de rutas bioquímicas y funciones metabólicas en plantas y frutos. Así, estudios llevados a cabo por Inouye et al. (1971, 1974), en los que intentaron establecer el papel de compuestos como el ácido deoxilogánico o la loganina en la formación de compuestos secoiridoides mediante este método, fueron rebatidos posteriormente por Damtoft et al. (1993), debido al bajo porcentaje de incorporación del marcador. Los experimentos en rutas de biosíntesis en *O. europea* L. están influenciados por el hecho que esta especie posee una baja tasa de absorción de agua en hidroponía y la presencia de los secoiridoides, lo que causa una gran dispersión del radiomarcador incorporado (Damtoft et al., 1993). Esta es la razón por la que estos autores utilizaron en sus estudios posteriores otras oleáceas seleccionadas por sus aceptables niveles de absorción de agua (Damtoft et al., 1995a).

Los estudios de Damtoft et al. (1993, 1995a) propusieron que los secoiridoides son sintetizados a partir del ácido mevalónico en una compleja ruta metabólica (Figura 14). Mostraron que la ruta hacia el ácido desoxilogánico, el ácido 7-epi-logánico, el ácido 7-cetologánico y la 7-cetologanina podría ser la última etapa de formación de los precursores de los iridoides carbocíclicos, aunque esta secuencia variaría entre especies y dependería de la época del año. En el estudio de 1995 estudiaron, en fresno y lila, los compuestos análogos del ácido 8-epikingisídico, del ácido kingisídico, de secologanina, de secoxiloganina, secologanósido y de oleósido-11-metil ester como intermediarios en la biosíntesis de 7-cetologanina y los oleósidos. Ninguno de los derivados kingisídicos se incorporaron de una manera significativa y, en todos los casos, un alto porcentaje del precursor fue identificado. En cambio, se observó una incorporación significativa oleósido-11-metil ester en todos los iridoides, con excepción de secologanina y ácido 8-epikingisídico. La incorporación acumulada fue del 19%, lo que indica que de oleósido-11-metil ester es un compuesto mayoritario en la ruta de biosíntesis de los oleósidos. Los resultados también probaron que el compuesto 7-cetologanina es el precursor inmediato de oleósido-11-metil ester.



**Figura 14.** Ruta de biosíntesis de la oleuropeína propuesta por Damtoft et al. (1993, 1995a).

Estos autores probaron los posibles intermediarios en la biosíntesis de los compuestos secoiridoides, incluyendo la 7-cetologanina y el oleósido-11-metil ester, el compuesto a partir del cual se formarían la oleuropeína y otros compuestos similares en la familia de las oleáceas. Sin embargo, ni en las plantas seleccionadas en el estudio por sus buenas propiedades biosintéticas, ni los compuestos intermediarios tipo kingsídicos ni los de tipo secologanina fueron incorporados en un porcentaje significativo para considerarlos como intermediarios entre la 7-cetologanina y el oleósido-11-metil ester. Los autores concluyeron que es la 7-cetologanina el precursor inmediato del oleósido-11-metil ester y esto indica que la conversión se ajusta a una reacción de una sola etapa siguiendo una oxidación tipo Baeyer-Villiger, en la que el grupo cetona se oxidaría para obtener un ester, y daría lugar a tres procesos factibles (Figura 14). En la reacción R-3, sucedería solamente la oxidación del tipo Baeyer-Villiger, dando como producto el ácido 8-epi-kingsídico. En la R-1, después de la formación del ester, se produciría una ruptura del enlace entre los carbonos C7 y C8, la formación de un doble enlace entre los carbonos C8 y C9 y la abstracción de un H del C9, lo que daría lugar al oleósido-11-metil ester. Una reacción similar sucedería en la reacción R-2, aunque el doble enlace se formaría entre los carbonos C8 y C10, dando lugar a la secxiloganina.

Considerando que aparentemente no existe ningún compuesto entre la 7-cetologanina y el oleósido-11-metil ester, la biosíntesis de los oleósidos sería análoga a la conversión aceptada actualmente de loganina a secologanina. Ambas reacciones incluirían la ruptura del anillo ciclopentano, aunque la ruta hacia los oleósidos empezaría en un nivel más alto de oxidación. Consecuentemente, los compuestos producto de esta reacción estarían más oxidados. En los estudios de Damtoft et al. (1993, 1995b), después del primer día, se detectaron incorporaciones significativas de oleósido-11-metil ester al 7- $\beta$ -1-D-glucopiranosil-11-metil oleósido y al ligustrósido en la lila, aunque muy poca cantidad se convirtió en oleuropeína. A los 2 días, se repitió el mismo patrón, y fue a los 3 días cuando se dio la incorporación más grande hacia oleuropeína. Este hecho demostraría que la conversión hacia oleuropeína es bastante lenta, que puede ser limitada por el transporte de los precursores dentro de la planta. También llevaría a pensar que la oleuropeína se forma a partir del ligustrósido por la hidroxilación del tirosol como última etapa, y por inferencia, se podría decir que la biosíntesis de oleuropeína necesita de tirosol y no de hidroxitirosol (Damtoft et al., 1993). Además, en este estudio se vio que el ligustrósido incorporaba 4 veces más ácido desoxilogánico marcado que la oleuropeína.

Así, con la observación de estos resultados se puede deducir que existe una conversión directa del 7-cetologanina a oleósido-11-metil ester, seguido por una conversión hacia 7- $\beta$ -1-D-glucopiranosil-11-metil oleósido, que a partir de la cuál con una esterificación con tirosol, se forma el ligustrósido, y finalmente por hidroxilación, se forma la oleuropeína (Figura 14).

#### **2.5.4.3. IMPLICACIÓN DE LA $\beta$ -GLUCOSIDASA EN EL METABOLISMO DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS**

En el reino vegetal, los hidratos de carbono son los compuestos orgánicos más abundantes que intervienen en diversas funciones fisiológicas de la célula, como funciones estructurales o de reserva. Esta diversidad estructural y funcional, junto al hecho que prácticamente cualquier tipo de molécula (proteínas, lípidos, ácidos nucleicos) pueda ser glicosilada, implica la existencia de un amplio espectro de enzimas vinculadas al metabolismo de carbohidratos y de moléculas glicosiladas, tanto en su síntesis, modificación como hidrólisis. Dentro del grupo de enzimas encargadas de la hidrólisis, las glicosilhidrolasas, se encuentran las  $\beta$ -glucosidasas ( $\beta$ -D-glucósido glucohidrolasas), que son aquellas que catalizan específicamente la hidrólisis del enlace  $\beta$ -glucosídico entre dos azúcares, o entre una molécula de glucosa y una aglicona o resto no azucarado, arilo o alquilo.

Dentro de las variadas funciones biológicas asignadas a las  $\beta$ -glucosidasas en las plantas, se destacan cuatro: (i) la formación de compuestos intermediarios en el proceso de lignificación de la pared celular, (ii) la degradación de la pared celular en procesos fisiológicos concretos como la germinación de la semilla, (iii) la activación de fitohormonas, (iv) la activación de compuestos químicos procedentes del metabolismo secundario que intervienen en

mecanismos de defensa de la planta (Morant et al., 2008). La última función mencionada es la más estudiada en el ámbito de la alimentación, ya que muchos metabolitos secundarios, como los compuestos fenólicos, tienen una gran repercusión en las sensaciones olfato gustativas de alimentos de origen vegetal, tales como los zumos, el vino o el aceite de oliva (Günata, 2003).

En el desarrollo del fruto del olivo, se distinguen normalmente tres fases: la fase de crecimiento del fruto, que es donde se da la acumulación de oleuropeína; la fase de maduración verde, que coincide con una reducción de las concentraciones en clorofilas y oleuropeína; y la fase de maduración negra, que se caracteriza por la aparición de antocianinas y durante la cual, la concentración de oleuropeína sigue disminuyendo (Amiot et al., 1989; Malik y Bradford, 2006; Ryan et al., 1999a). Por tanto, la oleuropeína es muy abundante en los primeros estadios de la formación del fruto, llegando hasta a un 14% de la materia seca en frutos jóvenes (Amiot et al., 1986). Sin embargo, con la maduración esta concentración disminuye y la concentración de compuestos derivados de ella aumenta. Este hecho ha sido atribuido a su hidrólisis enzimática (Amiot et al., 1989; Gariboldi et al., 1986;), además de a las actividades glucosidasa y esterasa.

Hay pocos trabajos centrados en la actividad  $\beta$ -glucosidasa del fruto del olivo. Sin embargo, en los últimos años, se ha intentado dilucidar la función de la enzima en el fruto del olivo, así como su localización. Briante et al. (2002) identificaron la actividad  $\beta$ -glucosidásica en frutos del olivo de dos variedades italianas, y observaron que contribuye a la degradación de la oleuropeína del fruto. Mazzuca et al. (2006) localizaron por primera vez *in situ* la enzima en el mesocarpo de la oliva durante el ciclo de maduración. Con este estudio vieron que la enzima y la oleuropeína se encuentran en compartimentos diferentes dentro de la célula. Por ello, cuando el fruto es verde, esta oleuropeína se mantiene intacta en la célula y de esta manera el fruto mantiene el amargor. Sin embargo, cuando el fruto madura, las estructuras de las células se dañan debido a la senescencia de los tejidos, lo que permite que se pongan en contacto la  $\beta$ -glucosidasa con la oleuropeína, se produzca la hidrólisis y el amargor disminuya. Esta hidrólisis de la oleuropeína continúa durante la maduración negra hasta que el sustrato está completamente hidrolizado y la enzima ya no se expresa. Siguiendo en la misma línea, Spadafora et al. (2008) estudiaron si la  $\beta$ -glucosidasa podría ser un agente de defensa ante ataques de plagas al fruto del olivo. Para ello, pincharon los frutos simulando ser la picadura de la mosca del olivo (*Bactrocera oleae*) y observaron que la actividad  $\beta$ -glucosidásica aumentaba en la zona de la herida. Hicieron la misma prueba en dos variedades de olivo: en la variedad susceptible al ataque del insecto, la concentración de la oleuropeína se mantuvo, mientras que en la variedad poco susceptible, la concentración de oleuropeína disminuyó bruscamente. Esto reafirmaba un estudio de Konno et al. (1999), en el que se vio que en las células de las hojas del aligustre, a pesar de que la oleuropeína y la  $\beta$ -glucosidasa se encontraban en compartimentos diferentes de la célula, ante el ataque de un herbívoro o patógeno, el

compuesto fenólico y la enzima se ponían en contacto, y ésta última la hidrolizaba formándose un compuesto que desnaturalizaría las proteínas de los agentes dañinos.

La enzima  $\beta$ -glucosidasa de la oliva presenta especificidad. Recientemente, en un estudio de Romero-Segura et al. (2009) han extraído y purificado la enzima  $\beta$ -glucosidasa de frutos maduros de *Olea europaea* cv. *Picual* y han estudiado su acción frente a diversos sustratos: dos sustratos comerciales y siete compuestos fenólicos propios de la oliva (oleuropeína, demetiloleuropeína, ligustrósido, verbascósido, rutina, apigenina-7-glucósido y luteolina-7-glucósido). Los autores vieron que el compuesto glucosilado por el que tenía una mayor afinidad y mostraba mayor actividad era la oleuropeína. Esta alta especificidad también había sido observada en el trabajo de Konno et al. (1999).

Durante el proceso de elaboración del aceite, sobre todo en las etapas de molido y batido, es cuando el fruto sufre una mayor rotura. Si como se ha dicho, los compuestos fenólicos y las enzimas  $\beta$ -glucosidasas se encuentran en compartimentos diferentes de la célula, con la rotura de los frutos, enzimas y sustratos se ponen en contacto. En este caso, la oleuropeína, la demetiloleuropeína y el ligustrósido, que están presentes en el fruto, son hidrolizados por acción de las  $\beta$ -glucosidasas endógenas, que los transforman en compuestos secoiridoides agliconas, como 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA, *p*-HPEA-EDA y *p*-HPEA-EA (Bianco et al., 1999; Gómez-Rico et al., 2009b; González-Pombo et al., 2008; Servili et al., 2004). También durante estas fases de extracción del aceite, juegan un papel importante las enzimas oxidoreductasas, que promueven la oxidación de los compuestos fenólicos (Servili et al., 2008) y la enzima esterasa (Briante et al., 2002; Fernández-Bolaños et al., 1995; Segovia-Bravo et al., 2009). La esterasa hidroliza los enlaces ester de oleuropeína, produciendo hidroxitirosol y oleósido-11-metil ester (Capozzi et al., 2000).

En este sentido, está claro que la presencia de compuestos fenólicos en el aceite de oliva virgen está directamente relacionada con el contenido de compuestos fenólicos glucosilados contenidos inicialmente en los tejidos de la oliva y con la actividad de las enzimas hidrolíticas y oxidativas (García-Rodríguez et al., 2011).

No obstante, a pesar de que pocos temas de la química y bioquímica de las plantas han merecido tanto estudio como la biosíntesis de los compuestos fenólicos, especialmente de los flavonoides, todavía el estudio de las rutas biosintéticas de algunos compuestos fenólicos sigue siendo muy complejo (Andersen y Markham, 2006; Bohm, 1998). Una ruta biosintética perfectamente definida debería, al menos teóricamente, producir un producto final sin acumulación de productos intermedios. Sin embargo, se sabe por la experiencia que en las rutas metabólicas en las plantas la acumulación de productos intermedios puede ser más la regla que la excepción. No es difícil imaginar circunstancias en las que un intermediario pueda ser utilizado por la planta para alguna otra función diferente a la formar el siguiente metabolito. Siguiendo con esta línea, parece razonable especular que el conjunto de

condiciones metabólicas que conducen a la acumulación podría ser mantenido mientras beneficie al organismo. Además es destacable el efecto que los factores externos ejercen en la composición fenólica, a través de la modulación de actividades enzimáticas, degradación de compuestos o expresión de determinados genes, dificultando todavía más los estudios.

## **2.6. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN FENÓLICA Y PIGMENTARIA DEL FRUTO Y DEL ACEITE**

La composición del aceite es el resultante de una serie de interacciones entre factores genéticos, ambientales y tecnológicos que marcan tanto la fase de desarrollo y de maduración del fruto como su transformación (Montedoro y Servili, 1991).

Respecto a la composición fenólica, existe mucha variación en la composición y concentración de compuestos fenólicos entre aceites de oliva virgen (Gimeno et al., 2002). El rango de concentración en fenoles en aceites de oliva virgen es muy amplio, lo que hace que la comparación entre estudios sea difícil (Baccouri et al., 2007, Tripoli et al., 2005). Estas discrepancias están parcialmente explicadas por múltiples factores que tienen la capacidad de modificar las concentraciones de fenoles en el aceite de oliva virgen (Carrasco-Pancorbo et al., 2005). De igual manera, en el caso del perfil pigmentario de un aceite y su concentración, se ha visto que varía mucho según factores tanto intrínsecos como extrínsecos de la oliva.

En los siguientes apartados, se va a evaluar cuáles son estos factores y cómo influyen en el perfil pigmentario y fenólico de los aceites de oliva.

### **2.6.1. INFLUENCIA DE LA VARIEDAD DE LA OLIVA**

La composición del aceite de oliva, como producto del metabolismo del olivo, está fuertemente afectada por la variedad. Las diferencias en cuanto al color del fruto, tamaño y rendimiento en aceite han determinado durante siglos la selección de las diferentes variedades de la oliva. Esta diferencia entre variedades también se hace patente en los componentes minoritarios, como los pigmentos y los fenoles.

La composición en pigmentos clorofílicos de las olivas depende, tanto cualitativa como cuantitativamente, de la constitución genética del fruto. Esto ha sido evidenciado por algunos trabajos en los que se ha estudiado la composición pigmentaria en frutos con el mismo grado de madurez pero de variedades diferentes, y se ha observado que existe una leve relación entre el color de la piel del fruto y la composición pigmentaria (Gandul-Rojas et al., 1999; Mínguez-Mosquera y Gallardo-Guerrero, 1995; Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández, 1989; Roca y Mínguez-Mosquera, 2001b).

El tipo de pigmentos presentes en los frutos del olivo, y sobre todo su contenido, es inherente a la variedad. Han sido realizados varios estudios para determinar el contenido pigmentario en

frutos de diferentes variedades. Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández (1989) estudiaron el perfil pigmentario en frutos de las variedades *Hojiblanca* y *Manzanilla*, y observaron que los frutos de *Hojiblanca* eran más pigmentados que los de *Manzanilla*, aunque a nivel cualitativo, no había diferencias. Sin embargo, Gandul-Rojas et al. (1999), en un estudio en frutos de la variedad *Arbequina*, pusieron de manifiesto la presencia de pigmentos exclusivos que no habían estado detectados en otras variedades, las xantofilas esterificadas, clorofilas a y b y  $\alpha$ -caroteno (Criado et al., 2007a; Mínguez-Mosquera y Gallardo-Guerrero, 1995; Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández, 1989). Otra particularidad de la variedad *Arbequina* es que al principio de la maduración, presenta una fase de carotenogénesis. Esto fue observado por primera vez en un estudio de Roca y Mínguez-Mosquera (2001a) en la que la concentración de carotenoides en *Arbequina* se incrementó o se mantuvo en comparación con la variedad *Picual*, en la que el contenido en carotenoides disminuyó. Este hecho fue confirmado posteriormente por Roca y Mínguez-Mosquera (2003b) y Criado et al. (2007a), en que se volvió a observar la síntesis en carotenoides en frutos de la variedad *Arbequina*, que no se dio en las variedades *Hojiblanca*, *Picual* y *Farga*. Recientemente, Roca et al. (2011) han caracterizado el contenido en clorofilas y carotenoides de frutos y aceites de la variedad *Sikitita*, que es una nueva variedad conseguida del cruce de las variedades *Arbequina* y *Hojiblanca* y han determinado que esta variedad es de baja pigmentación y presenta xantofilas esterificadas y carotenogénesis, todas ellas características heredadas de la variedad *Arbequina*.

Aparicio-Ruiz et al. (2009) estudiaron el perfil pigmentario en frutos de dos variedades italianas, *Coratina* y *Frantoio*, y una griega, *Koroneiki*, y observaron que los ratios clorofilas/carotenoides y clorofila a/clorofila b podrían usarse como parámetros para la identificación varietal.

Más abundantes han sido los estudios para caracterizar aceites de diferentes variedades de oliva. En aceites de variedades españolas, se han estudiado los perfiles pigmentarios de los aceites de las variedades *Arbequina*, *Blanqueta*, *Cornicabra*, *Farga*, *Hojiblanca*, *Marteña*, *Nevadillo*, *Pajarero*, *Picual*, *Picudo*, *Sikitita* y *Subbética* (Criado et al., 2007a; Gallardo-Guerrero et al., 2005; Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera, 1996a; Mínguez-Mosquera et al., 1992; Roca et al., 2011).

Mínguez-Mosquera et al. (1992) estudiaron el perfil pigmentario de cinco aceites de oliva monovarietales (*Picual*, *Picudo*, *Subbética*, *Hojiblanca* y *Pajarero*). Entre estas variedades, observaron diferencias en el contenido total de pigmentos, siendo los aceites de la variedad *Picual* los más pigmentados, con 37.6 mg de pigmentos/kg aceite. A nivel cualitativo, feofitina a y luteína fueron los pigmentos mayoritarios en la fracción clorofílica y carotenoide, respectivamente, en todas las variedades.

Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera (1996a) estudiaron la composición en pigmentos de aceites monovarietales de las variedades *Nevadillo*, *Hojiblanca*, *Marteña*, *Pajarero*, *Picual*, *Arbequina* y

*Cornicabra*. Los aceites más pigmentados fueron los de las variedades *Hojiblanca* y *Picual*, con 21.0 y 37.7 mg de pigmentos/kg aceite, respectivamente.

Posteriormente, Gandul-Rojas et al. (2000) estudiaron el perfil pigmentario de cincuenta aceites monovarietales procedentes de seis variedades diferentes. En este estudio pusieron de manifiesto que el porcentaje de luteína y el de violaxanteno, además del contenido total en pigmentos, pueden usarse como criterios taxonómicos diferenciales de las variedades. Además, volvieron a observar que los aceites de las variedades *Picual* y *Hojiblanca* eran más pigmentados que los de las variedades *Arbequina*, *Blanqueta* y *Cornicabra*, lo que después fue nuevamente observado por Gallardo-Guerrero et al. (2005).

Criado et al. (2008) caracterizaron el perfil de pigmentos de los aceites de la variedad *Arbequina* de la zona de Les Garrigues (Lleida) durante dos campañas consecutivas. El contenido medio en pigmentos de los aceites fue 6.17 mg de pigmentos/kg aceite en la campaña 2002/2003 y 9.88 mg de pigmentos/kg aceite en la campaña 2003/2004.

En aceites de variedades no españolas, los estudios en perfil pigmentario son bastante recientes. Se han estudiado los perfiles de aceites de las variedades *Arno*, *Baddarica*, *Basento*, *Biancolilla*, *Calabrese*, *Coratina*, *Dolce Agogia*, *Frantoio*, *Gentile di Larino*, *Ghiacciolo*, *Giarraffa*, *Koroneiki*, *Leccino*, *Minuta*, *Moraiolo*, *Noccioluta*, *Nocellara del Belice*, *Ogliarola*, *Oliva Nera de Collecorto*, *Ottobratica*, *Sant'Agatese* y *Tevere* (Aparicio-Ruiz et al., 2009; Cerretani et al., 2008; Giuffrida et al., 2011; Ranalli et al., 2011). En todos estos estudios, se ha comprobado la existencia de diferencias tanto cualitativas como cuantitativas entre aceites de las distintas variedades.

En cuanto a la fracción fenólica se destaca el considerable número de trabajos publicados en los últimos años, en los que se relacionan factores agronómicos y tecnológicos con el perfil fenólico y la concentración de cada uno de los compuestos. La variedad de la oliva afecta cualitativa y cuantitativamente a la composición fenólica del fruto y la de su correspondiente aceite. Varios han sido los estudios que se han llevado a cabo para describir los perfiles fenólicos de diferentes variedades en frutos (Briante et al., 2002; Esti et al., 1998; Gómez-Rico et al., 2008; Morelló et al., 2004; Romani et al., 1999; Vinha et al., 2005;). Los perfiles fenólicos muestran que la oleuropeína es el compuesto más abundante en casi todas las variedades de oliva, con concentraciones entre 35 y 2400 mg/kg fruto (Romani et al., 1999). Sin embargo, hay algunos compuestos que se han propuesto como identificadores varietales porque no son comunes a todas las variedades. Este es el caso de demetiloleuropeína, que fue cuantificada sólo en dos (*Coratina* y *Leccino*) de ocho variedades italianas analizadas por Esti et al. (1998), en dos (*Cailletier* y *L11*) de once variedades francesas estudiadas por Amiot et al. (1989) y en una (*Arbequina*) de seis variedades españolas estudiadas por Gómez-Rico et al. (2008).

En la mayoría de los aceites de oliva, los derivados secoiridoides de oleuropeína y ligustrósido son los compuestos fenólicos mayoritarios (Mulinacci et al., 2005; Pinelli et al., 2003). Respecto a la proporción de compuestos de un origen u otro, Gómez-Rico et al. (2008) demostró que pueden existir diferencias varietales, ya que en los aceites de las variedades *Arbequina*, *Cornicabra*, *Picolimón* y *Picual* se encontraban en mayor concentración los fenoles derivados de oleuropeína que los fenoles derivados del ligustrósido, mientras que sucedía lo contrario en los aceites de las variedades *Morisca* y *Picudo*.

Gómez-Alonso et al. (2002) llevaron a cabo un estudio sobre si el efecto de la variedad en la composición del perfil fenólico de los aceites podía ser utilizado como herramienta para clasificar los aceites según su variedad. Esto ya se había sugerido en estudios previos (Brenes et al., 1999; García et al., 2001; Graciani y Vázquez-Roncero, 1981; Mateos et al., 2001), pero hasta el de Gómez-Alonso et al. (2002) no se habían publicado datos para confirmar la viabilidad de esta propuesta. Para ello, analizaron el perfil fenólico de aceite comercial de la variedad *Cornicabra* durante cinco campañas oleícolas, junto con los perfiles de aceites de las variedades *Arbequina*, *Hojiblanca* y *Picual*. Tras el estudio estadístico de los datos obtenidos, afirmaron que los compuestos fenólicos que serían más útiles para la clasificación entre variedades serían acetoxipinoresinol (que eluía junto con el ácido cinámico), 3,4-DHPEA-AC, *p*-HPEA-EA y *p*-HPEA-EDA.

En los últimos años, continúa publicándose trabajos sobre la caracterización de los perfiles fenólicos de aceites de oliva de las diferentes variedades existentes. Por ejemplo, en aceites de variedades españolas, se han caracterizado los perfiles de *Arbequina*, *Cornicabra*, *Farga*, *Hojiblanca*, *Lechín*, *Manzanilla*, *Morrut*, *Picual*, *Picuda* y *Verdial*, entre otros (Andjelkovic et al., 2008; Brenes et al., 1999; Carrasco-Pancorbo et al., 2006; Criado et al., 2004; García et al., 2002; Gómez-Rico et al., 2006; Morelló et al., 2004; Oliveras-López et al., 2007). En aceites de variedades no españolas, los de las variedades *Aglandau*, *Arno*, *Basento*, *Cobrançosa*, *Coratina*, *Cordovil de Castelo*, *Frantoio*, *Galega*, *Hardy's Mammoth*, *Leccino*, *Madural*, *Seggianese*, *Taggiasca*, *Tanche*, *Tevere*, *Transmontana* y *Verdeal*, entre otros (Aguilera et al., 2005; Andjelkovic et al., 2008; Caponio et al., 1999; Loizzo et al., 2011; Oliveras-López et al., 2007; Ranalli et al., 2011; Vinha et al., 2005).

### **2.6.2. INFLUENCIA DEL GRADO DE MADUREZ DE LA OLIVA**

El grado de madurez de la oliva tiene gran importancia en la concentración tanto de fenoles como de pigmentos en los frutos del olivo, y por tanto, en el aceite. A medida que las olivas maduran, el color de la piel y la pulpa cambian desde el verde intenso pasando por los estados de verde claro, manchas rojizas, envero y violeta, hasta el negro (Roca y Mínguez-Mosquera, 2001b). Por tanto, aunque desde el punto de vista cualitativo, los compuestos clorofílicos y carotenoides no cambian al avanzar la maduración (Mínguez-Mosquera y Gallardo-Guerrero, 1995), sí se produce una disminución en la concentración de ellos, acompañada por un

incremento en la concentración de antocianos hacia el final de la maduración, independientemente de la variedad (Beltrán et al., 2005; Criado et al., 2007a; Roca y Mínguez-Mosquera, 2001b).

Desde el punto de vista cualitativo, todos los pigmentos presentes en el fruto, además de sus derivados formados durante la extracción del aceite debido al medio ácido generado, se transfieren al aceite, tal y como observaron Criado et al. (2007a) en un estudio sobre la transferencia de pigmentos clorofílicos y carotenoides en frutos y aceites de las variedades *Arbequina* y *Farga* en seis estados de maduración diferentes.

Roca y Mínguez-Mosquera (2001b) estudiaron el perfil pigmentario en frutos de cinco variedades (*Hojiblanca*, *Picual*, *Cornicabra*, *Blanqueta* y *Arbequina*) en seis estados de maduración diferentes, del verde intenso en frutos inmaduros al negro en frutos completamente maduros. En todas las variedades, el contenido en clorofilas a y b disminuyeron con la maduración, aunque a diferente velocidad según la variedad. Luteína fue el pigmento carotenoide mayoritario en todas las variedades y en todos los estados de maduración, representando más del 50% del contenido carotenoide en todos los casos. Su concentración disminuyó con la maduración, aunque de una manera más lenta que el resto de compuestos carotenoides ( $\beta$ -caroteno y xantofilas).

Cichelli y Pertesana (2004) estudiaron el contenido en pigmentos de 94 aceites durante 3 campañas, y evaluaron el efecto de la maduración fijando tres índices (olivas verdes, moradas y negras). Observaron que el aceite obtenido de olivas moradas contenía un 5% menos de pigmentos que el aceite obtenido de olivas verdes, mientras que el aceite extraído de olivas negras contenía casi un 30% menos pigmentos que el aceite obtenido de olivas verdes.

Respecto a los compuestos fenólicos, existe diferencia entre los compuestos que se encuentran en la oliva y lo que se encuentran en el aceite resultante de esta oliva. En el fruto, la oleuropeína es el compuesto fenólico mayoritario (Amiot et al., 1986; Servili et al., 1999), mientras que en el aceite, la actividad enzimática desarrollada en la extracción hace que los compuestos derivados de la oleuropeína sean los mayoritarios.

Con la maduración, el contenido en compuestos fenólicos en el fruto disminuye. Tras las primeras fases de la maduración, en las que la oleuropeína es el compuesto más abundante, su concentración empieza a disminuir, en términos generales, con el desarrollo fisiológico del fruto (Amiot et al., 1989; Ranalli et al., 2009a), hecho que puede estar relacionado con una mayor actividad de las enzimas hidrolíticas a medida que avanza la maduración (Amiot et al., 1989; Esti et al., 1998). Un estudio de Ortega-García y Peragón (2009) con frutos de las variedades *Picual*, *Arbequina*, *Verdial* y *Frantoio* sugiere que es posible la relación entre las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL) y polifenol oxidasa (PPO) y la concentración de fenoles a lo largo de la maduración. El nivel de actividad de PAL (que es la enzima que regula la

biosíntesis de los compuestos fenilpropanoides) disminuyó a la vez que disminuían los fenoles con la maduración, al contrario que el nivel de actividad de PPO (que es la enzima que lleva a cabo la degradación oxidativa de los compuestos fenólicos), ya que ésta aumentó con la maduración.

Parece evidente que los aceites procedentes de frutos verdes son más ricos en fenoles totales que los aceites procedentes de frutos negros; sin embargo, no es tan evidente la tendencia que siguen a lo largo del ciclo completo de la maduración (Beltrán et al., 2003; Sánchez-Casas et al., 1999). Algunos estudios han visto que durante el desarrollo del fruto, después de una disminución inicial del contenido de oleuropeína, en algunas variedades como *Picholine*, *Zrappola*, *Tanche*, *L365*, *Salonenque* (Amiot et al., 1986), *Manzanillo* (Ryan et al., 1999a), *Arbequina* y *Morrut* (Morelló et al., 2004) existe una segunda síntesis, para volver a disminuir nuevamente hasta el final de la maduración.

Gómez-Rico et al. (2008) compararon los compuestos fenólicos de los frutos y aceites de las variedades *Arbequina*, *Cornicabra*, *Morisca*, *Picolimón*, *Picudo* y *Picual* a tres índices de maduración diferentes (verde, envero y negra). Observaron que la concentración del compuesto hidroxitirosol aumentó a medida que avanzaba la maduración en cuatro de las seis variedades analizadas. Este incremento se cree que podría ser resultado de la degradación de la oleuropeína, llevada a cabo por enzimas,  $\beta$ -glucosidasa entre ellas, que hidroliza la oleuropeína a oleuropeína aglicona y 3,4-DHPEA-EDA (Limiroli et al., 1995). En este mismo estudio también observaron que dos flavonoides, rutina y luteolina-7-glucósido, también incrementaban su concentración durante la maduración. Este hecho ya había sido observado anteriormente en las variedades *Coratina* y *Leccino* por Esti et al. (1998).

Hacia el final de la maduración, cuando la piel del fruto es negra, la disminución en el contenido de oleuropeína es muy rápida (Limiroli et al., 1995) e incluso la concentración tiende a cero cuando el fruto es completamente negro, tal y como determinaron Bianco et al. (1993) en frutos de la variedad *Leccino*. Esta disminución en oleuropeína coincide con un incremento en el contenido de antocianos, que son cianidinas unidas a azúcares. En los estudios de Gómez-Rico et al. (2008) y Vinha et al. (2005), en que se estudiaron frutos de varias variedades de olivas españolas y portuguesas, respectivamente, se cuantificaron cianidina-3-*O*-rutinósido y cianidina-3-*O*-glucósido cuando los frutos estaban en la maduración negra.

### **2.6.3. INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES**

Las características del suelo y las condiciones climáticas de las zonas de cultivo pueden afectar considerablemente el contenido en pigmentos y fenoles de las olivas, ya que ejercen una gran influencia en el crecimiento del fruto y su maduración (Jacoboni et al., 1999).

Psomiadou y Tsimidou (2001) compararon el contenido pigmentario de aceites de la variedad *Koroneiki* producidos en dos zonas diferentes de Grecia (Creta y Peloponeso), y detectaron que

los aceites de Creta tenían una mayor concentración en feofitina a, probablemente debido a diferencias en el régimen de precipitaciones y horas de sol entre las dos zonas geográficas.

En un estudio de Romero et al. (2003), compararon el contenido en pigmentos de aceites de la variedad *Arbequina* de la DOP Les Garrigues durante 4 campañas consecutivas. Observaron que el contenido en clorofilas fue mucho menor en la campaña 1999/2000, probablemente debido a las bajas temperaturas registradas en la zona a finales de 1999, que podrían haber dañado los frutos, y como consecuencia, provocado la degradación de los pigmentos.

Criado et al. (2004) estudiaron el perfil pigmentario de aceites de la variedad *Arbequina* procedentes de árboles cultivados en tres zonas de España con condiciones climáticas diferentes (Lleida, Tarragona y Jaén) tomando las muestras en las mismas fechas. Aunque cualitativamente la mayoría de los pigmentos determinados en los aceites de las tres zonas fueron los mismos, no se detectaron xantofilas esterificadas en los aceites de Tarragona ni feofitina b en los de Lleida. Además, observaron que los aceites de Lleida tenían una mayor proporción de clorofila a que clorofila b, siendo el ratio clorofila a/ clorofila b de 9, mientras que en los aceites de Jaén y Tarragona era de 0.6, lo que podría ser debido a diferencias en el aparato fotosintético de las olivas cultivadas en las diferentes zonas. También encontraron diferencias en el ratio luteína/ $\beta$ -caroteno, que tuvo un valor en torno a 5 en los aceites de Tarragona y Jaén, y un valor de 12 en los de Lleida. En un estudio posterior, Criado et al. (2008) estudiaron aceites de la misma variedad *Arbequina* durante dos campañas consecutivas, 2002/2003 y 2003/2004, con condiciones climáticas diferentes. Observaron un menor contenido en pigmentos clorofílicos cuando las temperaturas fueron más bajas durante el periodo vegetativo del árbol.

Cerretani et al. (2008) evaluaron el efecto de las condiciones climáticas en el perfil pigmentario de aceites de seis variedades obtenidos en tres zonas de producción diferentes en Italia (Sicilia, Emilia-Romagna y Molise), y determinaron que las fracciones clorofílicas y carotenoides mostraron un mismo patrón independientemente de la variedad y de la zona de cultivo.

Existen algunos estudios sobre cómo afectan factores ambientales como el suelo, la altitud o la temperatura en el contenido de fenoles en los frutos del olivo. La influencia de la temperatura ha sido estudiada pero con resultados contradictorios. Un estudio de Ripa et al. (2008) afirma que a mayor cantidad de días con altas temperaturas acumulados desde la formación del fruto hasta su recolección, menor es la acumulación de fenoles. Sin embargo, Tura et al. (2008) concluye que la cantidad de fenoles en el fruto se incrementa a medida que aumenta el número de días con altas temperaturas.

También existen estudios del contenido fenólico en aceites provenientes de olivas que han sufrido temperaturas extremas. En un trabajo de Morelló et al. (2003) se determinó el contenido en pigmentos totales y el perfil fenólico de aceites de oliva de la variedad *Arbequina*

antes y después de una atípica helada ocurrida en diciembre de 2001. Después de esta helada, durante la cual se mantuvieron temperaturas máximas por debajo de los  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante 110 horas consecutivas, se observó una disminución del contenido en pigmentos totales de los aceites y los contenidos de los compuestos fenólicos 3,4-DHPEA-AC, 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA y 3,4-DHPEA-EA disminuyeron de forma muy notable. Se cree que la formación de cristales de hielo en el interior de las olivas podrían haber causado la rotura de los compartimentos celulares permitiendo así la puesta en contacto de la enzima polifenoloxidasas (PPO) con los sustratos fenólicos y las enzimas clorofilasa y lipoxigenasa con los sustratos pigmentos.

Romero et al. (2003) realizaron un estudio de efecto de la campaña en la composición de aceites de la variedad *Arbequina*, analizando 160 aceites durante cuatro campañas oleícolas consecutivas. Observaron que existe una relación entre el contenido fenólico y la pluviometría acumulada: en los años con baja pluviometría, el contenido en fenoles fue mayor, debido al mayor estrés hídrico al que se vio sometido el cultivo. Este efecto puede estar relacionado con la modificación de la actividad de la enzima PAL, que es la encargada de la síntesis de los compuestos fenólicos, la actividad de la cuál aumenta con el estrés hídrico (Gómez-Rico et al., 2007; Morelló et al., 2005a; Servili et al., 2007b).

Cimato et al. (1991) observaron que los aceites de oliva de las variedades *Frantoio*, *Leccino*, *Moraiolo* y *Coratina* cultivados en zonas costeras (altitud  $< 100\text{m}$ ) contenían el doble de fenoles totales que los cultivados a mayor altura. Mousa et al. (1996) también observaron una mayor cantidad de fenoles en aceites de la variedad *Mastoides* cultivados a  $100\text{m}$  que cultivados a  $800\text{m}$  en Grecia, y de igual manera, Criado et al. (2004) detectaron una mayor cantidad de fenoles en los frutos de *Arbequina* cultivados en la zona olivarera de Tarragona ( $300\text{-}400$  metros sobre la altura del mar) que los cultivados en Lleida o en Jaén ( $400\text{-}450$  y  $500\text{-}700$  metros sobre la altura del mar, respectivamente). También Osman et al. (1994) observaron una mayor cantidad de fenoles en los aceites de olivas de la variedad *Koroneiki* cultivadas a  $100$  metros de altura sobre el mar que a  $400$  metros en Grecia. Sin embargo, en los estudios llevados a cabo por Dabbou et al. (2010) e Issaoui et al. (2010) en las variedades *Sigoise*, *Chemlali* y *Chétoui* cultivadas en Túnez, se ha observado que a mayor altura de la plantación, mayor cantidad de fenoles en el fruto.

Respecto a la latitud, un estudio llevado a cabo por De Nino et al. (2005) señaló que los frutos de las variedades italianas *Carolea*, *Coratina* y *Frantoio* cultivadas a una menor latitud, contenían una mayor cantidad de oleuropeína.

El contenido en fenoles también está relacionado con el tipo de suelo de la plantación. En un estudio realizado por Montedoro et al. (1993b) obtuvieron una concentración mucho mayor de fenoles en aceites de olivas de la variedad *Moraiolo* cultivadas en suelos calcáreos que en suelos arcillosos. Por otra parte, Bucelli et al. (2011) determinaron un contenido en fenoles un

30% mayor en aceites de las variedades *Moraiolo* y *Frantoio* cultivados en suelos arcillosos que en suelos limosos. Esto se debe principalmente a la capacidad de retención de agua, que es diferente según la composición del suelo. En el caso del estudio de Bucelli et al. (2011), el suelo arcilloso mostró una menor capacidad de agua disponible, y el aceite procedente de sus frutos contuvo una mayor concentración de derivados secoiridoides, sobretodo 3,4-DHPEA-EA, 3,4-DHPEA-EDA y ácido elenólico.

Un trabajo de Benito et al. (2012), en que se ha estudiado la evolución de los fenoles en aceites procedentes de plantaciones de olivo de alta densidad, ha observado que tiene una mayor cantidad de compuestos fenólicos el aceite proveniente de olivos orientados hacia el norte que los orientados hacia el sur, probablemente debido a la mayor exposición al sol. Resultados similares fueron obtenidos por Palese et al. (2010).

#### **2.6.4. INFLUENCIA DE LOS FACTORES TECNOLÓGICOS**

La calidad del aceite de oliva virgen y algunos de sus compuestos químicos, entre ellos los compuestos fenólicos y pigmentarios, se ven afectados por los distintos métodos mecánicos utilizados para extraer el aceite presente en las aceitunas.

El proceso de extracción del aceite se compone de diferentes etapas: operaciones previas, molido de las olivas, batido y separación del aceite. Las operaciones previas incluyen el transporte desde el campo a la almazara y la limpieza de las olivas y su almacenamiento, si es necesario. Posteriormente, se produce la molienda de las olivas con el objetivo de romper los tejidos que las conforman y liberar así el aceite que contienen. Seguidamente, se realiza un batido de la pasta para facilitar la unión de las pequeñas gotas de aceite en gotas más grandes. Por último, para llevar a cabo la separación del aceite, el método más habitual es la centrifugación, aunque también existen métodos de extracción por presión o por extracción parcial. Después, el aceite puede ser filtrado y almacenado hasta el momento de su expedición.

A continuación se detallan varios trabajos en los que se ha estudiado el efecto que tienen algunos pasos del procesado del fruto para obtener el aceite sobre la concentración de fenoles y pigmentos de éste.

El almacenamiento de las olivas previo a la molturación, puede hacer disminuir el contenido fenólico de los aceites obtenidos a partir de ellas, debido a la acción de la luz, el oxígeno y las enzimas propias del fruto (Kiritsakis et al., 1998b; Mínguez-Mosquera et al., 1990; Yousfi et al., 2009).

Algunos estudios demuestran que se obtienen aceites con un mayor contenido fenólico y pigmentario si la molturación de las olivas se realiza con un molino de martillos en lugar de con un molino de piedras (Caponio et al., 2003; Di Giovacchino et al., 1994; Mailer y Ayton, 2004).

Durante el batido de la pasta, en general, se produce una disminución del contenido en fenoles en el aceite, principalmente 3,4-DHPEA-EDA y 3,4-DHPEA-EA, debido a la activación de PPO y POD por la rotura de los tejidos del fruto (Bianco et al., 2002; Gómez-Rico et al., 2009b). Gómez-Rico et al. (2009b) observaron que esta disminución es más importante cuando el batido es largo y a alta temperatura, pero que a su vez, cuando se aumentan estos dos parámetros, aumenta la concentración de *p*-HPEA-EDA, mientras que las concentraciones de verbascósido y flavonoides no se ven afectadas. El uso de microtalco natural en la batidora, un coadyuvante autorizado en la industria oleícola que facilita la separación de las fases agua y aceite, favorece la transferencia de pigmentos hacia el aceite, según un estudio de Criado et al. (2007b).

Para llevar a cabo la centrifugación, existen dos métodos básicos, dos fases y tres fases. Mientras el sistema de tres fases es capaz de separar los tres componentes de la pasta de oliva (aceite, alpechín y orujo), el dos fases, que es más moderno, separa el aceite del alperujo, que sería la mezcla del alpechín y el orujo. Varios estudios demuestran que mediante el sistema de dos fases se obtienen aceites con más fenoles que con el sistema de tres fases (Angerosa y Di Giovacchino, 1996; De Stefano et al., 1999; Gimeno et al., 2002), debido probablemente a que en el sistema de 2 fases no es necesario añadir tanta cantidad de agua como en el sistema de 3 fases. Otros estudios han comparado el efecto del sistema de tres fases con otro sistema de separación, la presión, y han comprobado que los aceites obtenidos mediante presión contienen más cantidad de fenoles (Di Giovacchino et al., 1994; Torres y Maestri, 2006) y más cantidad de pigmentos (Salvador et al., 2003; Torres y Maestri, 2006) que los separados por centrifugación.

En los últimos años, se están estudiando algunas modificaciones en el proceso de extracción con tal de mejorar la calidad del aceite. La inclusión de nitrógeno en la batidora, que evitaría así la oxidación por aireación de los compuestos durante este paso del proceso, ha demostrado conservar más cantidad de fenoles (Bianco et al., 2002; Iconomou et al., 2010; Servili et al., 1998; Servili et al., 2000; Yorulmaz et al., 2011) y de pigmentos (Del Caro et al., 2006; Yorulmaz et al., 2011). Otra opción estudiada es deshuesar las olivas como paso previo a la molturación y solo extraer el aceite de la pulpa. Con esta opción también se obtienen aceites con una mayor concentración de fenoles (Montedoro et al., 2007; Ranalli et al., 2009b; Ranalli y Contento, 2010; Yorulmaz et al., 2011), debido a que los huesos incluyen grandes cantidades de enzima  $\beta$ -glucosidasa y las semillas que contienen incluyen PPO y POD, todas ellas enzimas que contribuyen en la degradación de los compuestos fenólicos (Servili et al., 2007a). Sin embargo, la concentración en pigmentos clorofílicos y carotenoides en el aceite es menor (Ranalli et al., 2009b).

En la filtración del aceite, que puede realizarse a través de filtros más o menos porosos fabricados de diversos materiales como membranas comerciales, algodón o filtros de celulosa,

se ha visto que puede reducir el contenido fenólico y pigmentario del aceite (Bottino et al., 2008; Brenes et al., 2001; Fregapane et al., 2006; Tsimidou et al., 2005).

Algunos estudios se han llevado a cabo para evaluar el efecto del almacenaje del aceite acabado sobre su contenido pigmentario. Se ha observado que el contenido en pigmentos disminuye a lo largo del tiempo, que lo hacen de una manera más rápida las clorofilas que los carotenoides y que existe feofitización, es decir, si el aceite contenía clorofilas, éstas se van transformando en feofitinas con el tiempo (Anniva et al., 2006; Criado et al., 2008; Gallardo-Guerrero et al., 2005; Psomiadou y Tsimidou, 2002; Sacchi et al., 2008).

### **2.6.5. INFLUENCIA DE LAS PRÁCTICAS CULTURALES**

El conjunto de prácticas culturales llevadas a cabo durante el cultivo del árbol del olivo, cómo el riego, la densidad de plantación, el tipo de cultivo (ecológico o convencional) y la afectación por plagas, tienen gran importancia en la biosíntesis de pigmentos y fenoles en los frutos.

De entre los factores culturales, uno de los más estudiados es la aplicación del riego. El olivar es un cultivo adaptado a las condiciones de secano; sin embargo, se ha comprobado que las plantas con un riego de apoyo en la época de floración y formación del fruto, producen más que las que no lo tienen, ya que el estrés hídrico en estas fases puede reducir el rendimiento de los árboles (Palese et al., 2010).

Varios autores han estudiado la influencia del riego sobre la composición fenólica y pigmentaria de los frutos, y en consecuencia, en el contenido de los mismos en los aceites extraídos de ellos.

Motilva et al. (2000) estudiaron el efecto del riego deficitario controlado en una plantación de la variedad *Arbequina* sobre las características del aceite extraído de sus frutos. En el tratamiento control, los árboles se regaron según sus necesidades hídricas teóricas, mientras que en los demás árboles se redujo el aporte de agua requerido en un 75, 50 o 25% durante el periodo de parada vegetativa estival, desde el cuajado al endurecimiento de hueso. Observaron que los aceites procedentes de los tratamientos más deficitarios mostraban un mayor contenido en pigmentos que los aceites control en todos los estados de maduración estudiados, y que el contenido en pigmentos aumentaba con la reducción del aporte de agua al cultivo. De forma similar, Tovar et al. (2001a) estudiaron la aplicación de estrategias de riego lineal a olivos jóvenes de la variedad *Arbequina*, y observaron también una relación negativa entre la cantidad de agua de riego aportada al cultivo y el contenido en pigmentos cloroplásticos presentes en los aceites durante dos campañas consecutivas.

Sin embargo, los mismo autores, Tovar et al. (2002), llevaron a cabo un estudio aplicando las mismas condiciones que en el de Motilva et al. (2000) pero analizando los aceites solo obtenidos durante el periodo de recolección comercial durante tres campañas consecutivas, y

observaron que la cantidad de agua aportada al cultivo no influía significativamente en el contenido pigmentario de los aceites. Posteriormente, un estudio de Baccouri et al. (2008) en aceites de la variedad *Chétoui*, afirma que los aceites extraídos de olivas con irrigación tienen más clorofilas que los no irrigados, mientras que los pigmentos carotenoides están menos afectados por el aporte de agua.

Un estudio de Criado et al. (2007b), en que evaluaron el efecto del riego frente al no riego en el contenido pigmentario de los aceites de variedad *Arbequina*, observaron que el contenido total en pigmentos era mayor en los aceites obtenidos de frutos sin irrigación que en los irrigados. Estos resultados coincidieron con los de Tovar et al. (2001a), en cuyo estudio se atribuyó el menor contenido en pigmentos a diferencias en las propiedades de textura de la pasta, que podrían dar lugar a una menor extracción de pigmentos durante la trituración y el batido cuando la humedad del fruto es mayor. En el estudio más detallado de Criado et al. (2007b), en el que se estudiaron los pigmentos del fruto y del aceite y de los alperujos, se pudo demostrar que además de diferencias en el reparto de pigmentos entre aceite y subproductos, también existe una relación entre la cantidad de agua aplicada al árbol y la reducción de la capacidad biosintética de pigmentos cloroplásticos en los frutos, lo que se traduce en una baja concentración en el aceite.

Respecto a los compuestos fenólicos, la mayoría de estudios sobre la influencia de la aplicación de riego al cultivo con el contenido fenólico coinciden en afirmar que a mayor agua disponible para la planta, menor concentración de compuestos fenólicos (Baccouri et al., 2008; Ben-Gal et al., 2011; Berenguer et al., 2006; Mailer y Ayton, 2011; Motilva et al., 2000; Tovar et al., 2001a; Tovar et al., 2002; Servili et al., 2007b). De hecho, la actividad de una de las enzimas responsables de la biosíntesis de compuestos fenólicos, la PAL, presenta mayor actividad en condiciones de estrés hídrico (Morelló et al., 2005a). Además, el incremento de agua disponible produce un incremento en la humedad del fruto, y como los fenoles son altamente solubles en el agua, tienen una mayor afinidad para quedar retenidos en el alperujo durante el proceso de extracción que a transferirse al aceite (Rodis et al., 2002). Stefanoudaki et al. (2009) estudiaron el efecto del riego durante dos campañas oleícolas consecutivas en el perfil fenólico del aceite de la variedad *Koroneiki*. Observaron que los derivados de la oleuropeína 3,4-DHPEA-EDA y 3,4-DHPEA-EA se incrementaron en las condiciones de estrés hídrico, tal y como habían apuntado también Tovar et al. (2001b) en la variedad *Arbequina*, Gómez-Rico et al. (2006) en la variedad *Cornicabra* y Servili et al. (2007b) en la variedad *Leccino*.

Relacionado con la cantidad de agua disponible para el árbol, otro factor a tener en cuenta es la densidad de plantación. Guerfel et al. (2010) estudiaron el efecto de cuatro densidades de plantación diferentes (156, 100, 69 y 51 árboles/Ha) de olivos de la variedad *Chemlali* en Túnez. Observaron que el contenido fenólico se ve afectado por la densidad de plantación, y que los aceites que tuvieron un mayor contenido en fenoles totales (1059 mg/kg) debido sobretodo a

mayores concentraciones de los compuestos 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA, tirosol e hidroxitirosol, fueron los plantados a una densidad de 100 árboles/Ha.

La presencia de plagas en las olivas también afecta a la calidad del aceite obtenido a partir de ellas. La plaga más importante en el cultivo del olivar es la mosca del olivo (*Bactrocera oleae* (Gmel.)). El ataque de la mosca causa importantes pérdidas en el contenido fenólico de los aceites (Angerosa et al., 1992; Mraicha et al., 2010; Pereira et al., 2004), sobretodo en estados avanzados de maduración, en que la concentración en fenoles puede disminuir hasta un 50% respecto a los frutos sanos (Tamendjari et al., 2009). Las muestras con un mayor grado de ataque de mosca tienen un menor contenido en compuestos fenólicos, particularmente 3,4-DHPEA-EA y 3,4-DHPEA-EDA (Gómez-Caravaca et al., 2008).

Como grupo de prácticas culturales que influyen en la calidad del aceite de oliva, se puede considerar el cultivo ecológico. Debido a la importancia que tiene este apartado en el presente trabajo, se explica más detalladamente en el apartado 2.7.

## **2.7. PRODUCTOS ECOLÓGICOS FRENTE A PRODUCTOS CONVENCIONALES**

En los últimos años ha habido un incremento muy importante en el consumo de productos ecológicos. Los expertos en mercados argumentan que el incremento en la adquisición de alimentos ecológicos se apoya principalmente en tres razones:

a) Sensibilización hacia el respeto por medio ambiente. La agricultura dispone cada vez de una menor superficie de cultivo y ésta es menos fértil, debido principalmente a la ocupación del suelo para usos industriales y de servicios y a las agresiones causadas por el ser humano, como el vertido de sustancias tóxicas al medio. Por ello, desde sectores gubernamentales se está promoviendo medidas para la conservación del medio ambiente, entre ellas la producción de alimentos utilizando los recursos locales de una manera óptima., reduciendo así el impacto sobre el medio ambiente y preservando la biodiversidad de plantas y animales

b) Preocupación por la ingestión de productos químicos sintéticos como los pesticidas o los nitratos y de OMGs. Por ello, los alimentos procedentes de la agricultura ecológica son una buena opción para el consumidor, ya que tienen limitado el uso de productos químicos y prohibido el cultivo de OMGs. Hay estudios que corroboran que el contenido en pesticidas y nitratos es menor en los alimentos ecológicos, por ejemplo en tomates (Juroszek et al., 2009), aunque hay también otros estudios que dicen que, por ejemplo en zanahorias, el contenido en nitratos es mayor en las de cultivo orgánico que en las de cultivo convencional (Hoogenboom et al., 2008; Malmauret et al., 2002).

c) Creencias populares: Entre los consumidores existe la percepción de que los alimentos procedentes de la agricultura ecológica poseen una mayor calidad nutricional. Sin embargo, a pesar de existir muchos estudios evaluando diferencias en la composición de alimentos

ecológicos y convencionales, los resultados no son definitivos. Mientras algunos estudios afirman que el contenido en vitamina C es mayor en ciertos alimentos procedentes de agricultura ecológica, por ejemplo en tomates (Borguini, 2006; Chassy et al., 2006) y en melocotones (Carbonaro et al., 2002), otros estudios afirman que los ecológicos contienen valores similares o menores que los convencionales, por ejemplo en tomates (Barrett et al., 2007), brócoli (Wunderlich et al., 2008), pimiento (Chassy et al., 2006), manzanas (Weibel et al., 1999), maíz (Warman y Havard, 1998) o peras (Carbonaro et al., 2002).

Respecto al contenido en carotenoides, se han determinado mayores concentraciones en pimiento, ciruelas y tomates orgánicos (Chassy et al., 2006; Lombardi-Boccia et al., 2004; Pérez-López et al., 2007). Sin embargo, otros estudios han determinado valores más bajos o similares de carotenoides en tomates (Borguini, 2006; Rossi et al., 2008), pimiento (Del Amor et al., 2008) mostaza y col rizada chinas, lechuga y espinaca (Ismail y Fun, 2003) de cultivo ecológico respecto a los de cultivo convencional.

También se han realizado estudios comparando el contenido fenólico de alimentos ecológicos con sus homólogos convencionales. Mientras algunos afirman que el contenido en fenoles es mayor en los alimentos ecológicos (Asami et al., 2003; Carbonaro et al., 2002; Caris-Veyrat et al., 2004; Chassy et al., 2006; Mitchell et al., 2007; Ren et al., 2001; Valavanidis et al., 2009; Vallverdú-Queralt et al., 2011; Young et al., 2005; Wang et al., 2008), otros dicen que no hay diferencias o incluso que los alimentos de cultivo convencional tienen una mayor concentración fenólica (Chassy et al., 2006; Häkkinen y Törrönen, 2000; Lombardi-Boccia et al., 2004; Luthria et al., 2010; Raigón et al., 2010; Roussos y Gasparatos, 2009; Singh et al., 2009).

En la comparación sensorial de los productos orgánicos y convencionales, continua habiendo estudios contrapuestos. Weibel et al. (1999) compararon desde el punto de vista sensorial manzanas *Golden Delicious* de cultivo ecológico y convencional, siendo las del primer tipo las que obtuvieron una puntuación más alta en el test. Evers (1989) comparó el sabor y la textura de zanahorias ecológicas y convencionales, obteniendo mejor puntuación en textura las zanahorias ecológicas y mejor sabor las convencionales. De la misma manera, Haglund et al. (1998) observaron que tenían mejor sabor las zanahorias convencionales que las ecológicas, mientras que Carvalho et al. (2005) concluyeron que las zanahorias de cultivo ecológico tenían mejor sabor que las de cultivo convencional.

En olivas y aceites de oliva, no existen muchos estudios sobre la influencia del cultivo orgánico o convencional. Gutiérrez et al. (1999) compararon aceites de oliva de la variedad *Picual* procedentes de olivas de cultivo ecológico y de cultivo convencional durante una campaña oleícola. Observaron que el aceite de oliva ecológico tenía valores menores de acidez y peróxidos, mayor valor en estabilidad y una mayor puntuación en el análisis sensorial. Además, en el perfil de ácidos grasos, el aceite orgánico contenía un mayor porcentaje de ácido oleico y menor de linoleico respecto al aceite convencional. El contenido en  $\alpha$ -tocoferol en el aceite

orgánico fue 1.3 veces mayor que en el aceite convencional, y el aceite ecológico contenía una mayor cantidad de fenoles. En el contenido en esteroides, el contenido en  $\Delta$ -5 avenasterol fue significativamente mayor en el aceite convencional. Así, los autores afirmaron que el aceite de oliva ecológico era de mayor calidad que el convencional.

En un estudio posterior, Ninfali et al. (2008) compararon aceites de las variedades de oliva *Leccino* y *Frantoio* de cultivo ecológico y convencional durante 3 campañas oleícolas. Encontraron diferencias significativas en algunos de los parámetros estudiados como acidez y peróxidos, pero éstas no fueron consistentes a lo largo de las tres campañas estudiadas. De la misma manera, se detectaron diferencias entre las concentraciones en fenoles, tocoferoles y compuestos volátiles pero sólo en algunas campañas, mientras que en otras no se encontraron o fueron contrarias. Así, estos autores concluyeron que el tipo de cultivo no afectaba de una manera consistente en la calidad del aceite de oliva estudiado, y que otros factores como la variedad o la diferencia entre campañas tenían un efecto más claro.

Bendini et al. (2006) estudiaron 24 muestras de aceite de oliva virgen de cultivo convencional, de producción integrada y de producción ecológica durante dos campañas oleícolas, determinando los valores para los parámetros de estabilidad oxidativa, fenoles y presencia de metales. Evaluar la presencia de metales como cadmio, plomo, cobre o zinc, siempre en concentraciones de trazas, es interesante debido a que pueden catalizar la oxidación del aceite (Keceli et al., 2002). Algunos autores habían evaluado anteriormente las diferencias en el contenido de minerales y metales en vegetales y cereales de cultivo ecológico y convencional (Woese et al., 1997; Worthington, 2001), observando que los alimentos de producción ecológica contenían menor concentración en minerales y en metales pesados comparando con los de cultivo convencional. Por tanto, en el estudio de Bendini et al. (2006) quisieron comprobar si el aceite de oliva virgen contenía una menor cantidad de metales pesados que el de cultivo convencional, y si esto mejoraba su estabilidad oxidativa. En este estudio concluyeron, después del análisis estadístico de los datos obtenidos, que no se podían diferenciar los aceites según el tipo de cultivo (convencional, producción integrada y ecológica) de acuerdo a los parámetros estudiados.

Samman et al. (2008) estudiaron el perfil de ácidos grasos de aceites de oliva convencionales y ecológicos australianos, y no encontraron una tendencia general en la composición en ácidos grasos según el tipo de cultivo. En otro trabajo similar, Dolgun et al. (2010) compararon aceites de oliva de cultivo ecológico y convencional de las variedades *Gemlik* y *Memecik*, analizando los parámetros de calidad (acidez, peróxidos,  $K_{232}$  y pigmentos totales) además de su perfil de ácidos grasos, contenido en tocoferoles y fenoles. Los resultados mostraron que no había diferencias significativas generalizables en los valores de los diferentes parámetros según el tipo de cultivo, sólo encontrándose diferencias en el contenido de ácido oleico, que fue mayor en el aceite ecológico que en el convencional.

La elaboración de aceites singulares, en los que además de la producción ecológica se realiza un tratamiento del deshuesado del fruto previo a la extracción, fue estudiada por Ranalli y Contento (2010). Estudiaron el efecto de deshuesar la oliva en una mezcla de algunas variedades italianas (*Cerasola*, *Cellina di Nardò*, *Ogliarola Salentina*, *Ogliarola Barese*, *Coratina* y *Fasola*) de cultivo ecológico y convencional. Comparando los valores del aceite de producción ecológica o convencional elaborado con el fruto entero, que es la práctica habitual, observaron que el aceite ecológico tenía una mayor concentración de compuestos volátiles, fenoles y  $\alpha$ -tocoferol, mientras que no encontraron diferencias en el contenido en esteroides, clorofilas y  $\beta$ -caroteno.

Anastasopoulos et al. (2011) evaluaron aceites de la variedad *Koroneiki* de producción ecológica y convencional a diferentes estados de maduración durante cuatro campañas oleícolas. Observaron que los aceites ecológicos fueron en general de una calidad superior comparados con los convencionales, sobretodo en un mayor contenido en compuestos fenólicos. No obstante, los resultados indicaron que la composición del aceite es muy variable según el estado de maduración y el efecto campaña.





### 3. OBJETIVOS

### 3. OBJETIVOS

Esta tesis es fruto de las actividades desarrolladas en dos proyectos de investigación llevados a cabo por la Unidad de Antioxidantes del Departamento de Tecnología de Alimentos.

a) Metabolismo de clorofilas y fenoles en frutos de olivo: implicación en el perfil intrínseco de componentes menores del aceite de oliva virgen. Estudio de la fracción fenólica. Programa Nacional de Recursos y Tecnologías Agroalimentarias (AGL) AGL2007-66139-C02-02.

b) Estudio comparativo plurianual para la evaluación de la composición, calidad nutricional y perfil organoléptico del aceite de oliva virgen obtenido a partir de olivas cultivadas en la provincia de Lleida mediante técnicas de producción ecológica y técnicas tradicionales. Ayudas para Proyectos de Investigación de la Universitat de Lleida.

El objetivo general persigue alcanzar un mayor conocimiento de la composición de los aceites de oliva en función de parámetros relacionados con el sistema de cultivo y la variedad, con el fin de poder diversificar la oferta comercial.

Bajo este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- Avanzar en la metodología analítica para el conocimiento del perfil fenólico de la oliva.
- Identificar el metabolismo de los compuestos fenólicos secoiridoides en la pulpa de frutos de las variedades *Arbequina* y *Hojiblanca*.
- Estudiar la evolución de compuestos flavonoides y lignanos a lo largo de la maduración del fruto.
- Analizar el papel de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en el fruto y su intervención en la transformación de los compuestos fenólicos de la oliva y del aceite
- Comparar el perfil de fenoles en frutos de producción ecológica y tradicional.
- Caracterizar y evaluar la calidad del aceite de oliva virgen procedente de frutos de la variedad *Arbequina* cultivados mediante técnicas de producción ecológica comercializados en la provincia de Lleida.
- Caracterizar aceites de variedades en retroceso para analizar su potencialidad de cara a diversificar la oferta de aceites de oliva virgen extra, tanto de producción ecológica como convencional.





## 4. PLAN DE TRABAJO

#### 4. PLAN DE TRABAJO

El plan de trabajo ha consistido en:

- 1) Revisión bibliográfica
- 2) Diseño de los experimentos sobre la base de los objetivos
- 3) Localización de parcelas y almazaras
- 4) Toma de muestras
- 4) Análisis de olivas, extracción de aceites y realización de las determinaciones analíticas
- 5) Análisis estadístico de resultados
- 6) Redacción del documento de tesis doctoral y de las publicaciones científicas y comunicaciones a congresos.

La organización de las experiencias se resume en el siguiente cuadro:

2008/09	2009/10	2010/11	2011/12
<b>Actividad 1</b> Cultivo tradicional <i>Arbequina-Hojiblanca</i> Andalucía	<b>Actividad 2</b> Cultivo ecológico y tradicional <i>Arbequina</i> Andalucía		
<b>Actividad 2</b> Cultivo ecológico y tradicional <i>Arbequina</i> Lleida	<b>Actividad 2 y 3</b> Cultivo ecológico y tradicional <i>Arbequina</i> Lleida		
	<b>Actividad 4</b> Calidad de aceites de producción ecológica <i>Arbequina</i> Lleida	<b>Actividad 4</b> Calidad de aceites de producción ecológica <i>Arbequina</i> Lleida	
	<b>Actividad 5</b> Recuperación de variedades Molí dels Torms	<b>Actividad 5</b> Recuperación de variedades Molí dels Torms	<b>Actividad 6</b> Recuperación de variedades Slow Food





## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1. EXPERIENCIAS SOBRE EL FRUTO

#### 5.1.1. LOCALIZACIÓN DE LAS PARCELAS

Los estudios se han llevado a cabo con frutos del olivo de las variedades *Arbequina* y *Hojiblanca* durante dos campañas oleícolas. Se ha analizado frutos de la variedad *Arbequina* y *Hojiblanca* de cultivo convencional procedentes de olivos situados en la Estación Experimental de Cabra, en la comarca Subbética, provincia de Córdoba; frutos de la variedad *Arbequina* de cultivo ecológico y de cultivo convencional de dos plantaciones comerciales situadas en el término municipal de Els Torms, en la comarca de Les Garrigues; y frutos de la variedad *Arbequina* de cultivo ecológico y de cultivo convencional de la finca “Molino de Vacas” situada en Écija (Sevilla). La Tabla 5 presenta un resumen de la zona y variedad muestreada en cada una de las campañas estudiadas. En la Figura 15, se muestra una fotografía aérea de la localización de las parcelas de cultivo de olivo ecológico y convencional situadas en Els Torms.

**Tabla 5.** Zona de cultivo, variedad y tipo de cultivo de las muestras de fruto en las campañas 2008/09 y 2009/10.

		2008/09		2009/10	
		ECOLÓGICO	TRADICIONAL	ECOLÓGICO	TRADICIONAL
LLEIDA	ARBEQUINA				
	Els Torms	X	X	X	X
ANDALUCIA	ARBEQUINA				
	Cabra		X		
ANDALUCIA	HOJIBLANCA				
	Cabra		X		
ANDALUCIA	ARBEQUINA				
	Écija			X	X



**Figura 15.** Fotografía aérea de las parcelas situadas en Els Torms (Lleida).

### 5.1.2. CARACTERIZACIÓN CLIMÁTICA

El clima de la comarca de Les Garrigues es mediterráneo continental seco, con una precipitación media anual escasa, entre 400 y 450 mm, produciéndose los máximos en primavera y otoño y los mínimos en invierno y verano. Por lo que concierne a la temperatura, los inviernos son fríos, con medias de 4 a 5 °C, sobretodo debido a la inversión térmica y las nieblas persistentes, y los veranos son muy calurosos, con medias de 24 a 25 °C, siendo la amplitud térmica anual alta o muy alta. Suelen producirse heladas de octubre a mayo (Servei Meteorològic de Catalunya, 2012).

El clima de la comarca Subbética y de la comarca de Écija son similares, debido a su proximidad. Se pueden considerar también clima mediterráneo continental pero con influencia atlántica. La penetración de la influencia oceánica por el oeste tiene lugar preferentemente en invierno pero no tanto en verano. En verano tiende a imponerse un régimen de levante en la región, por lo que las influencias atlánticas se reducen al máximo; ello explica el carácter muy cálido y seco de los veranos de esta zona, en donde las temperaturas medias de julio y agosto superan los 28 °C con temperaturas máximas muy altas, que superan casi siempre los 35 °C. Los inviernos, aunque suelen ser suaves por la penetración de las influencias oceánicas, son algo más frescos que en las zonas costeras, con medias de 11-12 °C. La precipitación anual es escasa, con una media de 500-550 mm, concentrándose las precipitaciones en los meses de noviembre y diciembre (Agencia Estatal de Meteorología, 2012).

En la Tabla 6, se pueden observar los datos climáticos correspondientes a los años de estudio.

**Tabla 6.** Datos climáticos correspondientes a los años 2008 y 2009 en Cabra (Córdoba), Écija (Sevilla) y Els Torms (Lleida).

	Cabra	Écija	La Granadella	
	(Córdoba)	(Sevilla)	(Lleida)	
	2008	2009	2008	2009
T media (°C)	16.3	18.4	13.3	14.4
T máxima absoluta (°C)	39.4	43.0	34.5	35.7
T mínima absoluta (°C)	-1.7	-3.5	-5.7	-6.7
Precipitación acumulada (mm)	687.6	569.2	395.8	430.5

### 5.1.3. MATERIAL VEGETAL

La variedad *Arbequina* se caracteriza por su resistencia al frío, vigor reducido, tamaño pequeño de sus frutos y buen rendimiento graso (20-22%). Es una variedad de gran interés por sus excelentes características organolépticas y por el buen comportamiento agronómico del árbol (Romero et al., 2008). El origen de esta variedad está localizado en Arbeca, municipio situado en la provincia de Lleida, dónde su cultivo se inició en el siglo XVI. Es la variedad más extendida

en Cataluña, aunque también se cultiva tradicionalmente en las provincias de Huesca y Zaragoza. Actualmente, su cultivo está extendido por muchas zonas olivareras de España y del mundo, no sólo por la calidad de los aceites, sino también porque el porte del árbol hace que su adaptación a los sistemas de cultivo semiintensivos e intensivos sea excelente.

La variedad *Hojiblanca* es la variedad dominante al sur de la provincia de Córdoba, y parte de Málaga y Granada. Es una variedad considerada con doble aptitud, es decir, que se utiliza tanto para la obtención de aceite como para su aderezo como aceituna de mesa. Sus frutos son de un tamaño grande con bajo contenido en aceite (17%), aunque apreciado por su calidad. El fruto tiene gran resistencia al desprendimiento, lo que dificulta su recolección mecanizada. (Barranco, 2004).

#### **5.1.4. TOMA DE MUESTRAS**

##### **5.1.4.1. Muestreo de frutos durante la maduración en la campaña 2008/09**

Durante la campaña 2008/09, y en colaboración con el Instituto de la Grasa - CSIC de Sevilla, se tomaron muestras de fruto de las variedades *Arbequina* y *Hojiblanca* de la Estación Experimental de Cabra (Córdoba), con tal de evaluar el contenido fenólico y las rutas implicadas en su biosíntesis y catabolismo. Se realizaron 13 muestreos, tomando frutos regularmente cada 15 días de cinco árboles seleccionados para cada variedad y siempre a la misma hora, entre las 10:00 y las 11:00. Las fechas de los muestreos para ambas variedades se muestran en la Tabla 7.

Durante esta campaña, también se tomaron frutos de la variedad *Arbequina* de cultivo ecológico y de cultivo convencional de las fincas situadas en Els Torms (Lleida), con tal de evaluar la composición fenólica a diferentes estados de maduración comerciales y según el tipo de cultivo. Se realizaron 4 muestreos sobre 20 árboles seleccionados para cada tipo de cultivo y siempre a la misma hora, entre las 10:00 y las 11:00. Las fechas de los muestreos y el grado de madurez para ambos tipos de cultivo se pueden observar en la Tabla 8.

**Tabla 7.** Tabla descriptiva de los muestreos de olivas de cultivo convencional de las variedades *Arbequina* y *Hojiblanca* realizados en Córdoba durante la campaña 2008/09.

Número de muestreo	Fecha
1	30/06/2008
2	14/07/2008
3	28/07/2008
4	11/08/2008
5	28/08/2008
6	08/09/2008
7	22/09/2008
8	06/10/2008
9	20/10/2008
10	03/11/2008
11	17/11/2008
12	01/12/2008
13	15/12/2008

**Tabla 8.** Tabla descriptiva de los muestreos de olivas de cultivo ecológico y convencional de la variedad *Arbequina* realizados en Lleida durante la campaña 2008/09.

Número de muestreo	Fecha	Índice de madurez
1	15/10/2008	3
2	27/10/2008	4
3	12/11/2008	5
4	05/12/2008	6

#### 5.1.4.2. Muestreo de frutos durante la maduración en la campaña 2009/10

Durante la campaña 2009/10, y en colaboración del Instituto de la Grasa-CSIC de Sevilla, se tomaron muestras de fruto de la variedad *Arbequina* de cultivo ecológico y de cultivo convencional de la finca situada en Écija (Sevilla) y de la finca de Els Torms (Lleida), con el objetivo de comparar la composición fenólica según zona y tipo de cultivo. En Sevilla se realizaron 14 muestreos distribuidos cada 15 días, mientras que en Lleida fueron 22 muestreos con frecuencia semanal. Se seleccionaron 5 árboles para cada variedad, tipo de cultivo y zona. Los muestreos se realizan a la misma hora, entre las 10:00 y las 11:00. Las fechas de los muestreos para ambos tipos de cultivo están detalladas en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Tabla descriptiva de los muestreos de olivas ecológicas y convencionales de la variedad *Arbequina* realizados en Sevilla y en Lleida durante la campaña 2009/10.

Muestreos en Sevilla		Muestreos en Lleida	
Número de muestreo	Fecha	Número de muestreo	Fecha
1	15/06/2009	1	18/06/2009
2	30/06/2009	2	26/06/2009
3	13/07/2009	3	02/07/2009
4	27/07/2009	4	09/07/2009
5	10/08/2009	5	16/07/2009
6	24/08/2009	6	22/07/2009
7	07/09/2009	7	29/07/2009
8	21/09/2009	8	05/08/2009
9	05/10/2009	9	12/08/2009
10	19/10/2009	10	19/08/2009
11	03/11/2009	11	26/08/2009
12	16/11/2009	12	02/09/2009
13	30/11/2009	13	09/09/2009
14	14/12/2009	14	16/09/2009
		15	23/09/2009
		16	01/10/2009
		17	07/10/2009
		18	14/10/2009
		19	21/10/2009
		20	28/10/2009
		21	04/11/2009
		22	11/11/2009

## 5.2. EXPERIENCIAS SOBRE EL ACEITE

### 5.2.1. TOMA DE MUESTRAS

#### 5.2.1.1. MUESTREO DE ACEITES DE *ARBEQUINA* ECOLÓGICOS COMERCIALES

Se realizó un muestreo de aceites ecológicos comerciales de la variedad *Arbequina* de la provincia de Lleida durante dos campañas consecutivas. Para ello, se adquirieron 8 muestras de la campaña 2009/10 y 11 muestras de la campaña 2010/11 de este aceite en almazaras reconocidas por el Consejo Catalán de Producción Agraria Ecológica (CCPAE), se alicuotaron en recipientes más pequeños y se conservaron a 4 °C, privadas de luz y aire, hasta el momento de su análisis. Los análisis que se llevaron a cabo en estas muestras fueron acidez, índice de

peróxidos, índices espectrofotométricos, composición en ácidos grasos, estabilidad, coordenadas cromáticas, contenido en pigmentos totales, perfil pigmentario, contenido en fenoles totales, perfil fenólico (extracción mediante el método A e identificación y cuantificación por HPLC-DAD, que se explicarán más adelante, en el apartado 5.3.2.13.) y contenido en  $\alpha$ -tocoferol.

#### 5.2.1.2. MUESTREO DE ACEITES ECOLÓGICOS MONOVARIETALES

El muestreo de aceites ecológicos monovarietales se llevó a cabo durante dos campañas consecutivas, 2009/10 y 2010/11. Se tomaron muestras de olivas de la zona de Les Garrigues de las variedades *Negral*, *Verdal*, *Mançanenc*, *Grossal* y *Arbre Blanc*, provistas por “El Molí dels Torms” durante los meses de Noviembre de 2009 y de 2010 (Tabla 10). De la variedad *Arbre Blanc* sólo se pudo obtener muestra en 2009, ya que esta variedad sufre una vecería muy pronunciada, no pudiéndose recolectar fruto en 2010. En 2010 se incorporó al estudio la variedad *Becarut*. Una vez en laboratorio, se determinaron los parámetros en fruto (índice de madurez, humedad del fruto y contenido en aceite). Posteriormente, se extrajo el aceite mediante el sistema Abencor, y una vez obtenido, se determinaron los parámetros del aceite, que fueron acidez, índice de peróxidos, índices espectrofotométricos, composición en ácidos grasos, estabilidad, coordenadas cromáticas, contenido en pigmentos totales, perfil pigmentario, contenido en fenoles totales, perfil fenólico (extracción mediante el método A e identificación y cuantificación por HPLC-DAD, que se explicarán más adelante, en el apartado 5.3.2.13) y contenido en  $\alpha$ -tocoferol.

**Tabla 10.** Aceites monovarietales ecológicos muestreados durante las campañas 2009/10 y 2010/11.

Campaña 2009/10	Campaña 2010/11
<i>Negral</i>	<i>Negral</i>
<i>Verdal</i>	<i>Verdal</i>
<i>Mançanenc</i>	<i>Mançanenc</i>
<i>Grossal</i>	<i>Grossal</i>
<i>Arbre Blanc</i>	<i>Becarut</i>

#### 5.2.1.3. MUESTREO DE ACEITES ECOLÓGICOS DE VARIEDADES EN RECUPERACIÓN (SLOW FOOD)

Durante la campaña 2011/12, se realizó un muestreo de aceites de una variedades de olivo que el movimiento Slow Food está caracterizando. Los árboles de estas variedades se encuentran en la Vall d'Àger, comarca de La Noguera (Lleida) y son variedades secundarias que el movimiento está intentando recuperar para su valorización. En esta campaña, se obtuvieron 19 muestras de aceite de 15 variedades diferentes. Estos aceites fueron elaborados mediante

el sistema Abencor y se tomaron datos de la humedad de la pasta, el contenido en grasa y el rendimiento Abencor. Por otra parte, se tomaron muestras de los aceites resultantes y se determinaron los parámetros de acidez, índice de peróxidos, índices espectrofotométricos, composición en ácidos grasos, estabilidad, contenido en pigmentos totales, contenido en fenoles totales, perfil fenólico (extracción mediante el método B e identificación y cuantificación por HPLC-ESI-MS/MS, que se explicarán más adelante, en el apartado 5.3.2.13), contenido en  $\alpha$ -tocoferol y capacidad antioxidante ORAC.

### 5.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

#### 5.3.1. MÉTODOS ANALÍTICOS EN FRUTO

##### 5.3.1.1. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE MADUREZ

Se determina de acuerdo a la escala propuesta por la Estación de Olivicultura y Elaiotecnia de Jaén (Hermoso et al., 1991). Esta determinación se basa en el color de la piel y de la pulpa del fruto.

Para llevarla a cabo, se toman 100 frutos al azar del total que componen la muestra, y se clasifican según una escala basada en 7 niveles de pigmentación (Tabla 11).

**Tabla 11.** Escala para la determinación del índice de madurez en olivas.

Color de la oliva	Nivel de pigmentación
Piel verde-intensa	0
Piel verde-amarilla	1
Piel con manchas rojizas en menos de la mitad del fruto	2
Piel con manchas rojizas o violeta claro en todo el fruto	3
Piel negra con pulpa entera blanca	4
Piel negra con pulpa morada sin llegar a la mitad	5
Piel negra con pulpa morada sin llegar hasta el hueso	6
Piel negra con pulpa morada en su totalidad	7

Se cuentan el número de frutos para cada categoría (A: número de frutos para la categoría 0; B: número de frutos para la categoría 1, y así sucesivamente hasta H: número de frutos para la categoría 7). El índice de madurez (IM) se calcula aplicando la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{A \cdot 0 + B \cdot 1 + C \cdot 2 + D \cdot 3 + E \cdot 4 + F \cdot 5 + G \cdot 6 + H \cdot 7}{100}$$

### 5.3.1.2. CÁLCULO DEL PORCENTAJE DE HUESO

Se pesan aproximadamente 50 g de olivas y se deshuesan. Los huesos se colocan en una solución NaOH al 1% en agitación durante doce horas. Transcurrido ese tiempo, se dejan secar en estufa a 25 °C durante toda una noche, y se colocan en el desecador durante unas cuatro horas, para pesarlos posteriormente. El porcentaje de hueso se calcula como:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{\text{masa huesos (g)}}{\text{masa olivas enteras (g)}} \cdot 100$$

### 5.3.1.3. HUMEDAD DE LA PULPA

La humedad de la pulpa de la oliva se calcula por la pérdida de masa después de la deshidratación de ésta en una estufa a 105 °C. Para ello, se pesa 5-10 g de pulpa de oliva con una precisión de 0.1 mg ( $M_h$ ) sobre una cápsula tarada ( $M_0$ ) en una balanza analítica (Mettler AJ150, Mettler Toledo, Barcelona, España). La cápsula se coloca en la estufa a 105 °C hasta su deshidratación. A continuación se enfría dentro del desecador y se vuelve a pesar ( $M_s$ ). La humedad de la pulpa se calcula haciendo uso de la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{M_h - M_s}{M_h - M_0} \cdot 100$$

### 5.3.1.4. OBTENCIÓN DEL POLVO ACETÓNICO

Las enzimas pueden ser aisladas de los tejidos de la oliva mediante una deshidratación con acetona, quedando un residuo sólido bastante estable denominado polvo acetónico. Para obtener un buen rendimiento en la precipitación es necesaria la homogeneización de la pulpa de oliva con acetona.

El método utilizado para la obtención del polvo acetónico se basa en el de Mínguez-Mosquera et al. (1994). Se toman 25 g de pulpa de oliva y se trituran con un homogeneizador Polytron (Kinematica AG, Lucerna, Suiza) junto con 500 mL de acetona a -20 °C. Seguidamente, se deja macerar durante 15 minutos en el congelador a -20 °C y se separa el sobrenadante por decantación. El residuo sólido se vuelve a tratar con 200 mL de acetona a -20 °C, y se repite la operación tantas veces como sea necesario hasta que el sobrenadante no tenga color (normalmente, 4 extracciones son suficientes). Finalmente, se recupera el precipitado mediante filtración al vacío y se deja secar a temperatura ambiente. Se conserva en un vial cerrado a -80 °C hasta el momento de su uso.

### 5.3.1.5. ACTIVIDAD ENZIMÁTICA $\beta$ -GLUCOSIDASA

La medida de la actividad  $\beta$ -glucosidásica se realiza según el método descrito por Romero-Segura et al. (2009) con algunas modificaciones. Este método se basa en la monitorización de la formación de *p*-nitrofenol a través de la lectura de la absorbancia a 405 nm. En un tampón de reacción adecuado, la enzima  $\beta$ -glucosidasa contenida en el polvo acetónico, rompe el enlace glucosídico de una molécula sintética añadida, el glucósido *p*-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (*p*NPG), liberando el *p*-nitrofenol.

Como paso previo a la reacción enzimática, se prepara un extracto líquido de la enzima. Para ello, se pesa 0.25 g de polvo acetónico al que se añade 17.5 mL de tampón borato sódico 0.1 mol/L a pH 9.0, que contiene ácido etilendiamino tetraacético (EDTA) a una concentración de 5 mmol/L, fluoruro sulfonil de fenilmetano (PMSF) a una concentración de 1 mmol/L y ditiotreitól (DTT) al 0.25% (p/v). EDTA, PMSF y DTT fueron provistos por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Para la monitorización de la reacción, se añade 100  $\mu$ L del extracto enzimático a 1 mL de tampón fosfato 50 mmol/L a pH 5.5, que contiene *p*NPG a una concentración de 15 mmol/L. La mezcla de reacción se incuba directamente en una cubeta de vidrio óptico a 50 °C durante 1 minuto y se mide la absorbancia a 405 nm. El espectrofotómetro utilizado fue Unicam UV300 (Termo Spectronic, Rochester, NY, USA). El *p*NPG fue adquirido en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

En todos los ensayos enzimáticos, se lleva a cabo en paralelo un blanco de la reacción. Para ello, se inactiva la enzima calentando el extracto enzimático durante 1 hora a 100 °C, y es este extracto inactivado el que se añade al tampón de reacción.

Los resultados se expresan en  $\mu$ Kat/g de polvo acetónico, que se definiría como la cantidad de enzima que hidroliza 1  $\mu$ mol de *p*NPG por segundo y por g de polvo acetónico.

Se calculó el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) para el *p*-nitrofenol en el medio de reacción, calculando la absorbancia con diferentes concentraciones de *p*-nitrofenol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). El valor obtenido fue  $\epsilon = 630.8 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

### 5.3.1.6. LOCALIZACIÓN *IN SITU* DE LA ENZIMA $\beta$ -GLUCOSIDASA

La localización de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en la célula se basa en la hidrólisis por parte de esta enzima de un sustrato sintético llamado 5-bromo-4-cloro-3-indolil  $\beta$ -D-glucopiranosido (X-Glc), que tiene la propiedad que cuando es hidrolizado, genera un precipitado insoluble de color azul en las células.

En cada muestreo, se seccionan 5 frutos inmediatamente después de su recolección, mediante el uso de un vibrotomo (Leica VT 1000S, Solms, Alemania). Para cortar la oliva, ésta se sumerge

en el baño del vibrotomo que previamente se ha llenado con tampón fosfato 50 mM pH 6.5 a 4 °C. De cada fruto, se cortan 5 láminas de 80 µm de grosor. Posteriormente, cada lámina se incuba sumergida en 1 mL del tampón de reacción durante 3 horas a 37 °C, tal y como describió Mazzuca et al. (2006). El tampón de reacción es tampón fosfato 50 mM pH 6.5, que contiene X-Glc 60 µM, ferricianuro potásico 1 mM, ferrocianuro potásico 1 mM y EDTA 10 mM, todos ellos provistos por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Es en esta incubación en la que X-Glc se deposita en forma de un precipitado azul cuando es hidrolizado por la enzima β-glucosidasa, precipitado que puede ser observado mediante microscopia óptica. Paralelamente, se llevan a cabo blancos de reacción, en los que las láminas se sumergen en un tampón de reacción de las mismas características pero que no contiene X-Glc.

Transcurrido el tiempo de la incubación, la reacción se detiene sumergiendo las láminas en tampón fosfato a 4 °C, y se montan en glicerol para su observación a 40x, 100x, 400x y 1000x. Se utilizó un microscopio óptico Leica DM2000 y las imágenes fueron capturadas mediante una cámara digital Leica DFC290.

### **5.3.1.7. DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN LA PULPA**

#### **5.3.1.7.1. EXTRACCIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS**

Inmediatamente después de la recolección de las olivas, éstas se deshuesan con un deshuesador de mano y la pulpa se vierte sobre nitrógeno líquido. El producto congelado se liofiliza en un equipo Lyobeta (Telstar, Terrassa, España).

Para la extracción de los compuestos fenólicos, se siguió la metodología de Ríos y Gutiérrez-Rosales (2010). Se pesa 1 g de pulpa liofilizada y se le añade 15 mL de la mezcla etanol:agua (80:20, v/v) y 1 mL de una solución de ácido *p*-hidroxifenil acético (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a una concentración de 50 mg/L en metanol, que se utilizará como patrón interno (IS). Todo se homogeneiza con un homogeneizador (Polytron, Kinematica AG, Lucerna, Suiza) durante 4 minutos, manteniendo la muestra siempre sumergida en un baño con agua y hielo. Se centrifuga a 38400g y 4 °C durante 15 minutos. Seguidamente, se recoge el sobrenadante en un matraz y se reextrae el residuo sólido, hasta un total de tres veces. Se unen los 3 sobrenadantes y se centrifugan a 0 °C durante 15 minutos, y se filtra el extracto a vacío. El extracto líquido se rotavapora hasta la completa eliminación del etanol y se lava 3 veces con 15 mL de *n*-hexano para la eliminación de la grasa y los pigmentos. Seguidamente, se vuelve a rotavaporar para eliminar el residuo de *n*-hexano y se lleva a un volumen final de 25 mL con agua:metanol (70:30, v/v). Metanol, etanol y *n*-hexano fueron adquiridos en Scharlau Chemie (Barcelona, España). El agua utilizada fue de calidad Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, MA, USA).

Los resultados de las experiencias sobre metabolismo de la fracción fenólica se comparan con los resultados de las experiencias paralelas llevadas a cabo en Sevilla. En dichas muestras, los

extractos fueron procesados en el Instituto de la Grasa siguiendo la misma metodología y fueron enviados a nuestro laboratorio para los análisis cromatográficos.

### 5.3.1.7.2. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR HPLC-ESI-MS/MS

El análisis de los extractos fenólicos se lleva a cabo mediante HPLC acoplado a un detector de fotodiodos (PDA) y a un detector MS/MS. El equipo está formado por un cromatógrafo AcQuity™ UPLC equipado con una bomba binaria Waters (Milford, MA, USA). La columna utilizada es una Sunfire C<sub>18</sub> (4.5 x 150 mm, 3.5 µm) también de Waters. El detector de masas-masas utilizado es un triple cuadrupolo TQD™ (Milford, MA, USA) estando todo controlado por el software MassLynx 4.1.

Durante el análisis, la columna se mantiene a 30 °C y el flujo es 0.8 mL/min. Las fases móviles son una mezcla de agua: ácido fórmico (99.9:0.1, v/v) como fase A y metanol como fase B. El ácido fórmico y el metanol fueron adquiridos en Scharlau Chemie (Barcelona, España), mientras que el agua utilizada fue de calidad Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). El gradiente que se utiliza se puede observar en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Gradiente utilizado para la identificación y cuantificación de compuestos fenólicos en extractos de pulpa de oliva mediante HPLC-ESI-MS/MS.

	Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B
1	0	90	10
2	45	65	55
3	45.1	0	100
4	50	0	100
5	55	90	10
6	60	90	10

El volumen de inyección son 10 µL y todas las muestras se filtran previamente por membranas de 0.22 µm de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Tecknokroma, Barcelona, España).

Las condiciones de trabajo en el equipo cromatográfico son:

- Detección en PDA: 278 y 339 nm.
- Técnica de ionización: electrospray (ESI)
- Modo de ionización: positivo para las cianidinas; negativo para el resto de fenoles
- Adquisición de datos: *selected reaction monitoring* (SRM)
- Voltaje capilar: 3 kV
- Temperatura de la fuente: 150 °C
- Flujo de gas en el cono: 80 L/h
- Flujo de gas de desolvatación: 800 L/h

- Temperatura de desolvatación: 400 °C.
- Gases de nebulización y colisión: nitrógeno (>99% pureza) y argón (>99% pureza), respectivamente.

Los voltajes de cono y las energías de colisión son optimizadas mediante la infusión de una solución estándar de 10 mg/L de cada compuesto analizado en una mezcla metanol:agua (50:50; v/v). En primer lugar, se realiza un *full-scan* para seleccionar los valores más abundantes de  $m/z$ , y se optimiza el voltaje de cono. En todos los casos, los iones  $[M - H]$  fueron los más abundantes, excepto para las cianidinas, en las que los más abundantes fueron los iones  $[M - H]^+$ . Estos iones se toman como iones precursores, y seguidamente, se estudian las energías de colisión para seleccionar los iones producto más abundantes. En este punto, para cada compuesto analizado, se selecciona la transición (ión precursor > ión producto) sensible para la cuantificación, y la segunda transición para la confirmación. En la Tabla 13 se muestran las transiciones MS/MS para la cuantificación y la confirmación, además del voltaje de cono y los valores de la energía de colisión optimizados para cada uno de los compuestos analizados.

**Tabla 13.** Condiciones optimizadas para el análisis de los compuestos fenólicos mediante HPLC-ESI-MS/MS.

COMPUESTO	IÓN PRECURSOR (m/z)	CUANTIFICACIÓN			CONFIRMACIÓN		
		IÓN PRODUCTO	VOLTAJE DE CONO (V)	ENERGÍA DE COLISIÓN (eV)	IÓN PRODUCTO	VOLTAJE DE CONO (V)	ENERGÍA DE COLISIÓN (eV)
ácido <i>p</i> -hidroxifenil acético (IS)	151	107	20	10	-	-	-
<b>ACIDOS FENOLICOS</b>							
ácido clorogénico	353	191	30	10	127	35	15
ácido cumárico	163	119	35	10	117	25	25
ácido 3,4-dihidroibenzoico	153	109	45	15	-	-	-
ácido <i>p</i> -hidroibenzoico	137	93	20	15	-	-	-
ácido cinámico	147	103	20	10	-	-	-
ácido vainílico	167	123	30	10	152	30	15
vainillina	151	136	20	10	92	20	15
ácido cafeico	179	135	35	15	117	35	20
ácido ferúlico	193	134	30	15	178	30	10
<b>CIANIDINAS</b>							
cianidina-rutinósido	595	287	35	20	165	35	25
cianidina-glucósido	449	287	35	15	165	35	25
<b>FENIL ALCOHOLES</b>							
hidroxitirosol	153	123	35	10	95	35	25
hidroxitirosol-glucósido	315	153	35	25	123	35	30
tirosol	137	106	40	15	119	40	15
<b>FLAVONOIDES</b>							
apigenina	269	117	60	25	151	60	25
apigenina 7-glucósido	431	269	45	25	117	45	30

<b>apigenina-rutinósido</b>	577	269	35	25	117	35	30
<b>eriodictiol-glucósido</b>	449	287	35	15	151	35	20
<b>luteolina</b>	285	133	55	25	151	55	25
<b>luteolina-7-glucósido</b>	447	285	50	25	256	50	35
<b>luteolina-rutinósido</b>	593	285	35	25	133	35	35
<b>metoxiluteolina</b>	299	119	35	15	191	35	20
<b>quercetina-ramnósido</b>	447	301	45	25	151	45	25
<b>rutina</b>	609	301	55	20	179	55	30
<b>LIGNANOS</b>							
<b>acetoxipinoresinol</b>	415	151	45	15	235	45	15
<b>acetoxipinoresinol derivado</b>	415	151	45	15	235	45	15
<b>pinoresinol</b>	357	151	40	10	136	40	25
<b>SECOIRIDOIDES Y DERIVADOS</b>							
<b>3,4-DHPEA-AC</b>	195	135	30	10	107	30	20
<b>3,4-DHPEA-EDA</b>	319	195	40	5	183	40	10
<b>3,4-DHPEA- EA</b>	377	275	35	10	307	35	10
<b>derivado 3,4-DHPEA-EA</b>	377	197	20	20	135	20	25
<b>hidroxi 3,4-DHPEA-EA</b>	335	199	40	15	225	40	20
<b>metil 3,4-DHPEA-EA</b>	391	255	35	15	225	35	20
<b>6-glucopiranosil oleósido</b>	551	507	35	20	389	35	25
<b>6-glucopiranosil oleósido-glucósido</b>	713	551	35	15	507	35	25
<b>6-ramnopiranosil oleósido</b>	535	145	35	20	389	35	25
<b>7-β-1-D glucopiranosil 11-metil oleósido</b>	567	405	40	15	507	40	10
<b>7-cetologanina</b>	387	225	40	10	197	40	10
<b>ácido elenólico</b>	241	139	30	15	165	30	10
<b>ácido elenólico-glucósido</b>	403	179	35	10	139	35	20

<b>demetiloleuropeína</b>	525	389	35	10	275	35	20
<b>ligustrósido</b>	523	361	35	15	161	35	15
<b>derivado ligustrósido</b>	393	317	40	15	257	40	15
<b>nuzhenida</b>	685	523	50	15	369	50	20
<b>oleósido 11-metil ester</b>	403	179	35	10	241	35	10
<b>oleuropeína + oleurósido</b>	539	377	35	15	275	35	20
<b>derivado oleuropeína</b>	365	229	35	10	185	35	15
<b>oleuropeína-glucósido</b>	701	539	35	20	377	35	25
<b>oleósido</b>	389	345	40	10	209	40	15
<b>p-HPEA-EA</b>	361	291	30	10	259	30	10
<b>p-HPEA-EDA</b>	303	285	30	5	179	30	5
DERIVADO ÁCIDO HIDROXICINÁMICO							
<b>verbascósido</b>	623	461	35	20	161	35	35

La cuantificación se ha hecho mediante el uso de curvas de calibración con patrones. La expresión de las unidades se ha adaptado a los objetivos de cada una de las experiencias, por lo que en algunos casos las concentraciones de los compuestos fenólicos han sido expresados como concentración del propio producto y en otros han sido expresados en una cantidad equivalente de un compuesto de referencia. Para facilitar la lectura de los resultados, en cada uno de los apartados del capítulo Resultados y Discusión se especifica cómo se ha expresado la cuantificación.

#### **5.3.1.7.3. OBTENCIÓN DE LOS PATRONES**

Para cuantificar los compuestos fenólicos, se utilizan estándares comerciales. Apigenina, apigenina-7-glu, luteolina, luteolina-7-glu, oleuropeína, hidroxitirosol, tirosol y vainillina fueron adquiridos en Extrasynthese (Genay, Francia); ácido cafeico y ácido vainílico fueron adquiridos en Fluka (Buchs, Suiza); pinoresinol fue adquirido en Arbo Nova (Turku, Finlandia). Sin embargo, de muchos de los compuestos fenólicos analizados no existen patrones comerciales, así que bien se aíslan mediante cromatografía semipreparativa o se cuantifican con compuestos con una estructura lo más afín a ellos posible. A continuación, se expone la obtención de algunos derivados secoiridoides que han sido utilizados como patrones de cuantificación.

##### **5.3.1.7.3.1. OBTENCIÓN DE 3,4-DHPEA-EDA Y OTROS FENOLES**

El compuesto 3,4-DHPEA-EDA, la forma dialdehídica del ácido elenólico ligada al hidroxitirosol, se obtuvo por cromatografía semipreparativa, aislándolo de un extracto de aguas de vegetación siguiendo la metodología de Suárez et al. (2009).

Para conseguir el extracto, se tomó alpeorujo, un subproducto resultante de la extracción del aceite de oliva. Después de centrifugarlo a 21600 g a 15 °C durante 10 minutos, se recogió el sobrenadante, que contiene las aguas de vegetación del fruto y las aguas del procesado de la extracción de aceite y que son la fuente a partir de las que se realiza la extracción de los derivados secoiridoides. Para ello, 100 mL de aguas se transfieren a un embudo de decantación y se lavan con 15 mL de *n*-hexano 3 veces para eliminar los lípidos. Seguidamente, se añaden 25 mL de acetato de etilo y se agita, de manera que los compuestos fenólicos se transfieren al disolvente orgánico. Este paso se realiza un total de 3 veces. Se unen las fases de acetato de etilo y se rotavapora a 30 °C hasta sequedad. El extracto se redisuelve en metanol y se conserva a -80 °C hasta el momento de su uso. Los disolventes orgánicos *n*-hexano, acetato de etilo y metanol fueron provistos por Scharlau Chemie (Barcelona, España).

Para la separación de compuestos, se utiliza un cromatógrafo líquido semipreparativo que se compone de una bomba binaria Waters 1525EF, un inyector Waters Flexinject, un detector de absorbancia de  $\lambda$  dual Waters 2467 y un colector Waters Fraction Collector II. La columna utilizada es una Inertsil ODS-3 (25cm x 10mm, 5 $\mu$ m; GL Sciences Inc., Torrance, CA, USA) equipada con una precolumna Spherisorb S5 ODS-2 (1cm x 4.6mm, 5 $\mu$ m; Tecknokroma,

Barcelona, España). La fase móvil que se usa es agua: ácido acético (99.8:0.2, v/v) como fase A y metanol como fase B. El ácido acético y el metanol fueron adquiridos en Scharlau Chemie (Barcelona, España), y el agua fue de calidad Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). El software que dirige el equipo es Breeze (Waters). La detección se hace con un detector UV-VIS que mide la absorbancia a las longitudes de onda 278 y 339 nm. El volumen de inyección es 400  $\mu$ L y el flujo 5 mL/min. El gradiente utilizado se detalla a continuación en la Tabla 14.

**Tabla 14.** Condiciones cromatográficas utilizadas para la obtención de 3,4-DHPEA-EDA y otros fenoles mediante cromatografía líquida semipreparativa.

	Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B
1	0	95	5
2	2	95	5
3	10	75	25
4	20	60	40
5	30	50	50
6	40	0	100
7	45	0	100
8	48	95	5
9	50	95	5

En un colector de fracciones se recoge el eluido ajustando el tiempo para que coincida con la salida de cada compuesto fenólico. Las fracciones se evaporan a vacío para eliminar el metanol y se liofiliza (Lyobeta, Telstar, Barcelona, España) para eliminar el agua. El liofilizado se pesa para determinar la concentración del compuesto referida al peso del mismo, se transfiere a un vial bajo corriente de nitrógeno y se conserva a  $-40$  °C hasta el momento de su uso como estándar.

Este mismo procedimiento ha sido utilizado para obtener el derivado de oleuropeína, *p*-HPEA-EDA, *p*-HPEA-EA y acetoxipinoresinol.

#### 5.3.1.7.3.2. OBTENCIÓN DE 3,4-DHPEA-EA

Para obtener el compuesto 3,4-DHPEA-EA, oleuropeína aglicona, se elimina el azúcar de oleuropeína mediante una hidrólisis con enzima  $\beta$ -glucosidasa comercial. Para ello, se mezclaron en un tubo de ensayo 2 mL de oleuropeína (Extrasynthese, Genay, Francia) (5 mg/mL en tampón citrato), 1 mL de enzima  $\beta$ -glucosidasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (2.5 mg/mL en tampón citrato) y 2 mL de tampón citrato (50 mM, pH 5.5), y se incubó durante 1 h a 37 °C. Para parar la reacción, la solución resultante se enfrió y filtró. La muestra se inyectó en el cromatógrafo semipreparativo (detallado en el apartado anterior). La columna utilizada fue una Sunfire C<sub>18</sub> (4.6 x 150 mm, 3.5  $\mu$ m; Waters, Milford, MA, USA) equipada con una

precolumna Spherisorb S5 ODS-2 (10 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m; Teknokroma, Barcelona, España). Los cromatogramas se extrajeron a 278 y 339 nm. La fase móvil utilizada fue agua:ácido fórmico (99.8:0.2, v/v) como fase A y metanol como fase B. El ácido fórmico y el metanol fueron adquiridos en Scharlau Chemie (Barcelona, España), y el agua fue de calidad Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, MA, USA). El flujo fue 1.3 mL/min y el volumen de inyección fue 100  $\mu$ L. El gradiente utilizado es el que se detalla en la Tabla 15.

**Tabla 15.** Condiciones cromatográficas utilizadas para la obtención de 3,4-DHPEA-EA mediante cromatografía líquida semipreparativa.

	Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B
1	0	90	10
2	10	70	30
3	35	45	55
4	35.1	0	100
5	45	0	100
6	50	90	10
7	60	90	10

En un colector de fracciones se recoge el eluido ajustando el tiempo para que coincida con la salida de la oleuropeína aglicona. La fracción se evapora a vacío para eliminar el metanol y se liofiliza (Lyobeta, Telstar, Barcelona, España) para eliminar el agua. El liofilizado se transfiere a un vial bajo corriente de nitrógeno y se conserva a -40 °C hasta el momento de su uso como estándar.

### 5.3.2. MÉTODOS ANALÍTICOS EN ACEITE

#### 5.3.2.1. OBTENCIÓN DEL ACEITE EN PLANTA PILOTO (ABENCOR)

En las experiencias de recuperación de variedades (capítulos 5 y 6), las muestras de olivas se someten a la extracción del aceite mediante el sistema Abencor (MC2 Ingenierías y Sistemas, Sevilla, España). Este método reproduce las fases del proceso industrial de extracción de aceite de oliva, pero a pequeña escala: molienda, batido, centrifugación y decantación.

Tras la recogida de las olivas en campo, se realiza una inspección visual y se eliminan manualmente hojas y piedras antes de la entrada de las olivas al molino. Las olivas se trituran en un molino de martillos a una velocidad de 3000 rpm. Posteriormente, la pasta resultante se homogeneiza y se pesan aproximadamente 700 g en cada uno de los cazos que se colocan en la batidora. El batido se realiza en una termobatidora a 25 °C durante 20 minutos. Tras ese tiempo, se añaden 300 mL de agua caliente (50 °C) y se continúa el batido 10 minutos más. Posteriormente, se centrifuga el contenido de cada cazo por separado, en una centrifuga vertical tipo cesta que gira a 3500 rpm durante 3.5 min. Finalizada la centrifugación, se abre el

orificio central y así se recogen las fases líquidas en una probeta. Se añaden 100 mL más de agua caliente a la torta y se vuelve a centrifugar, con el objetivo de extraer la mayor cantidad de aceite. El mosto oleoso se recoge nuevamente en la probeta, mientras que el residuo sólido queda pegado a las paredes de la centrífuga. La probeta permanece en oscuridad hasta conseguir una buena separación de las fases aceite y alpechín. Se extrae el aceite de la probeta con la ayuda de una jeringuilla y se almacena en botellas de vidrio de color ámbar a 4 °C.

### 5.3.2.2. HUMEDAD DE LA PASTA DE OLIVAS

Se realiza mediante el procedimiento de secado en estufa. Sobre una balanza analítica (Mettler AJ150, Barcelona, España) se coloca una cápsula y se pesa ( $M_0$ ). Se añaden unos 10 g de la pasta de oliva bien homogeneizada y se toma el peso ( $M_h$ ). Se coloca la cápsula en una estufa de 150 °C, y transcurridas 24 horas, se deja enfriar en un desecador y se pesa ( $M_s$ ). La humedad de la pulpa se calcula haciendo uso de la siguiente fórmula:

$$\text{Humedad (\%)} = \frac{M_h - M_s}{M_h - M_0} \cdot 100$$

### 5.3.2.3. MATERIA GRASA DE LA PASTA DE OLIVAS

El contenido graso se determina por RMN sobre la pasta de olivas desecada, en muestras de aproximadamente 4 g. El equipo utilizado es un NMS 100 Minispec NMR Analyzer (Bruker Analytik, Silberstreifen, Alemania), usando el software ExpSpel versión 2.10. Para realizar la curva de calibrado, se añadió aceite de oliva en diferentes concentraciones a pasta de olivas desengrasada. Los resultados se expresan como g de aceite / kg de pasta seca.

### 5.3.2.4. 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. El procedimiento se basa en valorar la muestra de aceite disuelta en una mezcla de éter etílico y etanol (1:1, v/v) con una solución etanólica de hidróxido potásico 0.1 N hasta el viraje del indicador fenoltaleína. El peso de la muestra se toma según el grado de acidez previsto. La acidez se calcula como:

$$\text{Acidez} = \frac{(V - V_0) \cdot c \cdot M}{10 \cdot P}$$

en donde,

V: volumen de la solución etanólica de hidróxido potásico consumida (mL)

$V_0$ : volumen de la solución etanólica de hidróxido potásico consumida del blanco (mL)

c: concentración exacta de la solución etanólica de hidróxido potásico (N)

M: peso molecular del ácido en que se expresa el resultado (ácido oleico = 282.27)

P: peso de la muestra de aceite (g)

#### 5.3.2.5. ÍNDICE DE PERÓXIDOS

El contenido en peróxidos valora el estado de oxidación primaria del aceite y es la cantidad (expresada en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de aceite) de peróxidos en la muestra que ocasionan la oxidación del yoduro potásico. El yodo liberado se valora con una solución valorada de tiosulfato sódico.

En un matraz se pesan 2 g de aceite y se añaden 25 mL de una solución de cloroformo:ácido acético (10:15, v/v) y se añade 1 mL de una solución saturada de yoduro potásico. Se agita y se mantiene en la oscuridad 5 minutos. Transcurrido este tiempo, se añaden 75 mL de agua destilada y se valora el yodo liberado con una solución de tiosulfato sódico 0.01 N. Simultáneamente, se realiza una prueba en blanco.

El índice de peróxidos se calcula como:

$$IP = \frac{(V - V_0) \cdot N \cdot 1000}{P}$$

en donde,

IP: índice de peróxidos (meq de oxígeno / kg de aceite)

V: volumen de la solución de tiosulfato utilizada para la valoración (mL)

V<sub>0</sub>: volumen de la solución de tiosulfato utilizada para la valoración del blanco (mL)

N: normalidad de la solución de tiosulfato sódico

P: peso de la muestra de aceite (g)

#### 5.3.2.6. ABSORBANCIA EN EL UV (K<sub>270</sub> Y K<sub>232</sub>)

La prueba espectrofotométrica en el ultravioleta proporciona indicaciones sobre la calidad del aceite, su estado de conservación y las modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos. Es por tanto, un indicador de la oxidación secundaria del aceite.

Se determina la absorbancia en el UV a dos longitudes de onda: a 270 nm (K<sub>270</sub>) y a 232 nm (K<sub>232</sub>). Para la determinación de K<sub>270</sub>, se pesan 0.2 g de aceite y se aforan a 10 mL con ciclohexano de calidad para espectrofotometría, y se lee su absorbancia a 270 nm con ciclohexano como blanco. Para la determinación de K<sub>232</sub>, se pesa 0.1 g de aceite, se afora a 25 mL con ciclohexano y se lee su absorbancia a 232 nm.

Para él cálculo, se utiliza la siguiente fórmula:

$$K_{\lambda} = \frac{L_{\lambda}}{C \cdot e}$$

En donde,

$K_{\lambda}$ : extinción específica a una longitud de onda  $\lambda$

$L_{\lambda}$ : extinción medida a una longitud de onda  $\lambda$

C: concentración de la disolución (g de aceite/100 mL)

e: espesor de la cubeta (cm)

### 5.3.2.7. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

El método se basa en la determinación de los esteres metílicos de los ácidos grasos del aceite de oliva mediante cromatografía de gases (Reglamento CE núm 2568/91).

*Preparación de los esteres metílicos:* Se preparan por transesterificación en frío con una solución metanólica de hidróxido potásico, basándonos en la metodología oficial (Anexo XB, método A). Brevemente, en un tubo de vidrio con tapón de rosca se pesan 0.1 g de aceite, se añade  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y 2 mL de hexano. Se agita en un vórtex durante 30 segundos. A continuación se añade 0.2 mL de KOH metanólico 2 N y se agita en vórtex durante 30 segundos. Se deja reposar el tubo hasta la completa sedimentación de la glicerina y de los residuos de los reactivos. Se mantiene en refrigeración hasta el momento de la inyección del sobrenadante que es la fase que contiene los esteres metílicos.

El análisis cromatográfico se ha hecho en un cromatógrafo Agilent 5890 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), con una columna Supelco SP 2330 (Supelco, Bellefonte, PA, USA) de 30 m de longitud.

Las condiciones han sido:

- T horno: 1' a 150 °C  
Rampa de 8 °C/min hasta 200 °C  
Rampa de 3 °C/min hasta 225 °C  
1' a 225 °C
- T inyector: 250 °C
- T del detector: 300 °C
- Relación de Split 1:30.

La cuantificación se basa en el cálculo del área relativa de cada pico, teniéndose en cuenta los picos de los ácidos mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), heptadecanoico (C17:0), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), araquídico (C20:0), linolénico (C18:3), eicosenoico (C20:1) y behénico (C22:0).

### 5.3.2.8. ESTABILIDAD FRENTE A LA OXIDACIÓN

La estabilidad frente a la oxidación proporciona una buena estimación de la susceptibilidad del aceite a la degeneración autooxidativa, que conduce fundamentalmente a su enranciamiento. El método analítico consiste en someter a la muestra,  $3.0 \pm 0.1$  g de aceite a una oxidación forzada mediante una corriente de aire seco a 20 L/h y a una temperatura de 120 °C. Se utiliza un equipo Rancimat 679 (Metrohm Co., Herisau, Suiza). Fruto de la degradación del aceite, se desprenden compuestos volátiles que son retenidos en un vaso de medida que contiene agua destilada, del que se registra la conductividad a lo largo del tiempo. El resultado se expresa en horas, que es el tiempo necesario hasta llegar a un nivel fijado de conductividad (Laübli y Bruttel, 1986).

### 5.3.2.9. MEDIDA DE LAS COORDENADAS CROMÁTICAS DE COLOR

La determinación de las coordenadas cromáticas CIELAB, definidas por la "Comission de l'Éclairage" en 1974, se llevan a cabo utilizando un espectrofotómetro Macbeth Color-Eye 3000 (GretagMacbeth, Dallas, CA, USA), realizando lecturas de transmitancia a diferentes longitudes de onda con un iluminante C y un ángulo de observación de 10°. El software que controla el equipo es Optiview versión 1.1. Se obtienen las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  deducidas a partir de los valores triestímulo X, Y, Z. La luminosidad viene representada por  $L^*$  y la cromaticidad por los valores de  $a^*$  y  $b^*$ , que corresponden respectivamente el paso de verde (-) a rojo (+) y de azul (-) a amarillo (+).

### 5.3.2.10. PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS TOTALES

La determinación de los pigmentos totales es una valoración global del contenido pigmentario de los aceites. Se ha realizado según el método propuesto por Mínguez-Mosquera et al. (1991). El método consiste en determinar la absorbancia de una disolución de aceite de oliva a dos longitudes de onda características del espectro de absorción de los carotenoides y las clorofilas del aceite. La absorbancia determinada se expresa en unidades de los componentes mayoritarios de cada una de las fracciones, es decir, la feofitina-a para la fracción clorofílica y la luteína para la fracción carotenoide.

El procedimiento consiste en pesar 7.5 g de aceite filtrado en un matraz aforado de 25 mL que se enrasa con ciclohexano. Seguidamente se homogeneiza y se mide la absorbancia a 670 y 472 nm con un espectrofotómetro.

La concentración de pigmentos clorofílicos y carotenoides se calcula aplicando la siguiente expresión:

$$C = \frac{E \cdot V}{E_{1\%} \cdot P} \cdot 10000$$

siendo,

C: concentración de pigmento en la muestra (mg/kg aceite)

E: Absorbancia a  $\lambda$ : 670nm para clorofilas y  $\lambda$ : 472nm para carotenoides.

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

$E_{1\%}$ : Absorbancia específica de una solución al 1% medida en una cubeta de 1 cm. Se emplea un  $E_{1\%} = 613$  para la feofitina-a y un  $E_{1\%}=2000$  para la luteína.

P: peso de la muestra de aceite (g)

### 5.3.2.11. DETERMINACIÓN DEL PERFIL PIGMENTARIO

La metodología de extracción de pigmentos de aceite de oliva virgen y su posterior identificación y cuantificación mediante HPLC fue publicada por Mínguez-Mosquera et al. (1992) basándose en estudios de Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández (1989) para la extracción de pigmentos en la oliva.

La metodología se basa en la separación de los pigmentos y los lípidos mediante disolventes orgánicos, debido a que el alto contenido en grasas del aceite interfiere en el aislamiento y la identificación de las clorofilas. Se trata de un método muy laborioso, de alto coste en disolventes y mano de obra, que todavía se utiliza como principal técnica extractiva.

Aunque se han descrito otros métodos (Psomiadou y Tsimidou, 1998), la posibilidad de detectar pigmentos esterificados o pigmentos en muy baja concentración exige trabajar con cantidades elevadas de muestra y de disolvente.

#### 5.3.2.11.1. EXTRACCIÓN DE PIGMENTOS EN EL ACEITE

Se pesan unos 15 g de aceite y se disuelven en 150 mL de DMF (N,N-dimetilformamida) saturada con  $MgCO_3$  en un embudo de decantación de 500 mL. Se añaden 50 mL de hexano y se agita el embudo fuertemente durante 1 minuto. Se deja reposar hasta una total separación de las fases y la fase inferior (fase DMF) se vuelve a lavar con 50 mL de hexano, hasta un total de 5 veces. Tras el último lavado, se vierte la fase DMF en un embudo de 1000 mL en el que previamente se habrá introducido 400 mL de  $Na_2SO_4$  al 2% en agua a 4 °C. Se unen las fases hexano de los diferentes lavados, se mezclan con 100 mL de DMF durante 1 minuto y se deja reposar. Se vierte del embudo anterior la fase DMF al embudo de 1000 mL que contiene la mezcla DMF-solución  $Na_2SO_4$ . La DMF y el hexano fueron adquiridos en Scharlau Chemie (Barcelona, España). El  $MgCO_3$  y  $Na_2SO_4$  fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Tras este procedimiento, el contenido de los dos embudos se tratan por separado. La fase hexano contiene los carotenos y la grasa del aceite, mientras que la fase DMF contiene las clorofilas y xantofilas.

Tratamiento de la fase hexano: En el embudo se vierten unos 100 mL de solución  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  al 2% en agua a 4 °C, se agita fuerte y se dejan separar las fases. Se rechaza la fase inferior y se repite este mismo lavado 3 veces, que sirve para eliminar la humedad presente en la fase. Se filtra gota a gota a través de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y papel de filtro a un matraz de corazón, y se rotavapora con el agua del baño a menos de 28 °C hasta que el extracto quede a consistencia jarabe. En esta rotavaporación no se llega a sequedad porque está presente la grasa del aceite. Posteriormente se diluye el residuo en un volumen de 25 ó 50 mL de hexano según la intensidad del color y se realiza la lectura en el espectrofotómetro de la absorbancia del  $\beta$ -caroteno a 454 nm, utilizando en el cálculo de su concentración el valor del coeficiente de extinción  $E_{454\text{nm}}^{1\%} = 2592$  (Foppen, 1971).

Tratamiento de la fase DMF: Se vierten al embudo que contiene la fase DMF 70 mL de hexano y 70 mL de éter etílico (Scharlau Chemie, Barcelona, España), se agita durante 2 minutos y dejar reposar 30 minutos. Pasado este tiempo, se separa la fase inferior y se lava con 70 mL de éter, agitando suavemente y se deja reposar hasta la completa separación de las fases. Se separa la fase inferior acuosa y se vuelve a lavar con 70 mL de éter. Este paso se repite tantas veces como sea necesario hasta que el éter no tenga color. Se unen las fases orgánicas y se lavan 2 veces con la solución de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . La fase orgánica obtenida, se filtra gota a gota a través de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y papel de filtro a un matraz en forma de corazón. Se rotavapora a sequedad, y el residuo resultante se recoge en un volumen conocido de acetona de calidad para HPLC (Scharlau Chemie, Barcelona, España), se coloca en un eppendorf en oscuridad y se guarda a -20 °C hasta el momento de ser analizado por HPLC.

Toda esta metodología se lleva a cabo bajo luz verde para evitar la degradación de los pigmentos y por duplicado.

#### **5.3.2.11.2. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR HPLC-DAD**

El sistema cromatográfico consiste en un inyector automático Waters 717, una bomba Waters 600, un desgasificador de helio y un detector de fotodiodos Waters 996, siendo todo monitorizado por el software Empower (Waters Inc., Milford, MA, USA).

La separación se lleva a cabo mediante una columna  $\text{C}_{18}$  de fase reversa Spherisorb ODS-2 (25cm x 4.6mm, 5 $\mu\text{m}$ ; Teknokroma, Barcelona, España).

El análisis cromatográfico se lleva a cabo siguiendo el mismo procedimiento de Mínguez-Mosquera et al. (1992). Los eluyentes usados son agua: reactivo de pares iónicos:metanol (1:1:8, v/v/v) como fase A y metanol:acetona (1:1, v/v) como fase B. El reactivo de pares iónico consiste en una solución de tetrabutilamonio 0.05 M y acetato de amonio 1 M en agua. Metanol y acetona fueron adquiridos en Scharlau Chemie (Barcelona, España); el agua fue de calidad Milli-Q (Millipore Corp., Bedford, MA, USA); los reactivos tetrabutilamonio y acetato de amonio fueron provistos por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Los pigmentos, que se encuentran disueltos en acetona en el interior de los eppendorf, se centrifugan a 12000g durante 5 minutos (EBA 12 Hettich Zentrifugen, Hettich GmbH, Tuttlingen, Alemania). En el HPLC se inyecta la parte superior de la disolución, evitando así la entrada de sólidos en la muestra que interferirían en el resultado. De cada muestra, se realizan 2 inyecciones de 40  $\mu$ L y se eluyen a una velocidad de flujo de 2 mL/min, siguiendo el gradiente que se muestra en la Tabla 16.

**Tabla 16.** Condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de pigmentos en aceite de oliva mediante HPLC-DAD.

	Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B
1	0	75	25
2	8	25	75
3	10	25	75
4	18	10	90
5	23	0	100
6	30	75	25

La detección se realiza utilizando un detector de diodos programable, que permite la detección simultánea a las longitudes de onda incluidas en el rango de  $\lambda$  establecido. No existe ninguna longitud de onda común idónea para la cuantificación de todos los componentes por lo que cada uno se mide a una determinada longitud de onda en la que presenta su máximo de absorbancia.

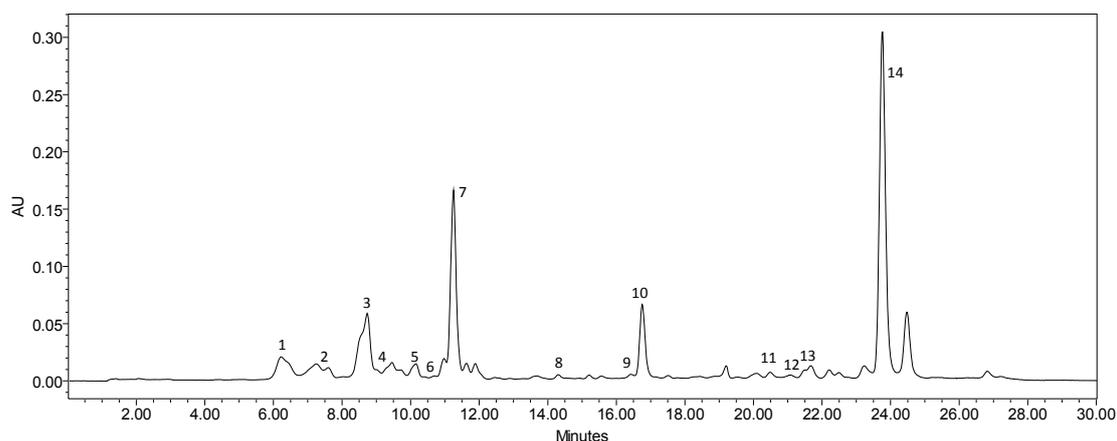
Para la identificación de los pigmentos en los cromatogramas resultantes, se tiene en cuenta el tiempo de retención y las características espectrales de cada uno de los compuestos. Las características espectrales son los máximos de absorción y la relación entre picos de los pigmentos. Aunque a un tiempo determinado se encuentre un pico, se deben comprobar las características espectrales de éste para comprobar que se corresponde con el pigmento esperado.

En la Tabla 17 se muestran las características espectrales de los distintos pigmentos. Para las clorofilas y derivados, se utiliza la relación entre la banda Soret (I) (pico de máxima absorción en la región del violeta) y la altura del pico de máxima absorción de la zona del rojo e infrarrojo cercano (III). Para los carotenoides, se utiliza la altura de la banda de absorción a la longitud de onda mayor (III) como porcentaje de la altura de la banda intermedia (II), que normalmente es el máximo de absorción, considerando como base el mínimo de estos dos picos (Davies, 1976).

**Tabla 17.** Características espectrales de los distintos pigmentos cloroplásticos según el sistema de HPLC-DAD empleado para la separación de pigmentos en aceite de oliva.

	Pigmento	Máximos absorción (nm)			Relación entre máximos	
		I	II	III	I/III	100III/II
1	Feofórbido-a	409	508	666	2.2	
2	Neoxanteno	414	438	466		90
3	Violaxanteno	417	440	471		96
4	Luteoxanteno	400	423	450		105
5	Anteraxanteno	(425)	446	474		84
6	Mutatoxanteno	(408)	429	454		39
7	Luteína	424	446	474		91
8	Clorofila-b	466	602	650	3.3	
9	$\beta$ -criptoxanteno	(431)	452	479		25
10	Clorofila-a	432	619	666	1.1	
11	Violaxanteno monoesterificado	417	440	471		96
12	Feofitina-b	435	601	654	3.5	
13	Neoxanteno esterificado	414	438	466		90
14	Feofitina-a	409	505	666	2.5	

A modo de ejemplo, en la Figura 16 se muestra un cromatograma de pigmentos de aceite de oliva *Arbequina* a 410 nm.

**Figura 16.** Cromatograma HPLC-DAD ( $\lambda = 410$  nm) del extracto de pigmentos clorofílicos y xantofilas del aceite de oliva de la variedad *Arbequina*. Consultar la tabla 17 para identificar los picos.

### 5.3.2.11.3. OBTENCIÓN DE PATRONES

La cuantificación se ha hecho con patrón externo, utilizando como pigmentos productos comerciales de  $\beta$ -caroteno, clorofila-a y clorofila-b (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y productos sintetizados en el laboratorio según la metodología descrita en Criado (2005). Así, han sido sintetizados pigmentos a partir de clorofilas comerciales (feofitinas, feoforbidos y clorofilidas) o han sido extraídos de espinaca (luteína, violaxanteno y neoxanteno) y pimiento rojo maduro (anteraxanteno y  $\beta$ -criptoxanteno). El luteoxanteno y el mutatoxanteno han sido obtenidos a partir de violaxanteno y anteraxanteno, respectivamente.

### 5.3.2.12. CONTENIDO EN FENOLES TOTALES (FOLIN)

Es un método rápido para la determinación de fenoles totales en el aceite. Se realiza siguiendo el método de Vázquez-Roncero et al. (1973), que consta de dos partes: la extracción de los fenoles de la muestra y su posterior determinación colorimétrica. Se disuelven 10 g de aceite en 50 mL de hexano y se extraen un total de 3 veces con 10 mL de una solución metanol:agua 60:40 (v/v), agitando durante 2 minutos en cada extracción. Se recoge la fase hidroalcohólica en un matraz de 25 mL que se enrasa con agua destilada. Los disolventes hexano y metanol fueron adquiridos en Scharlau Chemie (Barcelona, España).

Para la determinación colorimétrica, en un matraz aforado de 50 mL se adicionan 35 mL de agua destilada, 5 mL del extracto de fenoles y 2.5 mL de reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), se agita y se deja reposar 3 minutos. Posteriormente, se añaden 5 mL de una solución saturada de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , se enrasa con agua destilada, se agita y se deja reposar 1 hora en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se mide la absorbancia a 725 nm de una alícuota filtrada, y usando como blanco una muestra preparada de la misma manera, pero sin adicionar extracto de fenoles.

Para la cuantificación, se realiza una curva de calibrado siguiendo el mismo procedimiento, pero con disoluciones de ácido cafeico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a diferentes concentraciones. Los resultados se expresan como mg de ácido cafeico / kg aceite.

El contenido en fenoles totales se calcula de la forma siguiente:

$$FT = \frac{a \cdot L \cdot V_1 \cdot V_2}{V_3 \cdot P}$$

siendo,

FT: contenido en fenoles totales (mg de ácido cafeico/kg aceite)

a: pendiente de la curva de calibrado del ácido cafeico ( $(\mu\text{g de ácido cafeico/mL})/Abs_{725\text{nm}}$ )

L: Absorbancia leída a 725 nm

$V_1$ : volumen de extracto fenólico realizado (25 mL)

$V_2$ : volumen del matraz utilizado para la colorimetría (50 mL)

V<sub>3</sub>: volumen de extracto de fenoles añadido a la colorimetría (5 mL)

P: peso de la muestra de aceite (g)

### **5.3.2.13. DETERMINACIÓN DEL PERFIL FENÓLICO**

#### **5.3.2.13.1. EXTRACCIÓN POR EL MÉTODO A**

Los extracción de los compuestos fenólicos del aceite se realiza mediante una extracción líquido-líquido siguiendo el método descrito por Romero et al. (2002) con algunas modificaciones. Se mezclan 45 g de aceite con 20 mL de una solución metanol:agua 80:20 (v/v) y se homogeneizan mediante Polytron durante 2 minutos. Seguidamente, se centrifuga a 640 g durante 10 minutos para separar la fase hidroalcohólica de la fase aceite, y se vuelve a repetir el mismo proceso dos veces más. Las fases hidroalcohólicas se unen en un matraz y se rotavaporan hasta que el extracto toma una textura siruposa. A continuación, el extracto se redissuelve con 5 mL de acetonitrilo y se desengrasa 3 veces con 20 mL de *n*-hexano. La fase hexano rechazada se reextrae con 5 mL de acetonitrilo. Se unen las fases acetonitrilo y se rotavaporan a sequedad para eliminar el disolvente orgánico. El extracto se redissuelve en 2.5 mL de metanol y se guarda en un tubo cerrado a -40 °C hasta el momento de su análisis. Los disolventes metanol, acetonitrilo y *n*-hexano fueron adquiridos en Scharlau Chemie (Barcelona, España).

#### **5.3.2.13.2. EXTRACCIÓN POR EL MÉTODO B (Método COI)**

Resulta complejo comparar resultados del análisis de los compuestos fenólicos con datos bibliográficos, dada la diversidad encontrada en la técnica de extracción y de cuantificación. El método COI/T.20/Doc núm 29, propuesto por el Consejo Oleícola Internacional (COI), intenta solventar este problema. Para ello, se pesan 2.0 g de aceite en un tubo de ensayo, se le añade 1 mL de una solución de ácido sírónico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) de 0.015 mg/mL en metanol:agua (80:20, v/v) que se utiliza como patrón interno (IS) y se agita durante 30 segundos en vórtex. Seguidamente, se le añaden 15 mL de una solución metanol:agua (80:20, v/v) y se agita durante 1 minuto en vórtex. Posteriormente, se coloca el tubo en el baño de ultrasonidos durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se centrifuga a 5000 rpm durante 25 minutos, se toma una alícuota del sobrenadante y se filtra a través de filtro PVDF de 0.45 µm (Teknokroma, Barcelona, España). El extracto se guarda en un tubo cerrado a -40 °C hasta el momento de su análisis. El metanol fue adquirido en Scharlau Chemie (Barcelona, España).

#### **5.3.2.13.3. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR HPLC-DAD**

Para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos extraídos del aceite, se utiliza el equipo de HPLC descrito anteriormente en el apartado 5.3.2.11.2.

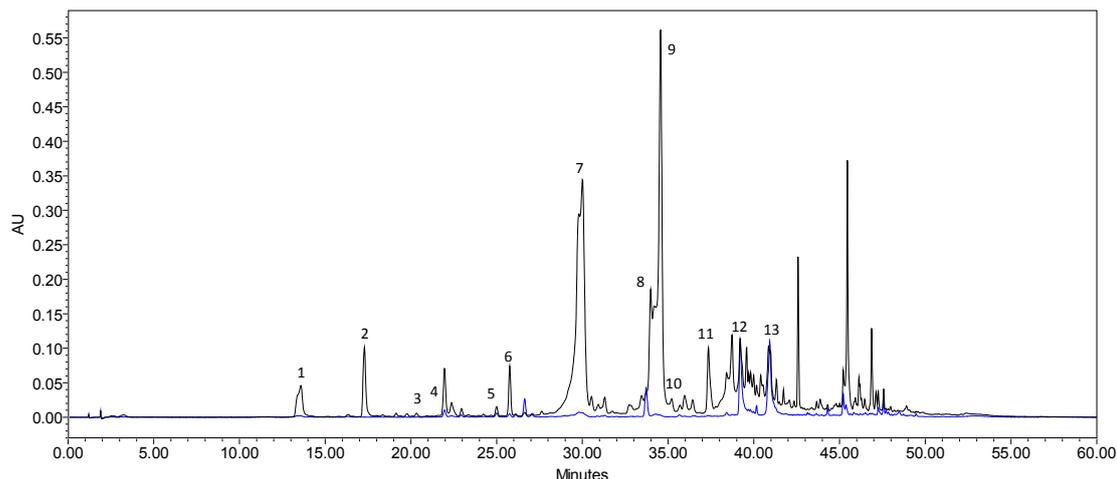
La columna utilizada es una Inertsil ODS-3 (15 cm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m; GL Sciences Inc., Torrance, CA, USA) equipada con una precolumna Spherisorb S5 ODS-2 (1 cm x 4.6 mm, 5  $\mu$ m; Tecknokroma, Barcelona, España). Se trabaja a un flujo de 1.5 mL/min y la fase móvil es agua con ácido acético al 0.2% (fase A) y metanol (fase B). El ácido acético y el metanol fueron adquiridos en Scharlau Chemie (Barcelona, España). El volumen de inyección es 20  $\mu$ L. El gradiente es el que se puede observar en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de fenoles mediante HPLC-DAD.

	Tiempo (min)	% Fase A	% Fase B
1	0	95	5
2	2	95	5
3	10	75	25
4	20	60	40
5	30	50	50
6	40	0	100
7	45	0	100
8	55	95	5
9	60	95	5

Los cromatogramas son obtenidos a 278 nm y 339 nm (339 nm para los flavonoides y 278 nm para el resto de compuestos fenólicos). La identificación se realiza mediante el tiempo de retención y los máximos de absorbancia característicos para cada compuesto. Para ello, se utilizan patrones comerciales en el caso de compuestos en que se dispones de ellos, como hidroxitirosol, tirosol, vainillina, luteolina y apigenina (Extrasynthese, Genay, Francia), ácido vainílico (Fluka, Buchs, Suiza) y ácido *p*-cumárico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). El resto de compuestos fenólicos se obtienen por cromatografía semipreparativa siguiendo el métodos descritos por Artajo et al. (2006) y Suárez et al. (2009), y por los descritos anteriormente en los apartados 5.3.1.7.3.1. y 5.3.1.7.3.2.

A modo de ejemplo, en la Figura 17 se muestra un cromatograma HPLC-DAD de un extracto de fenoles de aceite de oliva *Arbequina* a 278nm y 339 nm. Los picos identificados son 1: hidroxitirosol; 2: tirosol; 3: ácido vainílico; 4: vainillina; 5: ácido *p*-cumárico; 6: 3,4-DHPEA-AC; 7: 3,4-DHPEA-EDA; 8: *p*-HPEA-EDA; 9: lignanos; 10: *p*-HPEA-EA; 11: 3,4-DHPEA-EA; 12: luteolina; 13: apigenina.



**Figura 17.** Cromatograma HPLC-DAD ( $\lambda = 278$  nm en negro,  $\lambda = 339$  nm en azul) del extracto de fenoles del aceite de oliva de la variedad *Arbequina*.

#### 5.3.2.13.4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN POR HPLC-ESI-MS/MS

Para la identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos extraídos del aceite, se utiliza el equipo de HPLC-ESI-MS/MS descrito anteriormente en el apartado 5.3.1.7.2.

La columna utilizada es una Sunfire  $C_{18}$  (4.5 x 150 mm, 3.5  $\mu\text{m}$ ) de Waters. Durante el análisis, la columna se mantiene a 30  $^{\circ}\text{C}$  y el flujo es 0.8 mL/min. Las fases móviles son una mezcla de agua: ácido acético (100:0.2 v/v) como fase A y acetonitrilo como fase B. El ácido acético fue adquirido en Scharlau Chemie (Barcelona, España) y el acetonitrilo fue de Romil Chemical Ltd. (Heidelberg, Alemania). El volumen de inyección es 10  $\mu\text{L}$  y todas las muestras se filtran previamente por membranas de 0.22  $\mu\text{m}$  de PVDF (Teknokroma, Barcelona, España). El gradiente es el mismo que el utilizado en el apartado anterior. El resto de condiciones de trabajo son las descritas en el apartado 5.3.1.7.2.

#### 5.3.2.14. DETERMINACIÓN DE $\alpha$ -TOCOFEROL

El contenido en  $\alpha$ -tocoferol de los aceites se ha determinado mediante HPLC según el método descrito por Romero et al. (2003). Se realiza una inyección directa de 20  $\mu\text{L}$  de una solución de aceite en hexano (1.5 g de aceite en 10 mL de hexano) en una columna Supelcosil LC-NH<sub>2</sub> (25cm x 4.6mm, 5 $\mu\text{m}$ ; Supelco, PA, USA). El flujo es de 1 mL/min y las fases móviles son hexano y acetato de etilo (70:30, v/v) en isocrático. El hexano y el acetato de etilo fueron provistos por Scharlau Chemie (Barcelona, España). La detección se realiza a 295 nm. Para la cuantificación, se realiza una curva patrón con  $\alpha$ -tocoferol comercial (Acros Organics, Geel, Bélgica) en las mismas condiciones de trabajo.

### 5.3.2.15. ANÁLISIS SENSORIAL

Las muestras han sido evaluadas sensorialmente por un grupo de catadores expertos, basándose en la metodología COI. Brevemente, los jueces reciben la muestra de aceite en una copa azul a 28 °C y evalúan la intensidad de los defectos atrojado, avinado, rancio y de los atributos frutado verde y/o maduro, amargo y picante. Además se invita a los jueces a evaluar otros atributos que sean capaces de detectar. Para la cuantificación de la intensidad de los atributos se utiliza una escala lineal no estructurada, cuya longitud total se hace corresponder con una puntuación de 10.

### 5.3.2.16. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO ORAC

El método ORAC se basa en la inhibición de la oxidación de un sustrato fluorescente en presencia de antioxidantes. Dicha oxidación es inducida por el radical peroxil que se forma por descomposición térmica de compuestos azo. Se ha seguido el procedimiento descrito en Prior et al. (2003), quienes utilizan la fluoresceína (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) como sustrato fluorescente y el 2,2'- azobis (2- amidino- propano) dihydrochloride (AAPH) (Acros Organics, Geel, Bélgica) como oxidante. El ensayo genera una curva de fluorescencia en función del tiempo que permite comparar la actividad del extracto ensayado con la mostrada por una sustancia patrón de referencia, generalmente Trolox.

Los análisis de han llevado a cabo en un espectrofluorómetro FLUORStar Optima (BMG Labtechnologies GmbH, Offenburg, Alemania) en placas de 96 pocillos a 37 °C, siendo las condiciones de excitación y emisión de 485 y 520 nm, respectivamente. En el ensayo se han preparado curvas con Trolox (Acros Organics, Geel, Bélgica) que comprenden un rango de concentración de 10 a 150  $\mu\text{M}$  y diluciones de extractos fenólicos que equivalen a concentraciones de aceite de oliva 300  $\mu\text{g/mL}$  a 1200  $\mu\text{g/mL}$ . La relación entre las pendientes de las curvas del área neta bajo la curva (AUC) en función de la concentración permite expresar la actividad antioxidante del aceite de oliva en equivalentes de Trolox/100 g de aceite.

### 5.3.3. MÉTODOS ESTADÍSTICOS

Los datos han sido sometidos a un análisis estadístico con la hoja de cálculo del programa Microsoft Excel y los paquetes estadísticos Statgraphics (StatPoint Technologies, Warrenton, VA, USA) y/o SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) en función de la complejidad del tratamiento. Los procedimientos aplicados han sido los cálculos estadísticos básicos (media, desviación estándar), las regresiones y el análisis de la varianza.





## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 6.1. METABOLITOS IMPLICADOS EN LA ACUMULACIÓN DE OLEUROPEÍNA Y SU DEGRADACIÓN EN FRUTOS DE *OLEA EUROPAEA* L. EN LAS VARIEDADES *HOJIBLANCA* Y *ARBEQUINA*

En la oliva, la oleuropeína es el compuesto fenólico mayoritario, sobretodo en las primeras fases de la maduración. Sin embargo, a medida que el fruto madura, el contenido en oleuropeína disminuye, mientras que el contenido en sus derivados aumenta. Pocos trabajos se han encargado de las rutas y los metabolitos implicados en la formación de oleuropeína. En este estudio se pretende establecer qué compuestos actúan como precursores de la oleuropeína y cuáles son productos de su degradación y las rutas y enzimas implicadas.

Este estudio se llevó a cabo en colaboración con las investigadoras Gutiérrez-Rosales y Mínguez-Mosquera del Instituto de la Grasa, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) de Sevilla. Se utilizaron frutos de dos variedades, *Hojiblanca* y *Arbequina*, cultivadas en la Estación Experimental de Cabra (Córdoba), tal y como se explica en el apartado 5.1.4.1. de Material y métodos.

### 6.1.1. Desarrollo del fruto

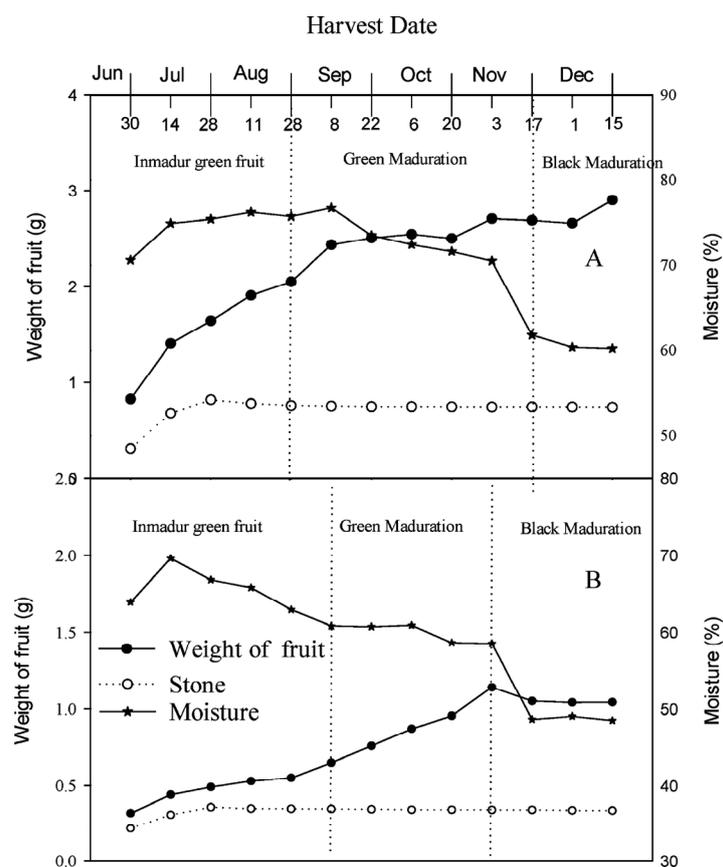
A lo largo del estudio, con un total de 13 muestreos, se tomaron muestras de fruto y se determinó su peso medio (g), el peso medio del hueso (g) y su humedad (%), en función de su fecha de recolección (Figura 18). La evolución de estos parámetros ha servido para establecer tres estados o fases de maduración diferentes, dependiendo del incremento de peso, la humedad y el color del fruto.

El primer estado de maduración corresponde a un fruto inmaduro, cuando la piel era de un color verde intenso. En la variedad *Hojiblanca*, este periodo fue del 30 de junio al 28 de agosto, mientras que en la variedad *Arbequina* fue del 30 de junio al 8 de septiembre.

El segundo estado de maduración corresponde a la maduración verde, en que la piel del fruto es de un color verde claro o amarillo. En la variedad *Hojiblanca* este periodo fue hasta el 17 de noviembre y en la variedad *Arbequina* hasta el 3 de noviembre.

El tercer estado de maduración, que se ha llamado maduración negra, va desde que empieza el envero del color de la piel hacia rojizos, pasando por el color violeta y hasta que toda la piel de la oliva es de color negro.

En las gráficas se puede observar como el porcentaje de humedad durante todo el estudio fue mayor en los frutos de *Hojiblanca* que en los de *Arbequina*. Ya en el primer muestreo, el porcentaje en *Hojiblanca* fue del 70%, mientras que el de *Arbequina* fue del 63.9%. Estos valores de humedad fueron disminuyendo a lo largo de los muestreos, hasta alcanzar el valor final de 60% en *Hojiblanca* y 48% en *Arbequina*.



**Figura 18.** Cambios en el peso del fruto y del hueso (g) y en la humedad (%) durante los diferentes estados de maduración de las variedades *Hojiblanca* (A) y *Arbequina* (B).

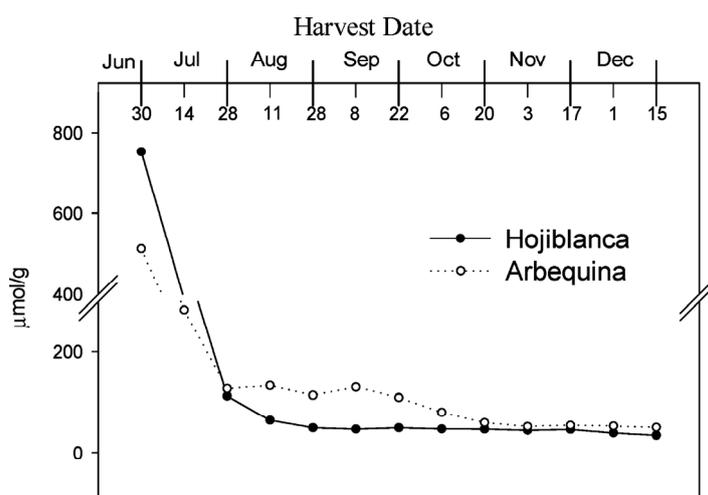
El peso, tanto del fruto como del hueso, fue siempre menor en *Arbequina* que en *Hojiblanca*. Los frutos de *Hojiblanca* aumentaron su peso rápidamente durante la etapa de fruto inmaduro, pasando de 0.83 g a 2 g al final de ésta (28 de agosto). Posteriormente, continuaron un crecimiento más lento durante los estados de maduración verde y de maduración negra, alcanzando al final del estudio un peso de 3 g. Los frutos de la variedad *Arbequina* crecieron de una manera más sosegada durante la fase de fruto inmaduro, partiendo de un peso de 0.32 g. Sin embargo, su peso se fue incrementando paulatinamente hasta el final de la maduración verde, momento a partir del cual se estabilizó e incluso disminuyó ligeramente durante el estado de maduración negra, con un valor final de 1 g. En ambas variedades, el hueso creció rápidamente durante los tres primeros muestreos estabilizándose después su peso hasta el final del experimento.

### 6.1.2. Cambios metabólicos durante la acumulación y la degradación de oleuropeína. Implicación de la enzima $\beta$ -glucosidasa

Para la detección y cuantificación de los compuestos fenólicos, se utilizó la metodología explicada en el apartado 5.3.1.7. de Material y métodos. En esta experiencia se decidió

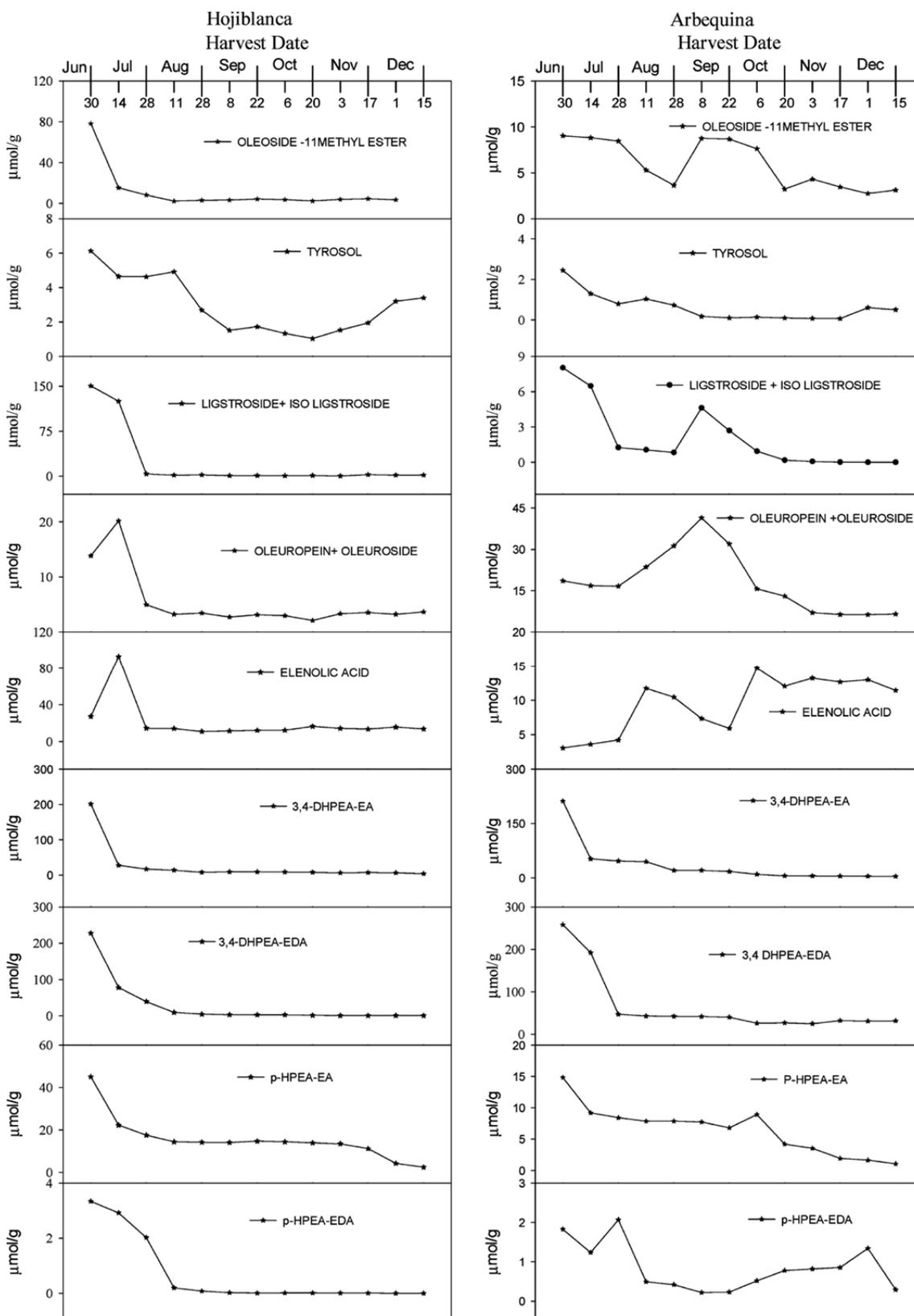
cuantificar todos los compuestos como oleuropeína. Para ello, a partir de las abundancias obtenidas en el análisis cromatográfico para el patrón comercial de oleuropeína y el estándar interno (ácido *p*-hidroxifenilacético), se realizó una curva de calibrado  $y=a + bx$ , donde  $y$  es el ratio entre las abundancias (oleuropeína/IS) y  $x$  es la concentración en oleuropeína. Las concentraciones de los compuestos fenólicos se calcularon interpolando sus ratios de abundancias (compuesto fenólico/IS) en la curva de calibrado de la oleuropeína. La curva de calibrado se obtuvo analizando cinco concentraciones diferentes. Para establecer el balance de masas y normalizar los datos, para cada compuesto individualmente, los resultados se expresan como  $\mu\text{mol}$  compuesto/g de pulpa seca.

En la Figura 19 se muestra los valores de la suma de fenoles (en  $\mu\text{mol/g}$  de pulpa seca) para las dos variedades a lo largo de los muestreos. Se observa como el contenido fenólico disminuyó bruscamente durante el primer estado de maduración, hasta el 28 de julio en ambas variedades. En esa fase, la concentración en compuestos fenólicos en el fruto disminuyó un 85% en *Hojiblanca* (de 753.7 a 112.2  $\mu\text{mol/g}$ ) y un 75% en *Arbequina* (de 511.6 a 126.2  $\mu\text{mol/g}$ ). En los muestreos posteriores, el contenido en fenoles totales disminuyó poco, mostrándose estable hacia el final del estudio.



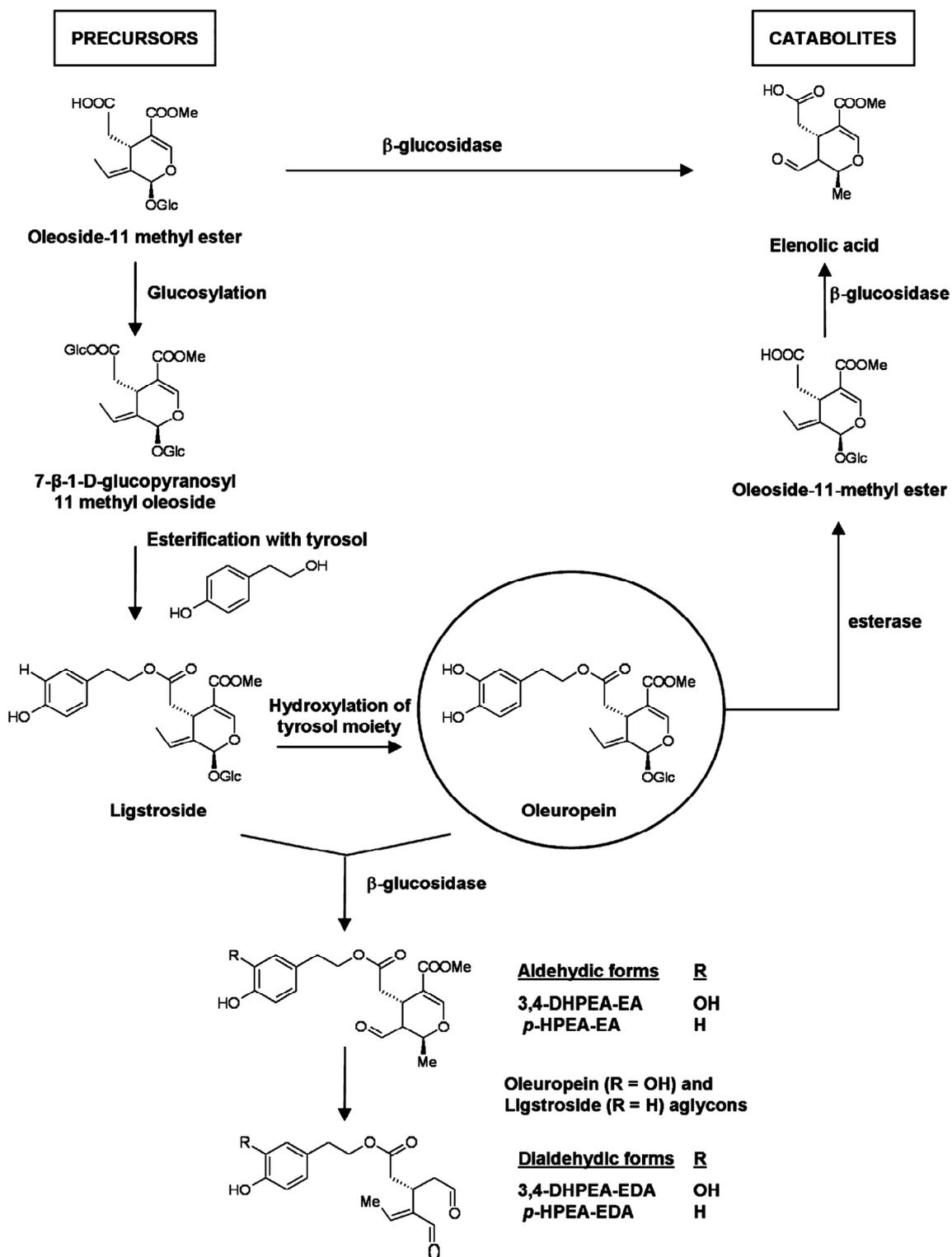
**Figura 19.** Cambios en el contenido fenólico total durante el ciclo vegetativo de los frutos ( $\mu\text{mol/g}$  de pulpa seca) de las variedades *Hojiblanca* y *Arbequina*. Cada valor representa la media  $\pm$  desviación estándar relativa (RSD). RSD<10%.

En la Figura 20 se muestra la evolución del contenido de los fenoles implicados en el metabolismo de la oleuropeína (expresado en  $\mu\text{mol/g}$  de pulpa seca), incluyendo sus precursores oleósido-11-metil ester, tirosol, ligustrósido, oleuropeína + oleurósido, y sus compuestos derivados de la actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, ácido elenólico, oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EA), su forma dialdehídica (3,4-DHPEA-EDA), ligustrósido aglicona (*p*-HPEA-EA) y su forma dialdehídica (*p*-HPEA-EDA), en los frutos de ambas variedades.



**Figura 20.** Cambios en la concentración en compuestos fenólicos ( $\mu\text{mol/g}$  de pulpa seca) implicados en las rutas de síntesis y degradación durante el ciclo vegetativo de los frutos de las variedades *Hojiblanca* y *Arbequina*. Cada valor representa la media  $\pm$  RSD. RSD<10%.

En la Figura 21 se muestran las rutas de anabolismo y catabolismo para la síntesis de oleuropeína de acuerdo con los resultados de esta experiencia.



**Figura 21.** Reacciones propuestas para la implicación de β-glucosidasa en el metabolismo de la oleuropeína en frutos de las variedades *Hojiblanca* y *Arbequina*.

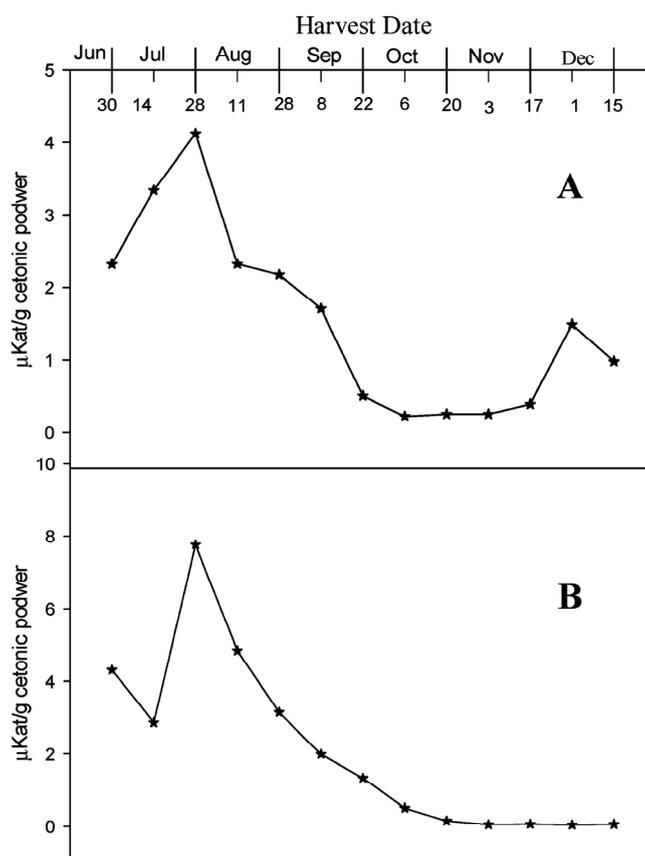
Según la ruta propuesta por Damtoft et al. (1993, 1995a), la oleuropeína se sintetiza a partir del compuesto de 7-cetologanina, compuesto derivado del ácido desoxilogánico, a través de oleósido-11-metil ester (Figura 14). Oleósido-11-metil ester es convertido por glucosilación a 7- $\beta$ -1-D-glucopiranosil-11-metil oleósido, que cuando es esterificado con tirosol forma ligustrósido. Cuando ligustrósido es hidroxilado, se forma oleuropeína. Los precursores 7-cetologanina y 7- $\beta$ -1-D-glucopiranosil-11-metil oleósido fueron detectados en esta experiencia, pero no fue posible su cuantificación porque sus concentraciones estaban por debajo de los límites de cuantificación, de acuerdo con la recta de calibración de la oleuropeína. Sin embargo, sí se realizó un seguimiento de las concentraciones del resto de compuestos precursores y de los compuestos producto de la degradación enzimática de la oleuropeína a lo largo del estudio, tal y como se muestra en la Figura 20.

#### **6.1.2.1. Variedad *Hojiblanca***

Los valores máximos de concentración en esta variedad se obtuvieron en el primer muestreo para todos los compuestos, excepto para oleuropeína+oleurósido y el ácido elenólico, cuyos valores máximos fueron en el segundo muestreo. En fechas posteriores, todos los compuestos excepto tirosol, disminuyeron rápidamente su concentración. La concentración de los precursores de oleuropeína cuantificados (oleósido-11-metil ester, tirosol y ligustrósido) disminuyó del primer al segundo muestreo, lo que concuerda con el incremento en la concentración de oleuropeína. Posteriormente, todos los contenidos de fenoles determinados, incluida oleuropeína, descendieron hasta alcanzar concentraciones que se mantuvieron estables hasta el final del estudio. Sólo la concentración del compuesto tirosol mostró algunos incrementos en los muestreos finales del estudio, pero no llegan a ser valores tan altos como los iniciales. Estos resultados muestran que la síntesis neta de fenoles sólo ocurre cuando el fruto es inmaduro.

En la Figura 22A se muestra los valores de la actividad  $\beta$ -glucosidásica en los frutos de *Hojiblanca* a lo largo del estudio, expresados en  $\mu\text{kat/g}$  de polvo acetónico. Esta enzima hidroliza oleuropeína y ligustrósido para formar sus correspondientes formas agliconas, 3,4-DHPEA-EA y *p*-HPEA-EA, respectivamente. Durante las fases del estudio, siempre existió actividad enzimática, aunque entre el muestreo del 22 de septiembre y el del 17 de noviembre, en el estado de maduración verde, sus valores fueron cercanos a cero. Durante la fase de fruto inmaduro, se observó un incremento en la actividad enzimática hasta lograr un valor máximo de 4  $\mu\text{kat/g}$  en el muestreo del 28 de julio (muestreo 3). Esta alta actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en los primeros muestreos concuerda con las altas concentraciones de las formas agliconas de oleuropeína. La alta actividad de la  $\beta$ -glucosidasa endógena y su alta especificidad por la molécula de oleuropeína (Capasso et al., 1996; Romero-Segura et al., 2009) contradice la síntesis de oleuropeína observada en este estudio. Probablemente, el contenido máximo de oleuropeína se haya producido en un momento anterior al primer muestreo, en donde se haya producido la síntesis de oleuropeína a la vez que la formación de las formas agliconas por

acción de  $\beta$ -glucosidasa. En consecuencia, los altos niveles detectados de 3,4-DHPEA-EA y 3,4-DHPEA-EDA (Tablas 19 y 20) podrían haber sido formados en un momento anterior a partir de oleuropeína por acción de la enzima. De una manera similar, la rápida disminución en el contenido de ligustrósido (de 125 a 3.7  $\mu\text{mol/g}$ ) para la producción de sus correspondientes formas agliconas también habría tenido lugar por la actividad  $\beta$ -glucosidásica. La alta actividad catabólica inicial explicaría la baja concentración en oleuropeína respecto a las altas concentraciones de 3,4-DHPEA-EA (201.2  $\mu\text{mol/g}$ ) y 3,4-DHPEA-EDA (227.9  $\mu\text{mol/g}$ ). El ácido elenólico se habría formado a partir de oleósido-11-metil ester por la acción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa (Obied et al., 2007).



**Figura 22.** Cambios en la actividad  $\beta$ -glucosidasa ( $\mu\text{kat/g}$  de polvo acetónico) durante el ciclo vegetativo del fruto de las variedades *Hojiblanca* (A) y *Arbequina* (B). Cada valor representa la media  $\pm$ RSD. RSD<5%.

**Tabla 19.** Concentraciones individuales y totales de las formas agliconas de oleuropeína y ligustrósido durante el ciclo vegetativo del fruto del olivo *Olea europaea* L. de las variedades *Hojiblanca* y *Arbequina*.\*

Fecha de muestreo	Concentración (μmol/g)					
	<i>Hojiblanca</i>			<i>Arbequina</i>		
	3,4-DHPEA-EA	<i>p</i> -HPEA-EA	Total	3,4-DHPEA-EA	<i>p</i> -HPEA-EA	Total
30 junio	201.06 ± 10.27 a	45.04 ± 3.20 a	246.10 ± 12.46 a	196.41 ± 9.25 a	18.17 ± 1.36 b	214.58 ± 13.21 a
14 julio	27.78 ± 1.77 c	22.23 ± 1.60 c	50.01 ± 3.18 b	45.51 ± 3.09 b	10.75 ± 0.78 d	56.26 ± 3.27 b
28 julio	17.02 ± 1.01 e	17.59 ± 1.27 e	34.61 ± 2.10 c	40.18 ± 2.78 d	9.72 ± 0.73 f	49.91 ± 3.20 d
11 agosto	14.16 ± 0.82 g	14.38 ± 1.04 g	28.54 ± 1.79 e	38.28 ± 2.60 f	8.98 ± 0.67 h	47.26 ± 2.81 f
28 agosto	8.10 ± 0.52 i	14.22 ± 1.05 i	22.32 ± 1.46 g	15.18 ± 1.03 h	9.02 ± 0.68 j	24.21 ± 1.53 g
8 septiembre	9.29 ± 0.56 k	14.04 ± 1.07 k	23.33 ± 1.51 h	15.51 ± 1.04 j	8.82 ± 0.63 l	24.33 ± 1.75 h
22 septiembre	9.31 ± 0.55 m	14.74 ± 1.08 m	24.05 ± 1.60 i	12.71 ± 0.96 l	7.58 ± 0.55 n	20.29 ± 1.03 j
6 octubre	8.84 ± 0.49 o	14.36 ± 1.05 o	23.20 ± 1.39 k	5.41 ± 0.46 n	10.40 ± 0.79 p	15.81 ± 0.98 l
20 octubre	7.96 ± 0.43 q	13.95 ± 1.03 q	21.91 ± 1.06 m	1.41 ± 0.10 p	4.19 ± 0.31 r	5.60 ± 0.43 n
3 noviembre	6.45 ± 0.38 s	13.45 ± 1.01 s	19.90 ± 0.98 o	1.06 ± 0.08 r	3.28 ± 0.24 t	4.34 ± 0.28 p
17 noviembre	7.86 ± 0.41 u	11.20 ± 0.83 u	19.06 ± 0.89 q	0.58 ± 0.03 v	1.18 ± 0.09 v	1.77 ± 0.09 r
1 diciembre	6.60 ± 0.36 x	4.20 ± 0.31 x	10.80 ± 0.76 s	0.26 ± 0.02 y	0.80 ± 0.06 y	1.06 ± 0.05 t
15 diciembre	4.03 ± 0.28 w	2.40 ± 0.21 w	6.43 ± 0.58 u	0.07 ± 0.01 z	0.02 ± 0.01 z	0.09 ± 0.01 v

\*En cada valor se representa la media ± RSD. Cada valor es la media de dos determinaciones. Valores con diferentes letras para un mismo compuesto indican diferencias significativas (Test de Rango Múltiple de Tukey,  $P < 0.05$ ).

**Tabla 20.** Concentraciones individuales y totales de las formas agliconas dialdehídicas de oleuropeína y ligustrósido durante el ciclo vegetativo del fruto del olivo *Olea europaea* L. de las variedades *Hojiblanca* y *Arbequina*.\*

Fecha de muestreo	Concentración ( $\mu\text{mol/g}$ )					
	<i>Hojiblanca</i>			<i>Arbequina</i>		
	3,4-DHPEA-EDA	<i>p</i> -HPEA-EDA	Total	3,4-DHPEA-EDA	<i>p</i> -HPEA-EDA	Total
30 junio	227.97 $\pm$ 15.50 a	3.34 $\pm$ 0.24 a	231.31 $\pm$ 13.21 a	258.32 $\pm$ 16.79 a	1.16 $\pm$ 0.09 b	259.48 $\pm$ 14.25 a
14 julio	78.05 $\pm$ 6.09 c	2.91 $\pm$ 0.21 c	80.96 $\pm$ 6.13 b	192.45 $\pm$ 12.09 b	0.73 $\pm$ 0.06 d	193.18 $\pm$ 12.45 c
28 julio	39.50 $\pm$ 2.45 e	2.02 $\pm$ 0.15 e	41.52 $\pm$ 2.98 d	47.22 $\pm$ 2.83 d	1.33 $\pm$ 0.11 f	48.55 $\pm$ 3.01 e
11 agosto	9.23 $\pm$ 0.63 g	0.20 $\pm$ 0.01 g	9.43 $\pm$ 0.58 f	12.87 $\pm$ 2.74 f	0.21 $\pm$ 0.02 g	43.08 $\pm$ 2.89 g
28 agosto	4.63 $\pm$ 0.31 i	0.08 $\pm$ 0.01 h	4.71 $\pm$ 0.24 h	42.19 $\pm$ 2.74 h	0.16 $\pm$ 0.01 i	42.35 $\pm$ 2.15 i
8 septiembre	3.38 $\pm$ 0.23 k	0.02 $\pm$ 0.01 j	3.40 $\pm$ 0.25 j	42.02 $\pm$ 2.73 j	0.01 $\pm$ 0.01 j	42.03 $\pm$ 2.12 k
22 septiembre	2.96 $\pm$ 0.20 m	0.01 $\pm$ 0.01 k	2.97 $\pm$ 0.19 l	40.21 $\pm$ 2.65 l	0.02 $\pm$ 0.01 k	40.23 $\pm$ 1.98 m
6 octubre	2.72 $\pm$ 0.18 o	0.01 $\pm$ 0.01 l	2.73 $\pm$ 0.15 n	25.99 $\pm$ 1.74 n	0.23 $\pm$ 0.01 m	26.22 $\pm$ 1.78 o
20 octubre	1.65 $\pm$ 0.11 q	0.02 $\pm$ 0.01 n	1.67 $\pm$ 0.10 p	26.96 $\pm$ 1.83 p	0.41 $\pm$ 0.03 o	27.37 $\pm$ 1.81 q
3 noviembre	1.04 $\pm$ 0.07 s	0.01 $\pm$ 0.01 p	1.05 $\pm$ 0.09 r	25.16 $\pm$ 1.71 r	0.44 $\pm$ 0.03 q	25.60 $\pm$ 1.67 s
17 noviembre	0.76 $\pm$ 0.05 u	0.01 $\pm$ 0.01 s	0.77 $\pm$ 0.03 t	32.32 $\pm$ 2.20 t	0.47 $\pm$ 0.04 r	32.79 $\pm$ 2.03 u
1 diciembre	0.75 $\pm$ 0.06 y	0.00 u	0.75 $\pm$ 0.03 x	30.93 $\pm$ 2.13 v	0.81 $\pm$ 0.05 t	31.74 $\pm$ 2.01 y
15 diciembre	0.74 $\pm$ 0.06 z	0.00 x	0.74 $\pm$ 0.03 w	31.58 $\pm$ 2.17 w	0.06 $\pm$ 0.01 v	31.64 $\pm$ 1.92 z

\*En cada valor se representa la media  $\pm$  RSD. Cada valor es la media de dos determinaciones. Valores con diferentes letras para un mismo compuesto indican diferencias significativas (Test de Rango Múltiple de Tukey,  $P < 0.05$ ).

La enzima  $\beta$ -glucosidasa está implicada en varios puntos de las rutas anabólicas y catabólicas de la biosíntesis de la oleuropeína, y como consecuencia de su alta actividad observada durante la fase de fruto inmaduro, la ruta catabólica es más activa que la anabólica, limitando así la eficacia en la formación de oleuropeína. Cuando la fase de la formación de compuestos fenólicos se ha completado, la capacidad biosintética disminuye y existe una disminución en los niveles de concentración de todos los compuestos (Figura 20). La brusca caída en la concentración de los compuestos implicados en el metabolismo de la oleuropeína parece indicar que existe también una disminución general en la biosíntesis de fenoles, porque no se observan incrementos netos en las concentraciones de los precursores ni en las de los catabolitos (con excepción del tirosol anteriormente mencionado). Por tanto, el cambio en la concentración de oleósido-11-metil ester, que disminuyó de 78.2 a 15.3  $\mu\text{mol/g}$  del primer al segundo muestreo, corresponde con el incremento en la concentración del ácido elenólico, que pasó de 27.3 a 92.9  $\mu\text{mol/g}$ . De esta manera, se podría decir que a partir de oleósido-11-metil ester, mediante la actividad de  $\beta$ -glucosidasa (Figura 22), se forma el ácido elenólico. Por otra parte, el tirosol podría ser incorporado a la síntesis de oleuropeína. De hecho, la concentración en tirosol disminuyó de 6.1 a 4.6  $\mu\text{mol/g}$ . Este compuesto podría haber estado implicado en la ruta de biosíntesis, concretamente en el paso en que se obtiene ligustrósido a partir de la esterificación de 7- $\beta$ -1-D-glucopiranosil-11-metil oleósido con tirosol. Por tanto, el contenido inicial de tirosol de 6.1  $\mu\text{mol/g}$  es incorporado a la síntesis de oleuropeína, produciendo un incremento en su concentración de 6.3  $\mu\text{mol/g}$ .

Como se ha comentado anteriormente, el contenido en fenoles totales disminuyó un 85% en la fase inicial (Figura 19). Como consecuencia, la marcada disminución en el contenido en formas agliconas indica que éstas son utilizadas en otras rutas anabólicas para producir otros intermediarios metabólicos no considerados en este estudio. Además, los resultados obtenidos indican que la síntesis de oleuropeína puede ser localizada en la pulpa de la oliva y que se produce siguiendo la última fase de la ruta establecida por Damtoft (Figura 14), a partir del ligustrósido vía oleósido-11-metil ester, el principal precursor; pero esta síntesis depende en gran medida de los procesos enzimáticos de  $\beta$ -glucosidasa y esterasa (Figura 21), que modifican de forma muy significativa el rendimiento en la síntesis de oleuropeína.

Finalmente, el balance de masas nos servirá para establecer hipótesis sobre el papel desarrollado por 3,4-DHPEA-EDA y oleósido-11-metil ester como precursor y producto de la degradación de oleuropeína, respectivamente. Varios autores (Capasso et al., 1996; Montedoro et al., 1993a; Obied et al., 2007; Vierhuis et al., 2001;) han sugerido que para la formación de 3,4-DHPEA-EDA se debe producir la apertura del anillo de 3,4-DHPEA-EA y la posterior isomerización del ácido elenólico para producir la estructura dialdehídica. Sin embargo, Ryan et al. (2002a, 2003) propusieron que 3,4-DHPEA-EDA era un precursor de oleuropeína que posteriormente se transformaba en oleurósido, aunque puntualizaron que sería necesaria una investigación más profunda con el uso de marcadores para confirmar esta

hipótesis. Analizando nuestros resultados, si 3,4-DHPEA-EDA fuera precursor de oleuropeína, se hubiera observado una disminución acusada de su concentración acompañada por un incremento notable en la concentración de oleuropeína (Figura 20). Por tanto, según los resultados obtenidos, se podría afirmar que 3,4-DHPEA-EDA no interviene como precursor de la oleuropeína, como sugirieron por Ryan et al. (2002a).

Durante la fase de maduración verde, el contenido en oleósido-11-metil ester varió de 2.2 a 4.2  $\mu\text{mol/g}$  del 11 de agosto al 22 de septiembre, hasta mantenerse prácticamente constante (3  $\mu\text{mol/g}$ ) hasta el final del estudio. Esto concuerda con los valores de la concentración de oleuropeína, que también se mantuvo constante entre 3 y 2  $\mu\text{mol/g}$  entre el 28 de agosto y el 22 de septiembre. Este hecho nos permite descartar que oleósido-11-metil ester sea un producto de degradación de la oleuropeína por la acción de la esterasa.

#### 6.1.2.2. Variedad *Arbequina*

En la Figura 20 se muestra que las concentraciones de los compuestos precursores de oleuropeína (oleósido-11-metil ester, tirosol y ligustrósido) en la variedad *Arbequina* fueron menores que las cuantificadas en la variedad *Hojiblanca*, pero sin embargo, el contenido en oleuropeína fue mayor. En referencia a los compuestos mayoritarios, los frutos de *Arbequina* presentaron una mayor concentración en las formas agliconas que los frutos de *Hojiblanca*. En esta variedad, la implicación de los precursores en la biosíntesis de la oleuropeína se observa claramente: la disminución en la concentración desde el 30 de junio al 28 de julio de todos los precursores fue dedicada a mantener los niveles de concentración de oleuropeína en torno a 12  $\mu\text{mol/g}$ . Esta concentración aumentó de forma continua hasta el 8 de septiembre, registrándose una síntesis neta de oleuropeína de hasta 40  $\mu\text{mol/g}$ , mayor que la observada en la variedad *Hojiblanca*. El incremento neto en este periodo fue de 28  $\mu\text{mol/g}$ , que representa un 65% de la cantidad máxima de oleuropeína detectada. El hecho de que el nivel de compuestos precursores fuera mucho menor que en los frutos de *Hojiblanca*, indica que estos precursores son metabolizados de manera más rápida en los frutos de la variedad *Arbequina* que en los de *Hojiblanca*.

El perfil de variación en la concentración del ácido elenólico difiere con el observado en *Hojiblanca*. En la oliva *Arbequina*, éste presenta dos máximos. El primer máximo, de 14.6  $\mu\text{mol/g}$  en el 11 de agosto, concuerda con la acumulación de oleuropeína, cuya concentración pasó de 12.0 a 20  $\mu\text{mol/g}$ , con un incremento neto de 8  $\mu\text{mol/g}$ . En este incremento estaría implicada la enzima  $\beta$ -glucosidasa, que hubiera degradado el oleósido-11-metil ester (Figura 21) para la obtención de ácido elenólico. El hecho que la concentración de oleósido-11-metil ester disminuya a la vez que la concentración en ácido elenólico aumenta sostiene esta hipótesis de que el ácido elenólico proviene directamente del precursor oleósido-11-metil ester por la acción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa. Sin embargo, el segundo máximo observado en la concentración del ácido elenólico, del 6 de octubre, concuerda con una disminución acusada

de oleuropeína de 40 a 11  $\mu\text{mol/g}$ , con una pérdida neta de 29  $\mu\text{mol/g}$ , observada entre el 8 de septiembre y el 6 de octubre. Esta caída en la concentración puede ser debida a la acción combinada de esterasa y  $\beta$ -glucosidasa sobre oleuropeína, produciéndose oleósido-11-metil ester y ácido elenólico (Figura 21).

Los niveles de los precursores oleósido-11-metil ester y ligustrósido disminuyeron hasta el 28 de agosto, pero se incrementaron en el muestreo del 8 de septiembre, coincidiendo con el máximo de oleuropeína. El balance de masa del otro precursor, el tirosol, refleja tanto incrementos como pérdidas: de 2.4 a 0.8  $\mu\text{mol/g}$  entre el 30 de junio y el 28 de agosto, de 0.8 a 1.0  $\mu\text{mol/g}$  de 28 de julio a 11 de agosto y de 1.0 a 0.2  $\mu\text{mol/g}$  entre el 11 de agosto y el 8 de septiembre. Adicionalmente, se observó un incremento en la concentración de ligustrósido, de 0.8 a 4.6  $\mu\text{mol/g}$  entre el 28 de agosto y el 8 de septiembre. Este hecho muestra que la ruta metabólica está activa, resultando en un incremento en la concentración de oleuropeína en el mismo periodo de 12.0 a 20.0  $\mu\text{mol/g}$ , de 20.0 a 28.6  $\mu\text{mol/g}$  y de 28.6 a 40  $\mu\text{mol/g}$  (Figura 20). En esta variedad, la esterificación de 7- $\beta$ -1-D-glucopiranosil-11-metil oleósido con tirosol se produjo más rápidamente, lo que no permite su apreciación en los resultados (Figura 20). Así, aunque el valor absoluto detectado para tirosol es más bajo que el detectado para la variedad *Hojiblanca*, su papel en la síntesis de oleuropeína es más importante.

Como sucedió en las muestras de la variedad *Hojiblanca*, el contenido en 3,4-DHPEA-EA y 3,4-DHPEA-EDA fue alto en el primer muestreo, 196.4 y 258.3  $\mu\text{mol/g}$ , respectivamente (Tablas 19 y 20) en comparación con el resto de compuestos estudiados en este trabajo. Esto indica que la ruta catabólica es más activa que la anabólica. La actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en los frutos de *Arbequina* mostró un valor máximo en torno a 8  $\mu\text{kat/g}$  (Figura 22B) que dobla el obtenido en la variedad *Hojiblanca*. Esta alta actividad produce una continua y mayor concentración de 3,4-DHPEA-EDA en la variedad *Arbequina* a lo largo de todos los muestreos.

De una forma similar, el contenido total de las formas agliconas de oleuropeína y ligustrósido (Tabla 19) fue significativamente mayor en los frutos de la variedad *Arbequina* (excepto en el primer muestreo) hasta el 8 de septiembre, debido a la alta actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en esta variedad. Lo mismo pasó con el compuesto 3,4-DHPEA-EDA (Tabla 20), el cuál mostró valores significativamente mayores en la variedad *Arbequina* a lo largo de todo el estudio, de acuerdo con la alta actividad  $\beta$ -glucosidásica. Este hecho sostiene que 3,4-DHPEA-EA es el sustrato que se utiliza en esta variedad para la síntesis de 3,4-DHPEA-EDA mediante una serie de reacciones, probablemente debido a que en la variedad *Arbequina* los sistemas enzimáticos son más activos.

A partir del 11 de agosto, se produce una disminución en la concentración de 3,4-DHPEA-EA (Tabla 19) más rápida que la que se produce en 3,4-DHPEA-EDA (Tabla 20), que lo hace de manera más gradual. Por su parte, la transformación de ligustrósido en su forma aglicona (*p*-HPEA-EA) es rápida y presenta valores más altos que su predecesor, mientras que la formación

de *p*-HPEA-EDA es más lenta, a diferencia de 3,4-DHPEA-EDA. En las fases de maduración verde y maduración negra, en las concentraciones de estos compuestos se producen incrementos y pérdidas de una manera arbitraria y sin seguir un patrón específico. El incremento en *p*-HPEA-EDA puede ser debido a la degradación de ligustrósido aglicona entre los muestreos 6 y 10. El incremento final en la concentración de oleuropeína es análogo al incremento que se produce en oleósido-11-metil ester y en *p*-HPEA-EDA, lo que sólo puede ser explicado por reordenaciones o por los mecanismos de transporte que movilizan los sustratos en varias partes de la planta (Fernández-Bolaños et al., 1995). Sobre este tema, Parr y Bolwell (2000) indicaron los sistemas de transporte y de compartimentación metabólica implicados en el movimiento de sustratos fenólicos, que aun no está del todo definido. El hecho de que el árbol florece varias veces consecutivas podría afectar y explicar los resultados obtenidos.

Finalmente, es importante remarcar que este es el primer estudio que analiza la evolución de los precursores de la oleuropeína, oleósido-11-metil ester, tirosol y ligustrósido, y los productos de degradación enzimática, el ácido elenólico y las formas agliconas de oleuropeína y ligustrósido, durante el ciclo vegetativo de los frutos de *O. europaea*. Estos resultados sostienen que la biosíntesis de oleuropeína sigue la ruta propuesta por Damtoft et al. (1993) en las variedades *Hojiblanca* y *Arbequina*. Además, la alta actividad de  $\beta$ -glucosidasa detectada en ambas variedades actúa directamente sobre los fenoles glucosilados, modulando así la síntesis *in vivo* de la oleuropeína y sus precursores, confirmándose que la acción de esta enzima disminuye el contenido en oleuropeína, que es el compuesto mayoritario de la oliva en la gran mayoría de variedades. La actividad enzimática produce ácido elenólico y las formas agliconas de oleuropeína y ligustrósido como principales productos de degradación. Cabe mencionar que este proceso metabólico de la oleuropeína es complejo y es diferente según la variedad. En este caso, en la variedad *Arbequina* las rutas metabólicas eran activas de una manera sostenida a lo largo del tiempo y obtenían mejores rendimientos que en los frutos de la variedad *Hojiblanca*. Considerando que el clima y las condiciones agronómicas afectan al contenido fenólico de los frutos del olivo, se debería llevar a cabo estudios más específicos con el fin de confirmar la teoría de este trabajo.



## **6.2. FORMACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS DURANTE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO DE LOS FRUTOS DEL OLIVO (*OLEA EUROPAEA* L.) DE VARIEDAD *ARBEQUINA*: COMPARACIÓN ENTRE CULTIVO ECOLÓGICO Y CULTIVO CONVENCIONAL**

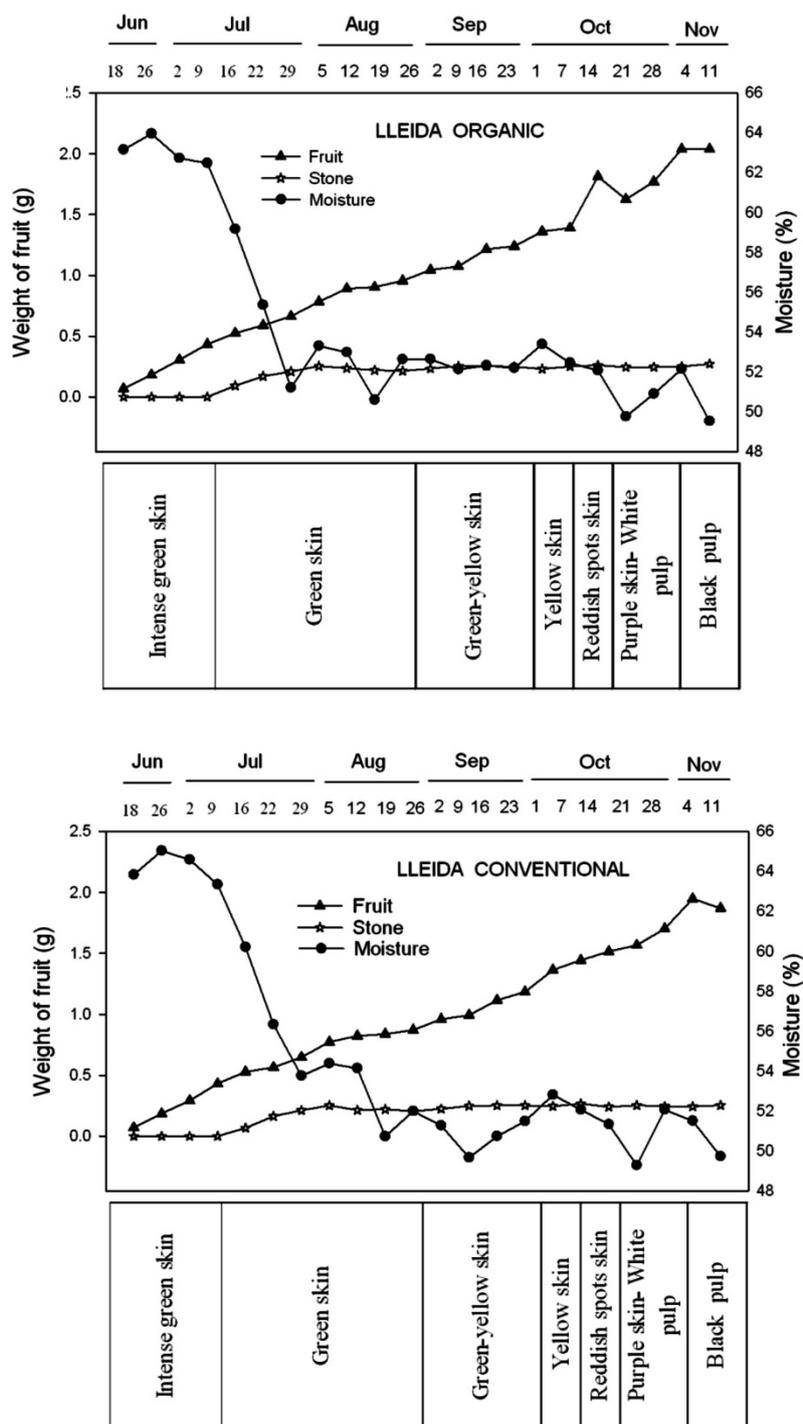
En esta experiencia se analiza la evolución de los compuestos fenólicos de la oliva durante el periodo que va del cuajado del fruto a la madurez industrial. En particular se hace incidencia en el estudio de la acumulación de oleuropeína, los metabolitos implicados en su síntesis y los compuestos producto de su degradación a lo largo del crecimiento y la maduración en frutos del olivo de la variedad *Arbequina* cultivada según los tipos de cultivo convencional y ecológico. También se hace un estudio de la evolución de los flavonoides y de lignanos. El trabajo se realizó con frutos de la variedad *Arbequina*, de cultivo ecológico y convencional, procedentes de una finca situada en Els Torms (Lleida). Los resultados más importantes han sido comparados con un estudio paralelo llevado a cabo en el Instituto de la Grasa de Sevilla bajo la coordinación de las Dras. Mínguez-Mosquera y Gutiérrez-Rosales.

### **6.2.1. Desarrollo del fruto**

Se realizaron 22 muestreos en Lleida, del 18 de junio al 11 de noviembre, tal y cómo se detalla en el apartado Material y métodos. A lo largo de estos muestreos, se tomaron datos de la humedad del fruto (%), además del peso medio del fruto (g) y del hueso (g), que se pueden observar en la Figura 23.

En el peso del fruto se observa una progresión continua y lenta. En el primer muestreo, los frutos recientemente cuajados de cultivo ecológico y de cultivo convencional pesaron lo mismo, 0.07 g, peso que se fue incrementando a lo largo de la maduración. En el último muestreo, el 14 de diciembre, las olivas de producción ecológica pesaron 2.04 g y las convencionales 1.87 g. Es decir, a lo largo de la maduración, el peso de los frutos de producción ecológica y tradicional fue muy similar.

En cuanto al peso del hueso, éste se pudo determinar a partir del cuarto muestreo, dado que en las primeras tomas de muestra el hueso todavía no estaba endurecido. El primer muestreo en que se pudo determinar el peso del hueso fue en el 16 de julio (0.09 g en los frutos de cultivo ecológico y 0.07 g en los de cultivo tradicional). El peso del hueso fue incrementando a lo largo de la maduración de una manera paralela en ambos tipos de cultivo, alcanzando en el último muestreo un valor de 0.27 g el hueso del fruto de cultivo ecológico y 0.25 g el de cultivo tradicional.



**Figura 23.** Evolución del peso del fruto y del hueso (g) y de la humedad de la oliva (%) durante el periodo de maduración en frutos de la variedad *Arbequina* cultivada en la provincia de Lleida.

La humedad de las olivas de ambos tipos de cultivo presentó una evolución similar. Los contenidos máximos de humedad se observaron en los primeros muestreos. En el primer muestreo, los frutos de ambos tipos de cultivo mostraban una humedad del 63%, que

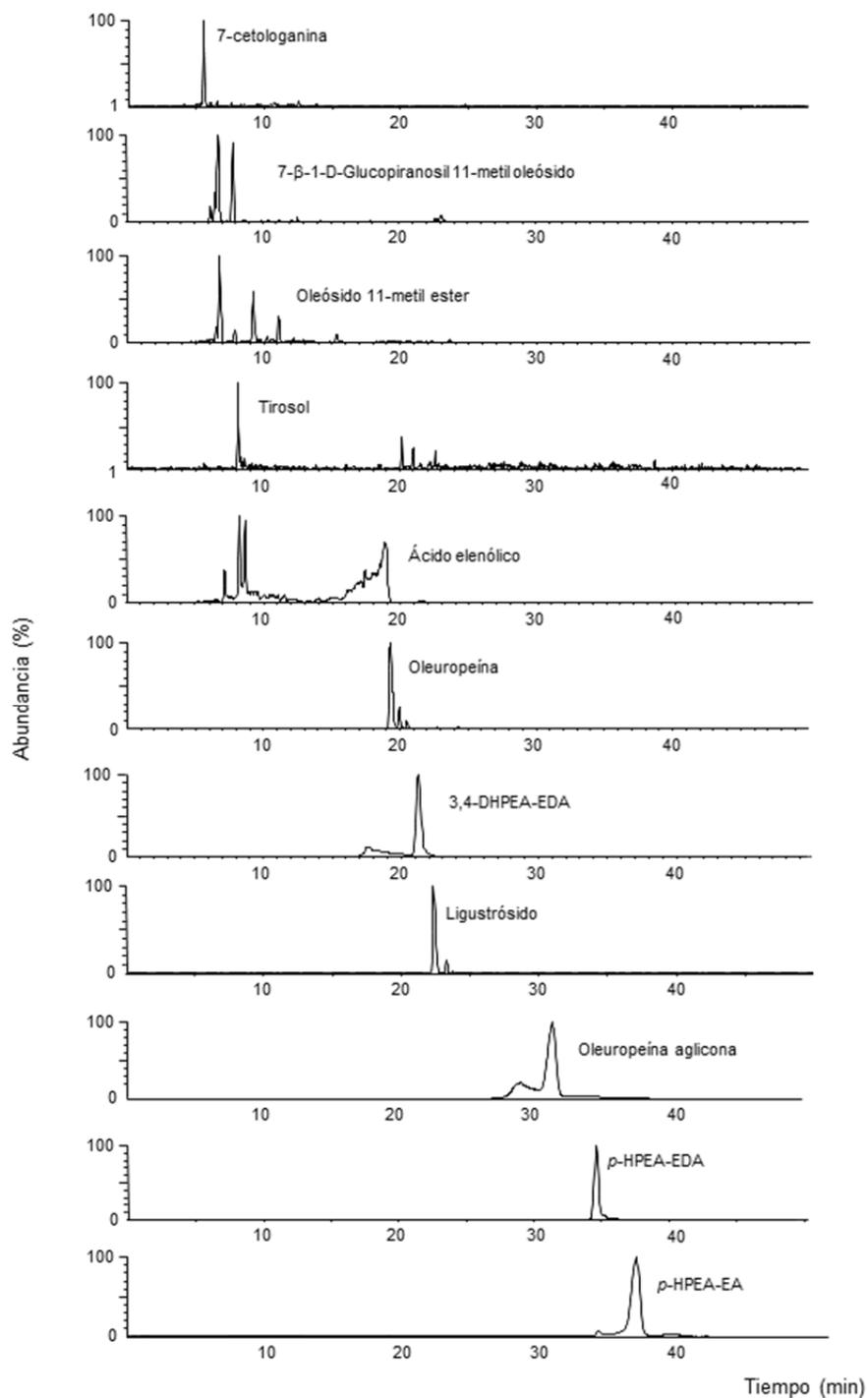
aumentó hasta el 64% en el segundo, y que posteriormente fue disminuyendo a lo largo del tiempo. Del 9 al 29 de julio, en 20 días, la humedad disminuyó de una manera muy acusada: en el cultivo ecológico pasó del 62% al 51%, mientras que en cultivo convencional pasó del 63% al 53%, representando pérdidas en humedad del 18% y del 16% respectivamente. A partir del 29 de julio, la humedad en ambos tipos de cultivo se mantuvo más o menos estable entre el 50 y el 52%.

Podemos por tanto concluir que las dos plantaciones tuvieron un ciclo vegetativo paralelo y que el fruto evolucionó de forma muy similar, por lo que se excluye la posibilidad de que el cultivo ecológico sufriese estrés hídrico por competencia con la cubierta vegetal de la plantación.

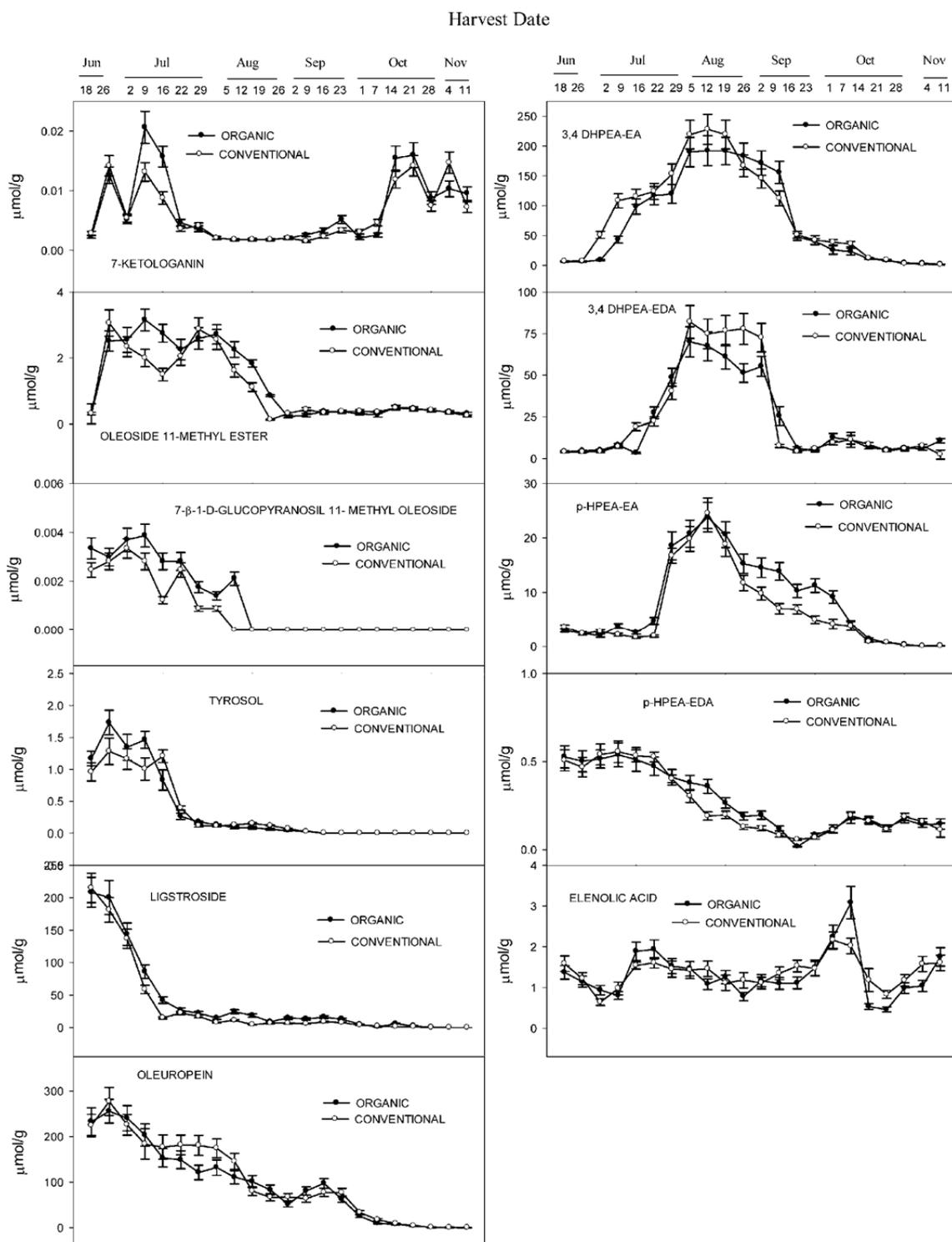
## **6.2.2. Formación y transformación de oleuropeína**

### **6.2.2.1. Cambios metabólicos durante la acumulación y degradación de oleuropeína**

En esta experiencia se han cuantificado los compuestos fenólicos precursores de la oleuropeína (Figura 14) y los compuestos producto de su degradación (Figura 21) debido a la acción de las enzimas durante la formación, desarrollo y maduración de la oliva. Estos compuestos son 7-cetologanina, oleósido-11-metil ester, 7- $\beta$ -1-D-glucopiranosil 11-metil oleósido, tirosol, ligustrósido, oleuropeína y los productos derivados de la actividad  $\beta$ -glucosidasa, 3,4-DHPEA-EA, 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EA, *p*-HPEA-EDA y ácido elenólico. En la Figura 24 se muestran los cromatogramas de iones de estos compuestos cuantificados mediante HPLC-MS/MS. Oleuropeína y tirosol fueron cuantificados en base a sus estándares comerciales. Los compuestos 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA, *p*-HPEA-EA y *p*-HPEA-EDA fueron cuantificados usando la recta de calibración del estándar 3,4-DHPEA-EDA obtenido mediante cromatografía semipreparativa. Los compuestos ácido elenólico, 7-cetologanina, oleósido-11-metil ester, ácido elenólico glucosilado, ligustrósido y 7- $\beta$ -1-D-glucopiranosil 11-metil oleósido fueron cuantificados con la curva de calibrado de la oleuropeína. Los resultados se han representado en la Figura 25 y sus concentraciones se expresan en  $\mu\text{mol/g}$  de pulpa seca.



**Figura 24.** Cromatograma de masas de los iones cuantificados en la oliva mediante la técnica HPLC-MS/MS.



**Figura 25.** Cambios en la concentración de fenoles ( $\mu\text{mol/g}$  de pulpa seca) durante el ciclo vegetativo de oliva *Arbequina* de Lleida. Cada valor es expresado como media  $\pm$  STD.  $\text{STD} < 15\%$

Las concentraciones detectadas de los precursores 7-cetologanina, oleósido-11-metil ester, 7- $\beta$ -1-D-glucopiranosil 11-metil oleósido y tirosol fueron muy bajas en los dos tipos de cultivo. Esto indica que estos compuestos son rápidamente metabolizados para su incorporación a la síntesis de ligustrósido, que es el precursor inmediato de la oleuropeína (Figura 14). Este hecho

se confirma con las altas concentraciones de ligustrósido y oleuropeína detectadas en frutos inmaduros. La concentración en ligustrósido en el primer muestreo fue de 208  $\mu\text{mol/g}$  en frutos ecológicos y 215  $\mu\text{mol/g}$  en convencionales. Hasta el tercer muestreo, la concentración en ligustrósido disminuyó rápidamente, observándose a su vez un incremento neto de la concentración de oleuropeína del primer al segundo muestreo de 22.6  $\mu\text{mol/g}$  en frutos ecológicos y de 52.8  $\mu\text{mol/g}$  en frutos convencionales, alcanzando en este segundo muestreo las concentraciones máximas de todo el estudio, 255  $\mu\text{mol/g}$  en frutos ecológicos y 277  $\mu\text{mol/g}$  en convencionales. A partir de este momento, la oleuropeína fue el compuesto fenólico más abundante, alcanzando concentraciones en un rango comprendido entre 255 y 203  $\mu\text{mol/g}$  en el cultivo ecológico y entre 277 y 183  $\mu\text{mol/g}$  en el tradicional mientras los frutos fueron inmaduros, con la piel de color verde intenso (desde el 28 de junio al 9 de julio). Sin embargo, la oleuropeína no fue el compuesto más abundante durante todos los estados fisiológicos del fruto. Cuando el fruto tenía la piel de color verde, la concentración en oleuropeína disminuyó y se mantuvo constante entre 153-132  $\mu\text{mol/g}$  para los frutos ecológicos y en torno a 180  $\mu\text{mol/g}$  para los de producción tradicional durante un período de 4 semanas (desde el 16 de julio al 5 de agosto). Esta estabilidad en la concentración de oleuropeína detectada después de su concentración máxima del 26 de junio, sugiere que se alcanza un equilibrio entre los procesos de acumulación y de degradación del compuesto fenólico. Después de este estado, del 5 de agosto al 2 de septiembre se produce una pérdida en el contenido de oleuropeína de 81  $\mu\text{mol/g}$  y 107  $\mu\text{mol/g}$  en los frutos ecológicos y convencionales, respectivamente, lo que sugiere que la fase de biosíntesis ha concluido. Posteriormente, se detectó un pequeño incremento en la concentración de oleuropeína, hasta el 16 de septiembre, fecha a partir de la cual su concentración comenzó a disminuir para quedarse más o menos estable, cuando el fruto era de color violeta, en 0.3-0.1  $\mu\text{mol/g}$  en ambos cultivos.

En el estudio paralelo llevado a cabo en Sevilla (Gutiérrez-Rosales et al., 2012), las reacciones implicadas en las rutas biosintéticas siguieron el mismo patrón que en los frutos de Lleida. La concentración máxima en ligustrósido fue cuantificada en el primer muestreo, con 76.3  $\mu\text{mol/g}$  en los frutos de cultivo ecológico y 100  $\mu\text{mol/g}$  en convencional. A partir del segundo muestreo, la concentración en ligustrósido empezó a disminuir, alcanzando en el cuarto muestreo valores de 16  $\mu\text{mol/g}$  y 17.6  $\mu\text{mol/g}$  en cultivo ecológico y convencional, respectivamente. Esta disminución tuvo influencia en la formación de oleuropeína, que alcanzó su concentración máxima (93.6  $\mu\text{mol/g}$  en frutos ecológicos y 137  $\mu\text{mol/g}$  en convencionales, lo que corresponde con incrementos respecto al primer muestreo de 38  $\mu\text{mol/g}$  y 93  $\mu\text{mol/g}$ , respectivamente) en el segundo muestreo. Posteriormente, del tercer al sexto muestreo, la concentración en oleuropeína disminuyó de 85 a 35  $\mu\text{mol/g}$  en los frutos de cultivo orgánico y de 112 a 60  $\mu\text{mol/g}$  en los de cultivo convencional. A partir de ese momento, la concentración en oleuropeína se mantuvo bastante estable en 20-23  $\mu\text{mol/g}$  en cultivo ecológico y 40-50  $\mu\text{mol/g}$  en el convencional, del 24 de agosto al 5 de octubre. Posteriormente, se observó una pérdida neta de 17  $\mu\text{mol/g}$  y 13  $\mu\text{mol/g}$  en el contenido en

oleuropeína en ecológico y convencional, respectivamente. Al final de la maduración, cuando el fruto era de color violeta, la concentración en oleuropeína fue de 0.2-0.3  $\mu\text{mol/g}$  en ambos cultivos. La mayor concentración de oleuropeína en los frutos de Lleida que en los de Sevilla sugiere que los cultivos de Lleida poseen una mayor capacidad biosintética. La acumulación de oleuropeína dependió más del origen geográfico de las muestras que del tipo de cultivo. Esta observación sugiere la existencia de diferencias fisiológicas entre los cultivos de Lleida y Sevilla relacionadas con la una menor capacidad de biosíntesis de oleuropeína y fenoles intrínsecos en los frutos cultivados en Sevilla.

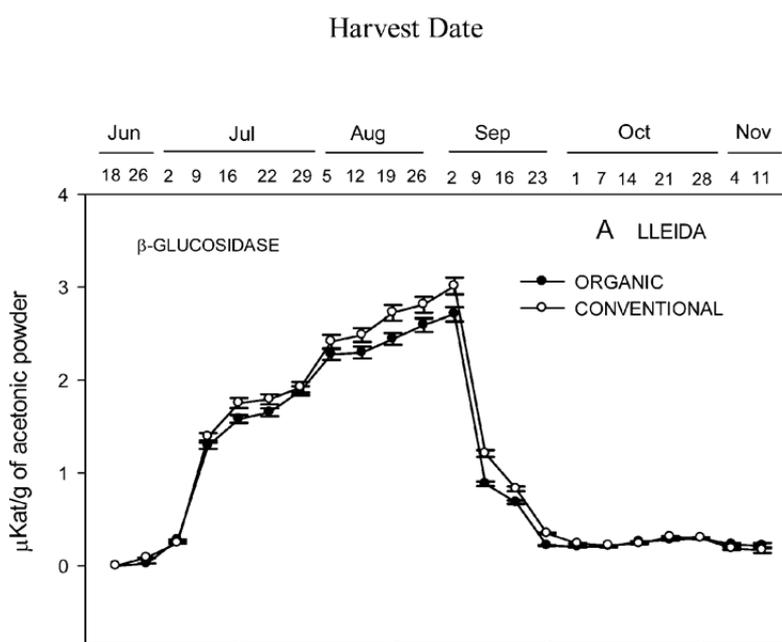
Revisando los trabajos realizados anteriormente donde se determina la presencia de oleuropeína en olivas de diferentes variedades, se observa que sus valores se mueven en un rango relativamente pequeño. Amiot et al. (1986) determinaron valores similares de concentración en frutos de diferentes variedades durante su desarrollo y maduración, de aproximadamente 46.3  $\mu\text{mol/g}$  en las variedades *Luque* y *Picholine* y de 45.2  $\mu\text{mol/g}$  en la variedad *Solonenque*. En un trabajo de Ryan et al. (2003), en que estudiaron el contenido fenólico en frutos verdes de la variedad *Hardy's Mammoth*, el máximo de concentración en oleuropeína fue 44.4  $\mu\text{mol/g}$ . En España, Ortega y Peragón (2009) cuantificaron el contenido en oleuropeína en frutos verdes, obteniendo valores de 69.9  $\mu\text{mol/g}$  en la variedad *Picual* y 54.7  $\mu\text{mol/g}$  en *Arbequina*. En este trabajo, en el capítulo 1, se determinó que el contenido máximo en oleuropeína de frutos cultivados en Córdoba fue de 20  $\mu\text{mol/g}$  y 40  $\mu\text{mol/g}$  en las variedades *Hojiblanca* y *Arbequina*, respectivamente. Como se puede observar, los valores medios estarían entre 20  $\mu\text{mol/g}$  y 70  $\mu\text{mol/g}$ .

En otro estudio, Ortega-García y Peragón (2010) determinaron la concentración de la oleuropeína en ramas y raíces de *O. europaea* L. variedad *Picual* durante la maduración de los frutos. Observaron que la concentración en las ramas sufrió un incremento desde mediados de septiembre (37  $\mu\text{mol/g}$ ) hasta finales de noviembre (111  $\mu\text{mol/g}$ ), mientras que en las raíces descendió durante la maduración del fruto, de 11  $\mu\text{mol/g}$  a 0.9  $\mu\text{mol/g}$ .

En el presente estudio, la concentración de los fenoles es mucho más elevada que en otros estudios, aunque se debe tener en cuenta que nunca se habían estudiado estos frutos en estados fisiológicos tan tempranos. Ryan et al. (2003), estudiando también el contenido fenólico en diferentes tejidos del olivo, concluyeron que no había grandes diferencias en el perfil fenólico cualitativo entre ellos, aunque encontraron diferencias importantes en las cuantificaciones, siendo la pulpa el tejido que presentó un mayor variabilidad en el rango de concentración de los diferentes fenoles.

### 6.2.2.2. Implicación de la enzima $\beta$ -glucosidasa en la degradación de oleuropeína.

Se ha estudiado la implicación de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en la ruta biosintética de los compuestos secoiridoides. Esta es la enzima responsable de la hidrólisis de los glucósidos oleósido-11-metil ester, oleuropeína y ligustrósido, generando ácido elenólico y las correspondientes formas agliconas de oleuropeína (3,4-DHPEA-EA y 3,4-DHPEA-EDA) y de ligustrósido (*p*-HPEA-EA y *p*-HPEA-EDA). La Figura 26 muestra la evolución de la actividad enzimática, que mostró un incremento del 9 de julio al 2 de septiembre, de 1.3 a 2.7  $\mu$ kat/g en los frutos ecológicos y de 1.4 a 3.0 en los convencionales.



**Figura 26.** Cambios en la actividad  $\beta$ -glucosidasa durante el ciclo vegetativo del fruto ( $\mu$ kat/g de polvo acetónico) en muestras de oliva *Arbequina* procedente de cultivo tradicional y ecológico.

Como se puede observar comparando la Figura 26 con los valores de los compuestos fenólicos que aparecen en la Figura 25, la máxima actividad  $\beta$ -glucosidásica coincide con la aparición de las formas agliconas, mientras que las concentraciones más altas de oleuropeína se dieron cuando la actividad de  $\beta$ -glucosidasa era muy baja. La concentración máxima de formas agliconas se observa durante el periodo de máxima actividad enzimática, y se mantienen como compuestos mayoritarios durante el resto del estudio. Este hecho sugiere que la síntesis *de novo* de oleuropeína empieza cuando el fruto es inmaduro. Comparando con los resultados del estudio paralelo llevado a cabo en Sevilla (Gutiérrez-Rosales et al., 2012) se observa que dado que la concentración de oleuropeína fue siempre más alta en los frutos de Lleida, tanto en cultivo ecológico como en tradicional, se puede afirmar que la síntesis de este compuesto depende más del origen geográfico del fruto que del tipo de cultivo.

El periodo de tiempo en que la concentración de oleuropeína se mantuvo estable indica que la ruta de síntesis de oleuropeína se mantiene todavía activa, y que se encuentra en equilibrio con la ruta catabólica donde actúa  $\beta$ -glucosidasa. Se debe remarcar que cuando el fruto cambió de color verde a verde-amarillo, se observó un segundo máximo en la concentración de oleuropeína (16 de septiembre) de 97  $\mu\text{mol/g}$  en los frutos ecológicos y 77  $\mu\text{mol/g}$  en los convencionales. Este máximo se produjo en el mismo momento que el máximo observado en el capítulo 1 de este trabajo, en olivas de la variedad *Arbequina* cultivadas en Córdoba, aunque la síntesis de oleuropeína fue más baja (40  $\mu\text{mol/g}$ ). Este nuevo incremento en la concentración se puede explicar por la baja concentración de  $\beta$ -glucosidasa, lo que se traduce en poca modificación del sustrato oleuropeína y por tanto, una disminución en la formación de las formas agliconas. La actividad determinada para esta enzima el 16 de septiembre en los frutos de Lleida fue 0.68  $\mu\text{kat/g}$  en los frutos ecológicos y 0.83  $\mu\text{kat/g}$  en los convencionales. En el estudio del capítulo 1, la actividad  $\beta$ -glucosidásica registrada en el momento de máxima concentración de oleuropeína fue mucho mayor (1.99  $\mu\text{kat/g}$ ) y, en consecuencia, la concentración en oleuropeína fue mucho más baja. Este resultado indica que el máximo registrado en el estudio del capítulo 1 corresponde a un estado de degradación de la oleuropeína y que el momento de síntesis máxima no pudo ser observado debido al rápido desarrollo del fruto y a la mayor actividad  $\beta$ -glucosidásica, que fue 2.4 veces mayor (1.99/0.83).

El contenido en oleuropeína disminuyó a medida que el fruto se desarrolló y maduró. Esta disminución ocurrió durante el periodo en que la ruta biosintética de la oleuropeína competía con la ruta catabólica de  $\beta$ -glucosidasa.

La concentración de las formas agliconas se incrementó simultáneamente a la actividad de la enzima. Esto confirma la hidrólisis por la actividad de  $\beta$ -glucosidasa endógena de la oleuropeína *in vivo*, ya que a medida que la concentración de oleuropeína disminuía, el ratio de transformación del sustrato se incrementaba. Durante este periodo, las formas agliconas alcanzaron su contenido máximo, siendo los fenoles más abundantes, y después su concentración disminuyó rápidamente. Este descenso indica que estos compuestos pueden reaccionar con otros tipos de compuestos que no han sido analizados en este estudio.

Por otra parte, la oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EA) fue el compuesto más abundante entre los fenoles estudiados, con concentraciones de 192-195  $\mu\text{mol/g}$  en los frutos de cultivo ecológico y 228-145  $\mu\text{mol/g}$  en los de cultivo convencional, desde el 5 de agosto al 2 de septiembre. La forma dialdehídica del ácido elenólico unida al hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EDA) también mostró su concentración máxima (70-75  $\mu\text{mol/g}$  en los frutos de cultivo ecológico y 82-72  $\mu\text{mol/g}$  en los de cultivo convencional) durante este periodo. Estos máximos en las concentraciones de las formas agliconas de oleuropeína coinciden con el máximo de la actividad de  $\beta$ -glucosidasa en los frutos ecológicos (2.3-2.7  $\mu\text{kat/g}$ ) y en los convencionales (2.4-3.0  $\mu\text{kat/g}$ ).

A partir del 2 y del 9 de septiembre y hasta el final del estudio, las concentraciones de ambas formas agliconas (3,4-DHPEA-EDA y 3,4-DHPEA-EA, respectivamente) disminuyeron significativamente. Concretamente, la concentración de 3,4-DHPEA-EA disminuyó de 156 a 2.1  $\mu\text{mol/g}$  en el cultivo ecológico y de 112 a 1.0  $\mu\text{mol/g}$  en el convencional, y la concentración de 3,4-DHPEA-EDA de 55.0 a 8.0  $\mu\text{mol/g}$  en el cultivo ecológico y de 73.4 a 2.5  $\mu\text{mol/g}$  en el cultivo convencional. A pesar de la disminución en la concentración, estas formas agliconas fueron los compuestos mayoritarios durante todo el estudio y se observaron durante todo el periodo de actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa.

También en el estudio paralelo llevado a cabo por las Dras. Gutiérrez-Rosales y Mínguez Mosquera, las formas agliconas de oleuropeína fueron los compuestos más abundantes en los cultivos de Sevilla (Gutiérrez-Rosales et al., 2012). En dicho ensayo, entre el 27 de julio y el 21 de septiembre, la concentración de oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EA) fue de 138 a 92  $\mu\text{mol/g}$  en el cultivo ecológico y de 178 a 100  $\mu\text{mol/g}$  en el convencional. Durante este periodo, el compuesto 3,4-DHPEA-EDA también mostró su concentración máxima, pasando de 37 a 20  $\mu\text{mol/g}$  y de 43 a 28  $\mu\text{mol/g}$  en frutos de cultivo ecológico y convencional, respectivamente. Estas concentraciones máximas en la concentración de oleuropeína aglicona coinciden con el máximo de actividad  $\beta$ -glucosidasa que fue de 2.9 a 1.8  $\mu\text{kat/g}$  en el cultivo ecológico y de 3.8 a 2.7  $\mu\text{kat/g}$  en el convencional en el mismo periodo. A partir del 21 de septiembre, la concentración de 3,4-DHPEA-EA comenzó a disminuir hasta alcanzar valores de 1.3-1.4  $\mu\text{mol/g}$  en ambos tipos de cultivo hacia el final del estudio. La concentración de 3,4-DHPEA-EDA también fue disminuyendo de una forma suave en ambos tipos de cultivo, hasta 10.6  $\mu\text{mol/g}$  en los frutos ecológicos y 16  $\mu\text{mol/g}$  en los convencionales al final del estudio.

Por tanto, una vez se ha completado el periodo inicial en que se produce la acumulación de oleuropeína, esta oleuropeína acumulada empieza a ser hidrolizada por la enzima  $\beta$ -glucosidasa, a pesar de que la ruta biosintética está todavía activa. Este hecho explica los resultados obtenidos en Lleida y la idea de dos rutas metabólicas (anabólica y catabólica) que compiten durante esta fase de desarrollo. La concentración de formas agliconas fue superior en el cultivo convencional en el que  $\beta$ -glucosidasa alcanzó su actividad máxima. Comparando con los datos de Sevilla (Gutiérrez-Rosales et al., 2012), se observa que allí la disminución fue mucho más pronunciada y a su vez, la actividad  $\beta$ -glucosidasa en los frutos de cultivo convencional fue mayor que la actividad observada en nuestro estudio de Lleida (3.8  $\mu\text{kat/g}$  frente a 3.0  $\mu\text{kat/g}$ , respectivamente).

Las bajas concentraciones de las formas agliconas de ligustrósido (*p*-HPEA-EA y *p*-HPEA-EDA) causadas por la actividad de  $\beta$ -glucosidasa, coincidieron con la desaparición de ligustrósido, que fue consumido en la ruta de biosíntesis de la oleuropeína.

El incremento en la concentración del ácido elenólico (Figura 25) a partir del 9 de julio se relaciona con la acción de  $\beta$ -glucosidasa sobre el compuesto oleósido-11-metil ester, y

coincide con la estabilización en la concentración de oleuropeína. En el segundo estado de desarrollo, la presencia del ácido elenólico se relaciona con la degradación de oleuropeína mediante esterasas (Obied et al., 2007), ya que son las encargadas de transformar oleuropeína en oleósido-11-metil ester, que posteriormente se transforma en ácido elenólico por acción de  $\beta$ -glucosidasa. Por tanto, la formación del ácido elenólico estuvo relacionada con la acción de  $\beta$ -glucosidasa vía el intermediario oleósido-11-metil ester hasta el 2 de septiembre. Durante el resto del estudio, la presencia del ácido elenólico fue asociada con la actividad de  $\beta$ -glucosidasa y esterasa, ambas modificando la síntesis de oleuropeína (Figura 25). También Jemai et al. (2009) analizaron la relación entre la presencia de  $\beta$ -glucosidasa con la variación de oleuropeína en frutos de la variedad *Dhokar* y *Chemlali* y determinaron que la potencial actividad enzimática correlacionaba con la hidrólisis de la oleuropeína a su forma aglicona, aunque con un coeficiente bajo.

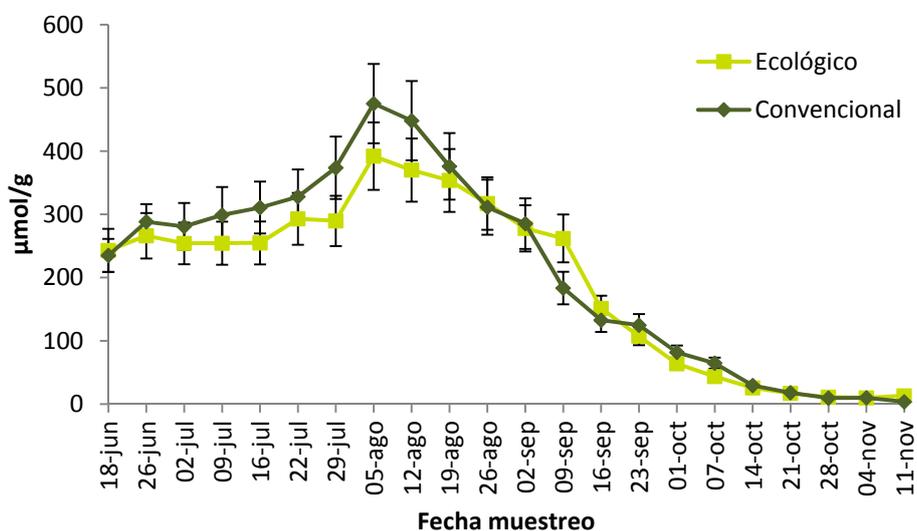
Cabe remarcar que la formación y la transformación del ácido elenólico es análoga en todos los cultivos de este estudio y que sigue las rutas descritas por Damtoft et al. (1993) y las del capítulo 1 de este trabajo en las que  $\beta$ -glucosidasa participa. La mayor concentración de oleuropeína en los cultivos de Lleida puede estar relacionada con la poca abundancia de enzima  $\beta$ -glucosidasa cuantificada, lo que se traduce en una mayor capacidad biosintética de la oleuropeína. Por tanto, la acumulación de la oleuropeína depende de su origen geográfico y de las condiciones climáticas en la plantación. La baja humedad relativa en las plantaciones de Lleida podría haber tenido influencia en la baja actividad *in vivo* de  $\beta$ -glucosidasa, que fue mucho mayor en las plantaciones de Sevilla.

### 6.2.2.3 Influencia del tipo y la zona de cultivo

Comparando los dos tipos de cultivo (ecológico y tradicional) en Lleida (Figura 25), no existieron diferencias significativas para ninguno de los compuestos estudiados, excepto en el caso de algunos muestreos puntuales. En el estudio llevado a cabo en Sevilla (Gutiérrez-Rosales et al., 2012), en cambio, se detectaron diferencias significativas en los compuestos tirosol y oleuropeína, siendo mayor la concentración en tirosol en los frutos ecológicos y mayor la concentración de oleuropeína en los frutos convencionales. Además, existen diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en las concentraciones de los compuestos ligustrósido, oleuropeína y 3,4-DHPEA-EA, que fueron mayores en Lleida que en Sevilla.

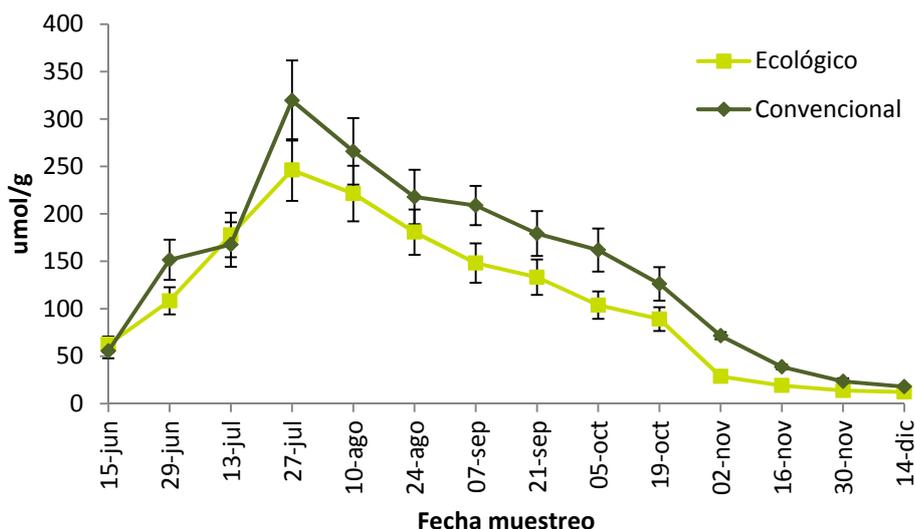
A continuación se muestra la concentración teórica de oleuropeína que se hubiera tenido en ausencia de  $\beta$ -glucosidasa, estimada como la suma de concentraciones de oleuropeína y sus formas agliconas 3,4-DHPEA-EA y 3,4-DHPEA-EDA. En Lleida (Figura 27), se observó una mayor capacidad biosintética para ambos tipos de cultivo entre el 5 de agosto y el 2 de septiembre, coincidiendo con los valores máximos de la actividad  $\beta$ -glucosidasa (2.2-2.7  $\mu\text{kat/g}$  en el cultivo ecológico y 2.4-3.0  $\mu\text{kat/g}$  en el convencional). En consecuencia, durante este periodo, existió una alta modificación del sustrato que conllevó a las concentraciones máximas de las formas

agliconas de oleuropeína. Esta máxima concentración se traduce en la máxima capacidad biosintética de 392.1  $\mu\text{mol/g}$  en el cultivo ecológico y 475.3  $\mu\text{mol/g}$  en el cultivo convencional el 5 de agosto.



**Figura 27.** Concentración teórica de oleuropeína en ausencia de la enzima  $\beta$ -glucosidasa (estimada como la suma de oleuropeína y sus formas agliconas) ( $\mu\text{mol/g}$ ) en las plantaciones de Lleida.

En las plantaciones de Sevilla (Figura 28), se puede observar que la capacidad biosintética de ambos tipos de cultivo es significativamente más baja que en Lleida. La capacidad máxima biosintética fue de 246.2  $\mu\text{mol/g}$  en el cultivo ecológico y de 319.6  $\mu\text{mol/g}$  en el convencional. Este valor máximo fue registrado el 27 de julio en ambos tipos de cultivo, coincidiendo con el máximo de actividad  $\beta$ -glucosidasa (2.9  $\mu\text{kat/g}$  y 3.8  $\mu\text{kat/g}$  en el cultivo ecológico y convencional, respectivamente).



**Figura 28.** Concentración teórica de oleuropeína en ausencia de la enzima  $\beta$ -glucosidasa (estimada como la suma de oleuropeína y sus formas agliconas) ( $\mu\text{mol/g}$ ) en las plantaciones de Sevilla.

Estos valores máximos no fueron observados en oleuropeína (Figura 25) por la acción de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, que la hidroliza hacia sus formas agliconas. En este periodo, la acumulación de oleuropeína y, en consecuencia, la concentración de  $\beta$ -glucosidasa fueron significativamente mayores en las plantaciones convencionales que en las ecológicas ( $P \leq 0.05$ ).

La ratio entre los valores máximos observados en Lleida y en Sevilla (Figuras 27 y 28) fue 1.5. Esto indica que la capacidad biosintética es mayor en Lleida que en Sevilla. Por tanto, finalmente, concluimos que el factor zona de cultivo es más importante que el tipo de cultivo en el contenido en oleuropeína y en los otros compuestos fenólicos estudiados.

### 6.2.3. Formación y transformación de lignanos y flavonoides

La amplia ruta fenilpropanoide produce una gran variedad de metabolitos secundarios, tales como ácidos fenólicos, ligninas, lignanos y estilbenos. En nuestro experimento se ha hecho un seguimiento de los compuestos mayoritarios pertenecientes a las familias de flavonoides, lignanos y ácidos fenólicos. Los lignanos identificados y cuantificados fueron pinosresinol y acetoxipinosresinol, mientras que los flavonoides identificados correspondieron a diversas especies de luteolina, apigenina, quercetina y eriodictiol. Todos los compuestos fueron cuantificados a partir de los extractos del fruto obtenidos por HPLC-DAD-MS/MS, tal y como se detalla en el apartado 5.3.1.7.2. de Material y métodos.

### 6.2.3.1. Flavonoides

La Figura 29 muestra la evolución de los flavonoides a lo largo del periodo estudiado. La cuantificación se ha hecho en el propio compuesto, excepto para aquellos flavonoides de los que no se disponía de patrón. Así, la metoxiluteolina se expresa como luteolina, el eriodictiol-glucósido como quercetina-ramnósido, la apigenina-rutinósido como apigenina-7-glucósido y luteolina-rutinósido como luteolina-7-glucósido.

Los flavonoides, como muchos otros constituyentes de las plantas, pueden estar presentes tanto en forma aglicona como glicosilados. Los flavonoides detectados en los frutos del estudio, a pesar de la presencia de enzima  $\beta$ -glucosidasa, han sido identificados en su forma glicosilada. Los dos flavonoides más abundantes en los frutos de ambos tipos de cultivo han sido la rutina (quercetina-3-rutinósido) y la luteolina-7-glucósido, representando entre ambas más del 90% del contenido total en flavonoides. Además de la luteolina-7-glucósido ha sido detectado otro glucósido de la luteolina que podría ser la luteolina-4-glucósido, identificado en otros estudios en pulpa de oliva (Cardoso et al., 2005; Ryan et al., 2003; Savarese et al., 2007). Además, aunque en muy pequeñas cantidades, también se detectaron formas agliconas de apigenina, luteolina y metoxiluteolina.

Un aspecto destacable de los resultados de estas experiencias es que el fruto recién cuajado contiene una cantidad apreciable de rutina (quercetina-rutinósido), entre 3 y 4 g/kg de pulpa seca. También se destaca que los dos flavonoides mayoritarios, luteolina-7-glucósido y la quercetina-7-rutinósido, lo han sido durante todo el ciclo de maduración, siendo en algunos momentos su concentración hasta 200 veces superior a la del resto de flavonoides. Ryan et al. (2003) detectaron luteolina en formas glucosídicas entre los fenoles más abundantes en hojas de oliva, aunque no las citan cuando evalúan los fenoles principales de la pulpa.

Los flavonoides minoritarios se detectan en concentraciones por debajo de 50 mg/kg de pulpa seca, siendo también sus especies glicosídicas las más abundantes. Únicamente se detectó en fruto la forma aglicona de la luteolina y una forma metilada, aunque en concentraciones por debajo de 5 mg/kg de pulpa seca a lo largo de casi todo el estudio. Esta ausencia de formas agliconas nos muestra cómo la oliva almacena los flavonoides en las formas en la que éstos son menos reactivas y más solubles en el líquido vacuolar.

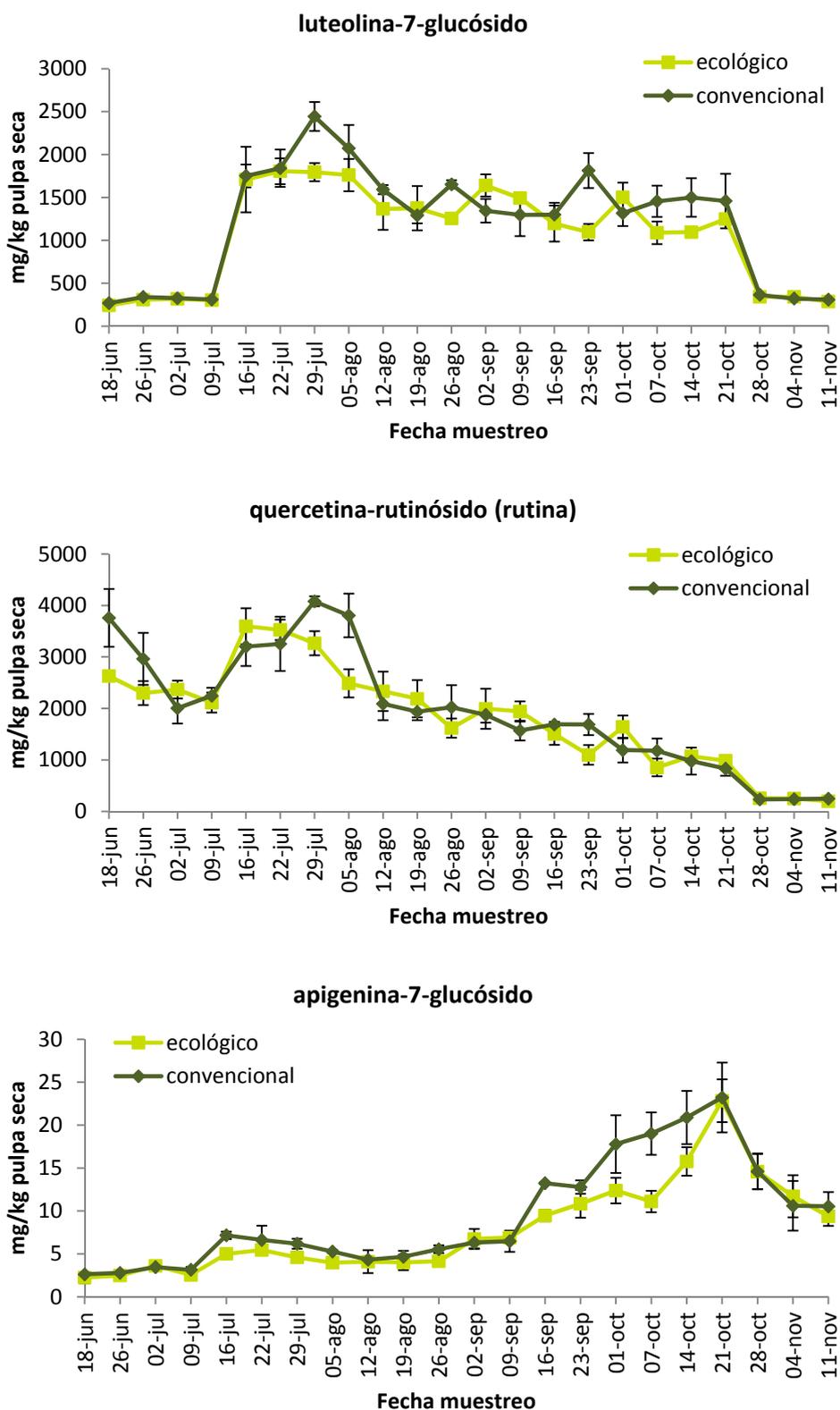


Figura 29A. Evolución de flavonoides (mg/kg pulpa seca) a lo largo de la maduración de frutos de la variedad *Arbequina*.

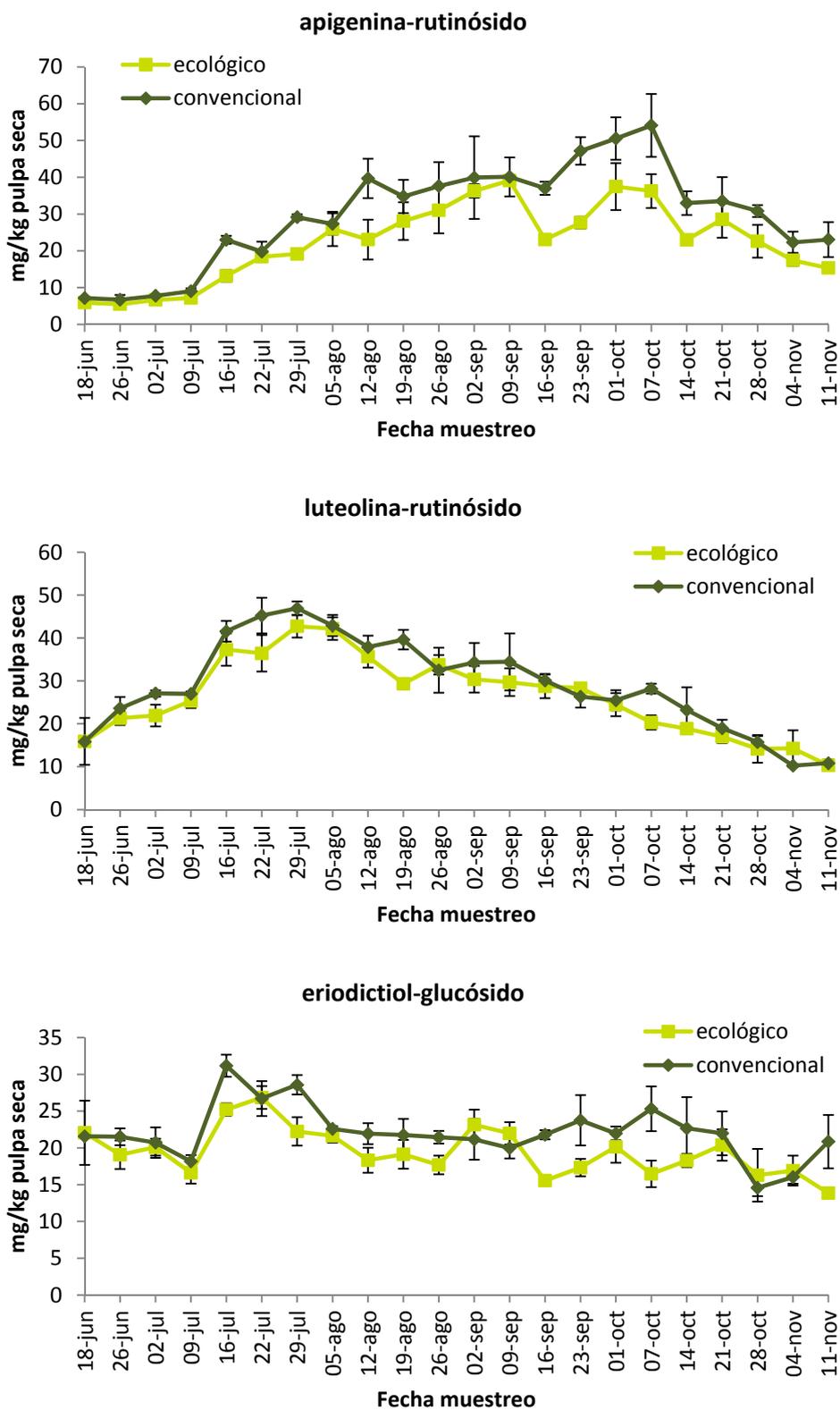


Figura 29B. Evolución de flavonoides (mg/kg pulpa seca) a lo largo de la maduración de frutos de la variedad *Arbequina*.

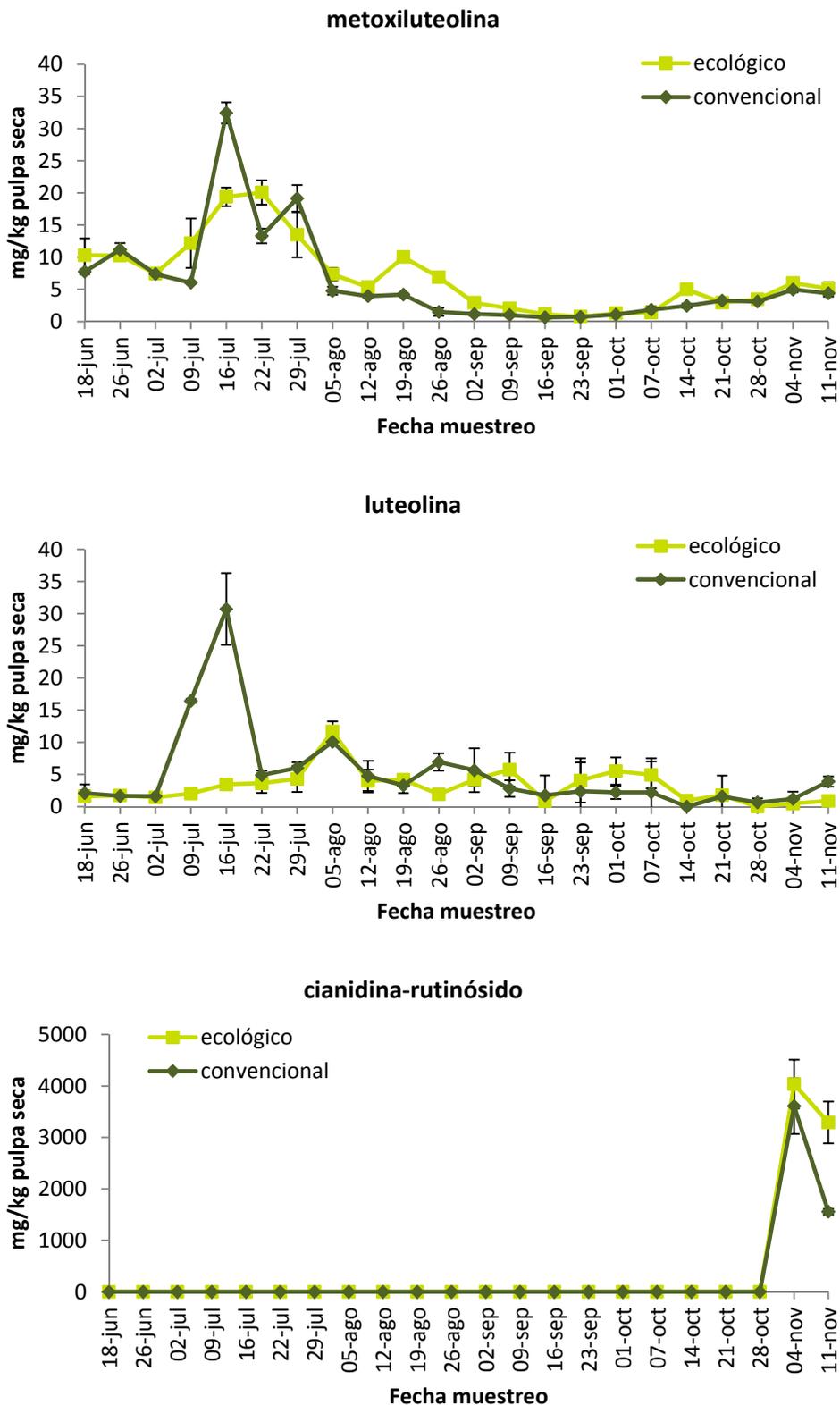


Figura 29C. Evolución de flavonoides (mg/kg pulpa seca) a lo largo de la maduración de frutos de la variedad *Arbequina*.

Por otra parte, las gráficas muestran dos tendencias a lo largo de la maduración. Las dos especies mayoritarias junto con la luteolina-rutinósido presentan un patrón de comportamiento similar, después de alcanzar un máximo en el muestreo del 16 de julio, tras el endurecimiento del hueso, sufren una disminución hasta alcanzar valores por debajo de 300 mg/kg de pulpa seca. Por el contrario, la apigenina en sus formas glucosídica y rutinósida experimentan un incremento sostenido a lo largo de casi toda la maduración, alcanzando un máximo en torno a 20 mg/kg de pulpa seca cuando el fruto alcanza la maduración de color violáceo y disminuyendo hasta 10 mg/kg de pulpa seca cuando el fruto es negro. Esta formación de apigenina-glicósido podría darse a partir de sus respectivas luteolinas por deshidroxilación. En cuanto a pigmentos antociánicos sólo ha sido detectada la cianidina-rutinósido, antocianidina que comparte estructura en los anillos A y B con la luteolina, en los dos últimos muestreos. El fruto *Arbequina* en situaciones agroclimáticas normales, sintetiza pigmentos antociánicos únicamente con la maduración muy avanzada, incluso en ocasiones le cuesta adquirir la pigmentación roja en la totalidad de la pulpa. No ocurre así en situaciones límites de estrés por exceso de radiación, en los que el fruto adquiere rápidamente una pigmentación intensa al activarse los mecanismos de defensa (Winkel-Shirley, 2002). En la campaña estudiada no se observó este proceso de ennegrecimiento rápido, que algunos años se produce en las primeras semanas de la campaña oleícola.

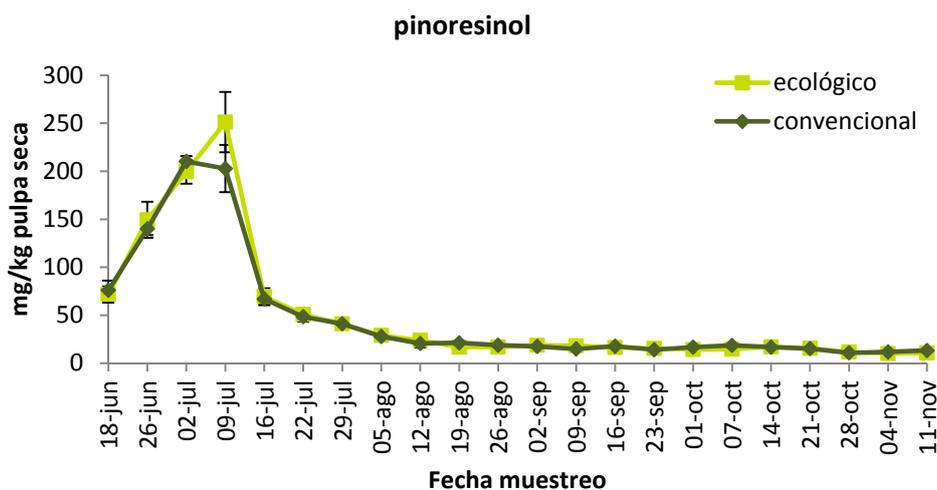
La ruta biosintética de los flavonoides es una de las más estudiadas y sin embargo su interpretación sigue presentando dificultad. Actualmente no se considera que la ruta sea un ensamblaje de componentes independientes, sino que se aborda como el resultado de un trabajo en red perfectamente orquestado. Considerar las enzimas que intervienen utilizando métodos de genómica, proteómica y metabolómica está llevando a acercarse a comprender estos mecanismos. Este tipo de estudio ha quedado fuera de nuestro alcance y únicamente podemos afirmar comparando la evolución de los compuestos flavonoides analizados, que los mecanismos de biosíntesis de flavonoides han presentado tendencias paralelas en las olivas de las dos parcelas estudiadas, que las diferencias cuantitativas han sido mínimas y significativas únicamente en algunos muestreos, por lo que se concluye que el contenido final en flavonoides no se ha visto afectado porque el cultivo se haya conducido con prácticas de la agricultura convencional o ecológica.

#### **6.2.3.2. Lignanos**

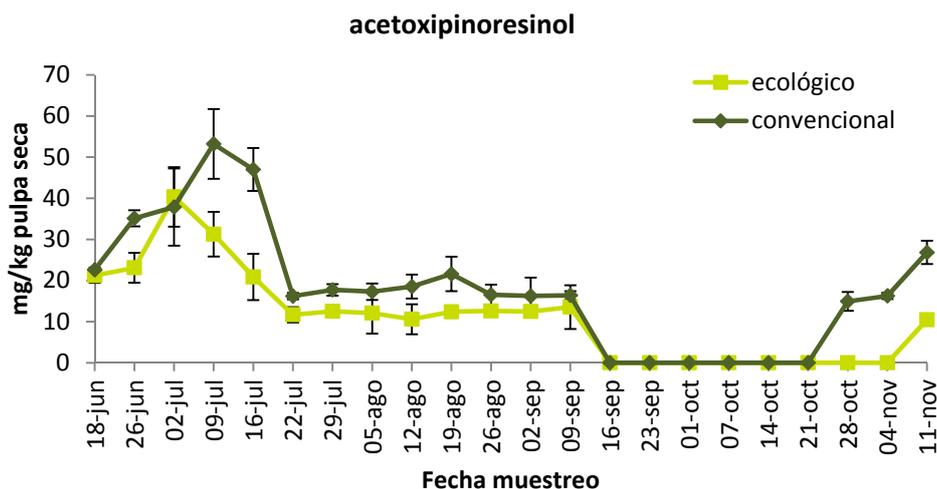
Con respecto a la composición en lignanos, algunos trabajos han identificado pinoresinol y acetoxipinoresinol en aceites de diferentes variedades y orígenes (Allalout et al., 2009; Brenes et al., 2000, 2002; Giuffrè et al., 2010; Krichene et al., 2007; Morelló et al., 2005b; Servili et al., 2007b), aunque no en la pulpa de la oliva (Bouaziz et al., 2010; Jerman et al., 2010; Morelló et al., 2005b; Sivakumar et al., 2005). Se creía que toda la concentración de lignanos presentes en el aceite de oliva podían ser proporcionados por el hueso durante el proceso de extracción, ya que el hueso contiene pinoresinol y acetoxipinoresinol (Bonoli et al., 2004; Oliveras-López et

al., 2008). Sin embargo, algunos estudios muestran que aceites de oliva extraídos a partir de frutos deshuesados sí contienen lignanos (Gambacorta et al., 2010; Ranalli y Contento, 2010; Servili, 2007a); por tanto, se confirmaría la presencia de lignanos en la pulpa del fruto. Hasta lo que conocemos, solamente en un estudio de Baiano et al. (2009) fueron cuantificados pinosresinol y acetoxipinosresinol en pulpa de oliva de algunas variedades italianas como *Leccino*, *Frantoio* y *Moraiolo*, mientras que Oliveras-López et al. (2008) sólo detectaron acetoxipinosresinol en muy baja concentración en la pulpa de una variedad llamada *Taggiasca*, de las cuatro estudiadas.

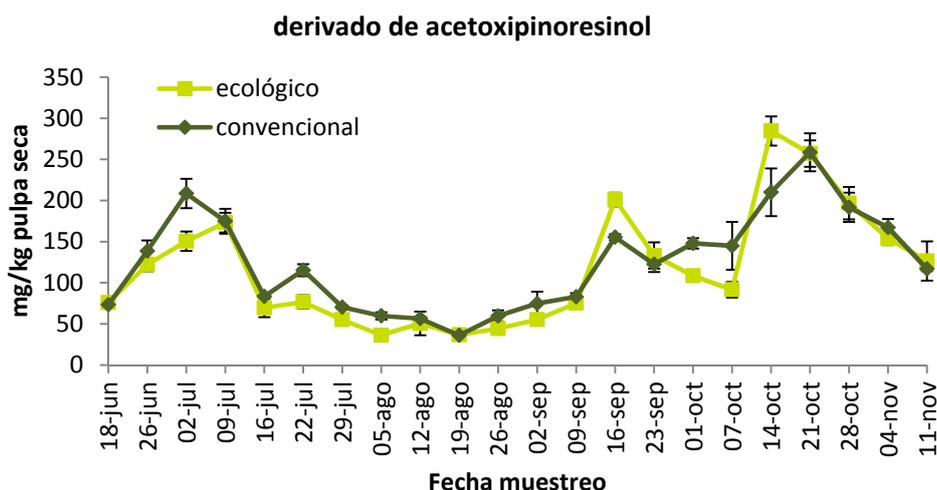
En el presente trabajo, los compuestos pinosresinol, acetoxipinosresinol y un derivado de acetoxipinosresinol han sido identificados y cuantificados (Figura 30) desde los primeros estadíos del desarrollo de los frutos de la variedad *Arbequina*. Todos ellos se han cuantificado en base a la curva de calibrado de pinosresinol comercial. Se ha detectado la presencia de pinosresinol y el derivados de acetoxipinosresinol en el fruto en todos los muestreos y se confirma por tanto su presencia en la pulpa, incluso a partir del quinto muestreo, en que se pudo separar el hueso para hacer el extracto fenólico únicamente de la pulpa.



**Figura 30A.** Evolución de pinosresinol (mg/kg pulpa seca) a lo largo de la maduración de frutos de la variedad *Arbequina* en cultivo ecológico y tradicional.



**Figura 30B.** Evolución de acetoxipinoresinol (mg/kg pulpa seca) a lo largo de la maduración de frutos de la variedad *Arbequina* en cultivo ecológico y tradicional.



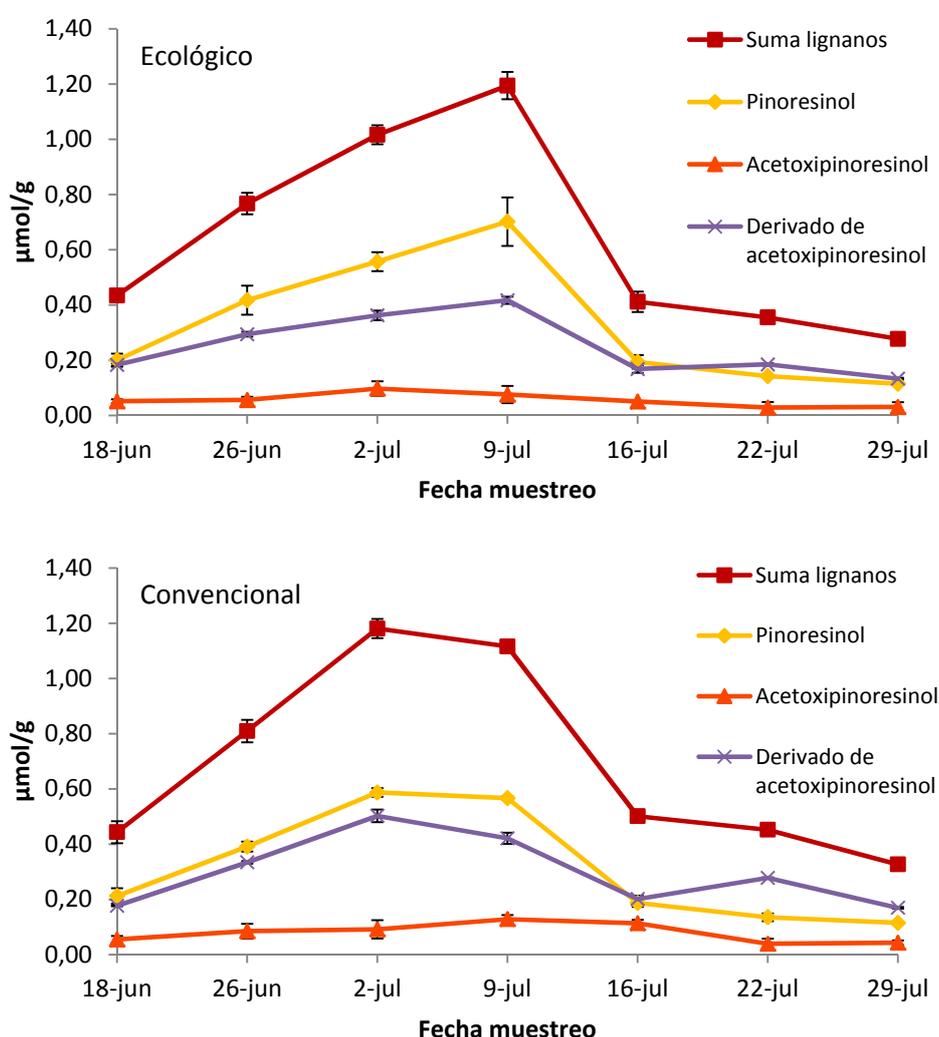
**Figura 30C.** Evolución del derivado del acetoxipinoresinol (mg/kg pulpa seca) a lo largo de la maduración de frutos de la variedad *Arbequina* en cultivo ecológico y tradicional.

La evolución de los lignanos en pulpa son muy diferentes. El pinoresinol está en una concentración muy baja, de 10 a 20 mg/kg de pulpa seca, desde poco después del endurecimiento del hueso y se mantiene constante. La concentración en acetoxipinoresinol aumenta durante el endurecimiento del hueso para descender posteriormente a 10-20 mg/kg de pulpa seca, y mantenerse constante hasta el muestreo del 9 de septiembre. Posteriormente, no se detecta en los muestreos del 16 de septiembre al 21 de octubre y al 4 de noviembre, en el cultivo convencional y ecológico, respectivamente, para aumentar ligeramente hacia el final de la maduración. Sin embargo, el derivado de acetoxipinoresinol está en concentraciones elevadas a lo largo de todos los muestreos, observándose una síntesis

neta conforme avanza la maduración, a partir del momento en que el fruto pierde la coloración verde intensa. Precisamente los aceites de *Arbequina* han sido considerados como ricos en acetoxipinoresinol, contrariamente a otras variedades como la *Picual*, en las que apenas está presente (Brenes et al., 2002).

### 6.2.3.3. Relación entre la biosíntesis de lignanos y flavonoides

Para estudiar una posible conexión entre la formación de lignanos y flavonoides se ha comparado la evolución de estos en los primeros muestreos. La Figura 31 presenta las concentraciones de lignanos cuantificados individualmente y la suma total de lignanos durante los siete primeros muestreos, expresado en  $\mu\text{mol/g}$  fruto seco.

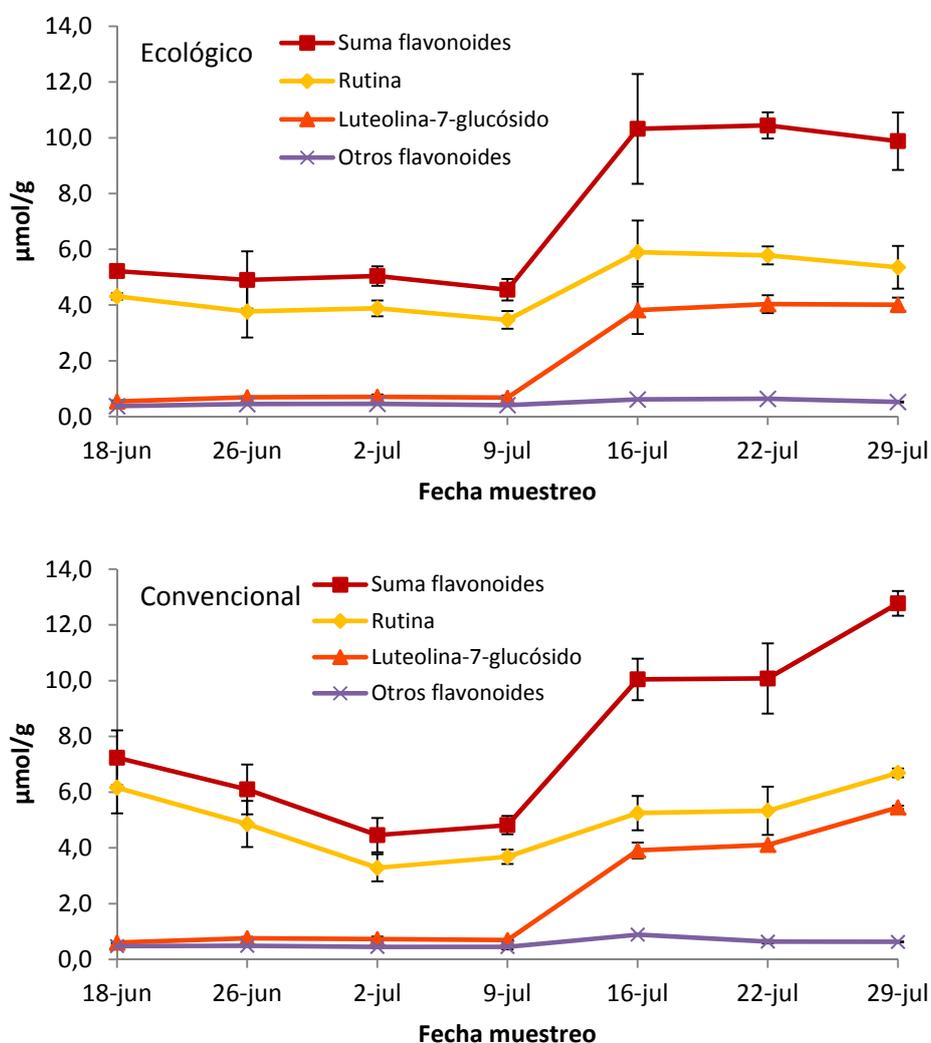


**Figura 31.** Concentración de lignanos ( $\mu\text{mol/g}$  pulpa seca) durante en la etapa de cuajado y endurecimiento del hueso.

Los frutos convencionales y de producción ecológica siguieron una misma tendencia: del primer al cuarto muestreo en ecológico y al tercero en convencional, la concentración en

lignanós aumentó hasta un máximo próximo a 1.2  $\mu\text{mol/g}$  en frutos de cultivo ecológico y de cultivo convencional. Seguidamente, se puede observar una caída brusca en la concentración, reduciéndose a menos de la mitad, a 0.41 y 0.50  $\mu\text{mol/g}$  en los frutos ecológicos y convencionales, respectivamente. En los muestreos posteriores, se observa todavía una disminución en la concentración, aunque mucho menos pronunciada, hasta alcanzar 0.28 y 0.33  $\mu\text{mol/g}$  en el séptimo muestreo en los frutos ecológicos y convencionales, respectivamente.

En la Figura 32. se representan las concentraciones de rutina y luteolina-7-glucósido, la suma de los otros flavonoides cuantificados (apigenina, luteolina, luteolina-glucósido, apigenina-7-glucósido, apigenina-rutinósido, luteolina-rutinósido, metoxiluteolina, quercetina-ramnósido y eriodictiol-glucósido) y la suma total de flavonoides en frutos de cultivo ecológico y de cultivo convencional durante los siete muestreos.



**Figura 32.** Concentración de flavonoides ( $\mu\text{mol/g}$  pulpa seca) en la etapa de cuajado y endurecimiento del queso.

En el contenido total en flavonoides, tanto en frutos ecológicos como en convencionales, se ha observado un incremento importante en la concentración del cuarto al quinto muestreo, momento en el cuál la concentración se dobló, de 4.5 a 10.3  $\mu\text{mol/g}$  en frutos ecológicos y de 4.8 a 10.0  $\mu\text{mol/g}$  en los frutos convencionales. También del cuarto al quinto muestreo, se observa un aumento significativo en la concentración de luteolina-7-glucósido, momento en que quintuplicó su contenido. La rutina fue el flavonoide mayoritario, representando entre el 75 y el 85% del contenido total en flavonoides hasta el cuarto muestreo, mientras que en los muestreos posteriores representó entre un 50 y un 65%. En lo concerniente al tipo de cultivo, el contenido en flavonoides fue similar en los frutos ecológicos y convencionales, con excepción de los muestreos 1, 2 y 7, en los cuáles el contenido en flavonoides fue mayor en los frutos de cultivo convencional que en los ecológicos.

Comparando las evoluciones mostradas por flavonoides y lignanos se observa que la síntesis neta de flavonoides empieza a ser evidente en el momento en que dejan de formarse lignanos. Ambas familias, tal y como muestra la Figura 11, son formadas a partir de la fenilalanina mediante la ruta de biosíntesis de los fenilpropanoides. Por tanto, en la biosíntesis de los fenilpropanoides, la ruta estaría dirigida hacia la formación de los monolignoles, para sintetizar lignina como parte del hueso. Como se puede observar en la Figura 12, se siguen los mismos pasos en la ruta para la formación del alcohol coniferílico y del pinosinol, ya que el pinosinol es resultado de la unión de dos moléculas de alcohol coniferílico. De acuerdo con nuestros resultados, esto explicaría el incremento en la concentración de los lignanos durante los primeros cuatro muestreos, debido a la alta actividad de esta parte de la ruta. Por tanto, mucha de la fenilalanina que desaparece habría sido utilizada para la formación de la lignina y los lignanos, quedando la parte de la ruta por la que se sintetizan los flavonoides mucho menos activa. Así, la concentración de flavonoides se mostró más o menos constante (en el caso de los frutos ecológicos) o incluso llegó a descender (en los frutos convencionales) durante los primeros cuatro muestreos.

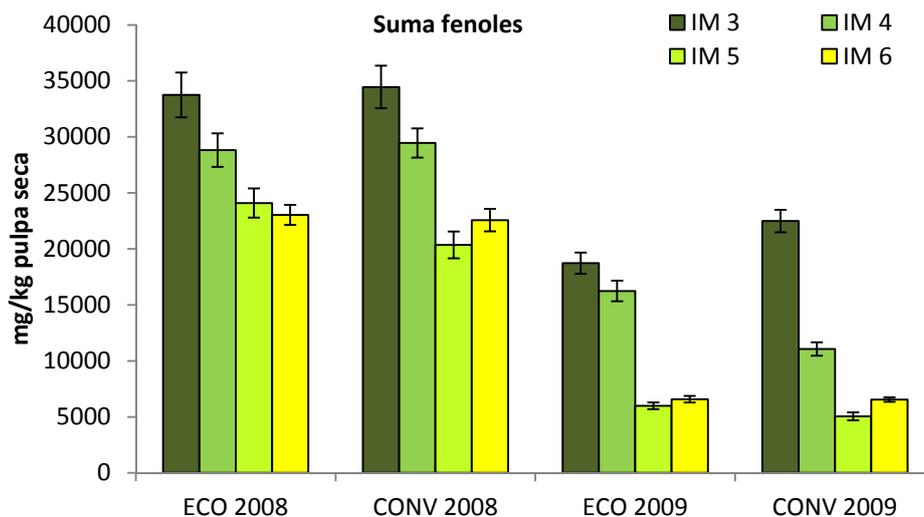
A partir del quinto muestreo, en que el hueso ya estaba prácticamente formado, los papeles se intercambiarían: la formación de ligninas y lignanos se paralizaría, y sería entonces cuando el metabolismo biosintético estaría más dirigido hacia la formación de los flavonoides. Es por ello que en los muestreos 5, 6 y 7 se observaría un incremento en la concentración de flavonoides y una disminución en la concentración de lignanos. En un estudio de Hu et al. (2011), en que se realizó un análisis proteómico del endocarpo y mesocarpo del melocotón en su fase de formación del hueso y del fruto, observaron que la expresión de las enzimas implicadas en la síntesis de la lignina y las implicadas en la síntesis de los flavonoides tenía lugar en momentos diferentes a nivel proteómico. Este hecho corroboró el modelo que afirma que las rutas biosíntesis de lignina y flavonoides son competitivas en el endocarpo durante el desarrollo del fruto, tal y como apuntaron Dardick et al. (2010) también en melocotón.

Comparando los resultados de la evolución de los lignanos y flavonoides de nuestro experimento con el experimento de Sevilla mencionado anteriormente, se observan tendencias paralelas, aunque no se puede observar un efecto tan claro debido a que los muestreos se realizaron con menor frecuencia. Sí que existen diferencias significativas en el contenido en lignanos; los frutos de cultivo ecológico en el experimento de Sevilla contienen mayor concentración que los frutos del cultivo tradicional.

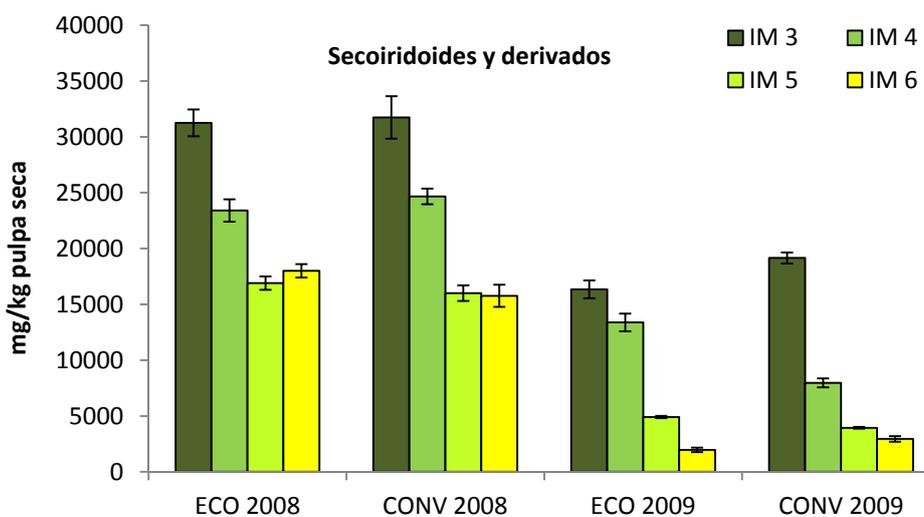
En resumen, se han identificado y cuantificado lignanos y flavonoides en frutos de olivo en estadios muy tempranos de desarrollo y se han correlacionado con la síntesis de lignina para la formación del hueso. Además, se ha comprobado que en las condiciones de nuestro ensayo, con frutos de cultivo ecológico y convencional en una localización muy próxima y sin manifestaciones de estrés hídrico o por plagas, no existen diferencias significativas en el desarrollo del fruto, ni en el contenido en lignanos y flavonoides. Los resultados de los ensayos llevados a cabo en Sevilla con la misma variedad (datos no presentados) muestran que las diferencias entre cultivo ecológico y convencional también allí son mínimas, aunque mayores que en Lleida, siendo mayores las diferencias absolutas en las concentraciones de los distintas familias de fenoles cuando se compara según su origen. A la vista de ello, podría darse la situación de que entre olivas de cultivo ecológico y no ecológico pudiesen encontrarse diferencias cuando los cultivos estuviesen sometidos a diferentes condiciones agroclimáticas-luz, estrés hídrico, temperatura elevada- bajo las cuales se pudieran expresar de forma diferente los genes responsables de modular el complejo sistema enzimático que regula todos estos procesos biosintéticos y catabólicos. Esto explicaría que algunos estudios en los que no se ha controlado rigurosamente el origen de las muestras si que se encuentren diferencias significativas entre aceites de producción ecológica y tradicional.

#### **6.2.4. Evolución de compuestos fenólicos en dos campañas sucesivas**

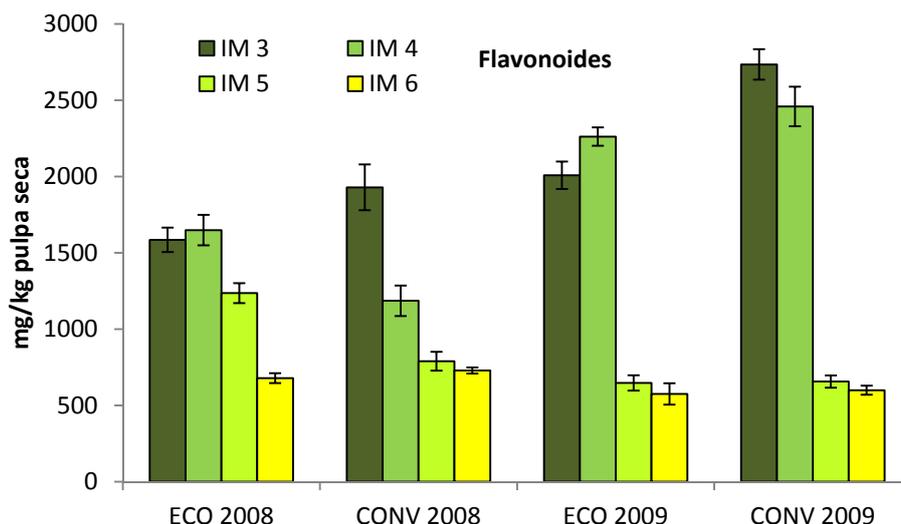
Como ya se ha indicado anteriormente, el estudio completo de la evolución de la fracción fenólica durante la maduración en cultivos convencional y ecológico con el fin de confirmar el metabolismo de los secoiridoides y analizar la repercusión de la actividad glucosidasa que se han descrito en los apartados anteriores se hizo en la segunda campaña estudiada (2009/10) En esta campaña se decidió realizar un muestreo muy completo para poder evaluar la tendencia en el comportamiento de los fenoles sin las posibles interferencias que las fluctuaciones naturales podían presentar y evitando así perder información y poder identificar metabolitos intermedios. No obstante, también en la campaña anterior se había hecho un seguimiento, aunque con menor frecuencia de muestreo en la época inicial. Tanto en la primera como en la segunda campaña estudiadas se preparó un *pool* de extractos en aquellos estadios de maduración correspondientes a las maduraciones comerciales, próximas a índices de madurez 3, 4, 5 y 6, con la intención de analizar la posible variabilidad interanual. Se identificaron compuestos fenólicos y su evolución, agrupados en las familias más representativas, que se presenta en las siguientes figuras.



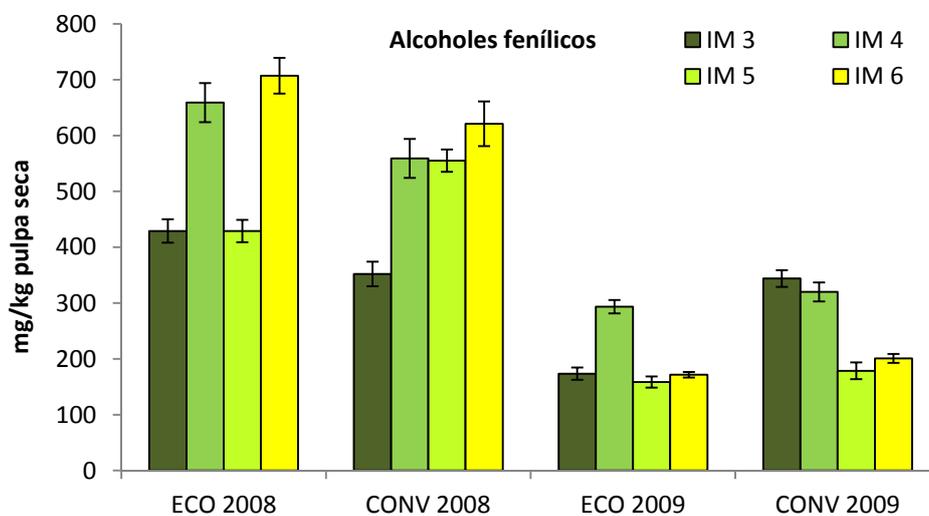
**Figura 33.** Concentración de compuestos fenólicos totales (mg/kg de pulpa seca) en frutos de oliva de cultivo ecológico y convencional en cuatro estados de madurez a lo largo de las campañas 2008/09 y 2009/10 (IM: índice de madurez).



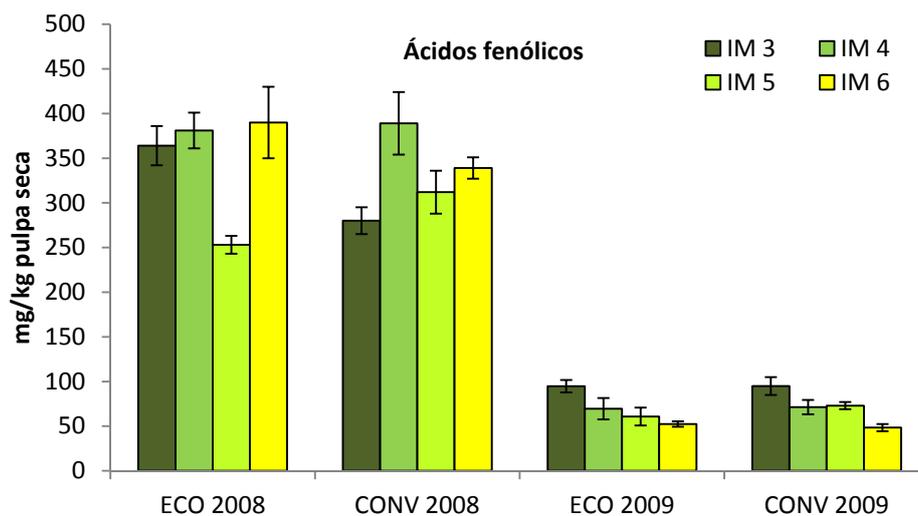
**Figura 34.** Concentración de compuestos secoiridoides (mg/kg de pulpa seca) en frutos de oliva de cultivo ecológico y convencional en cuatro estados de madurez a lo largo de las campañas 2008/09 y 2009/10 (IM: índice de madurez).



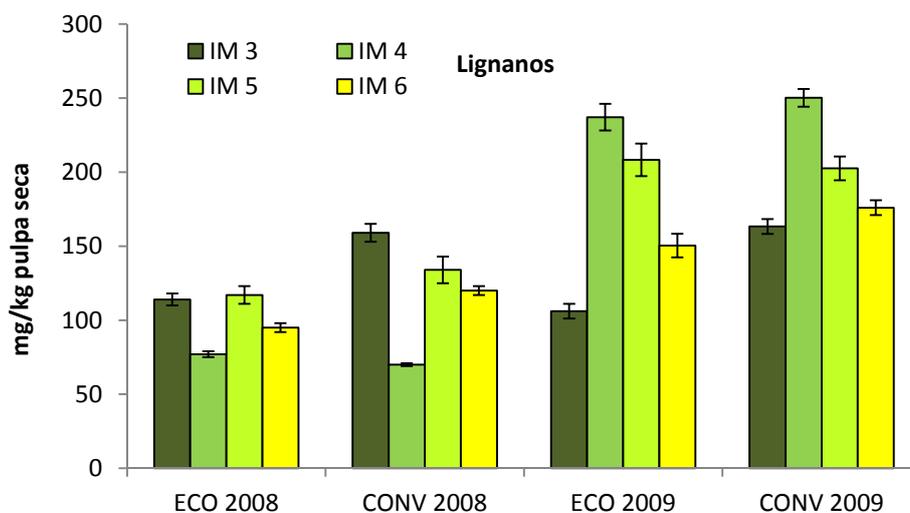
**Figura 35.** Concentración de flavonoides no antocianicos (mg/kg de pulpa seca) en frutos de oliva de cultivo ecológico y convencional en cuatro estados de madurez a lo largo de las campañas 2008/09 y 2009/10 (IM: índice de madurez).



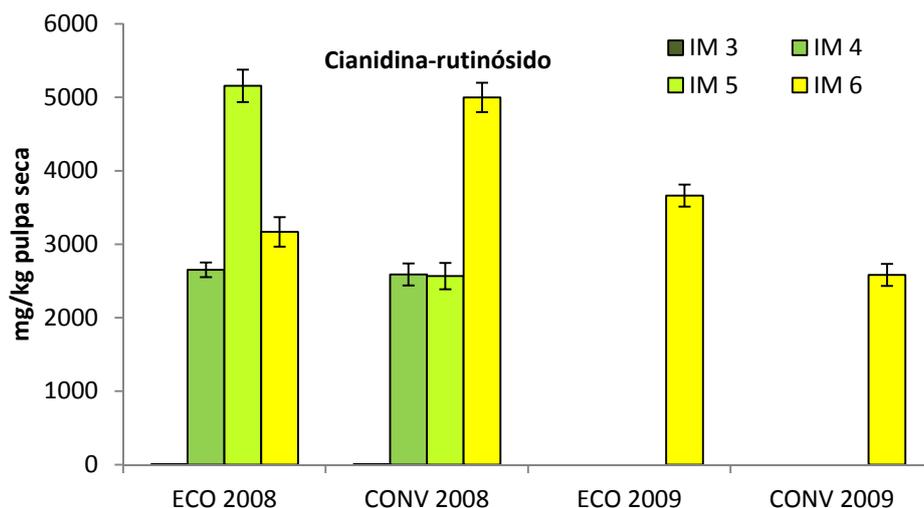
**Figura 36.** Concentración de alcoholes fenólicos (mg/kg de pulpa seca) en frutos de oliva de cultivo ecológico y convencional en cuatro estados de madurez a lo largo de las campañas 2008/09 y 2009/10 (IM: índice de madurez).



**Figura 37.** Concentración de ácidos fenólicos (mg/kg de pulpa seca) en frutos de oliva de cultivo ecológico y convencional en cuatro estados de madurez a lo largo de las campañas 2008/09 y 2009/10 (IM: índice de madurez).



**Figura 38.** Concentración de lignanos (mg/kg de pulpa seca) en frutos de oliva de cultivo ecológico y convencional en cuatro estados de madurez a lo largo de las campañas 2008/09 y 2009/10 (IM: índice de madurez).



**Figura 39.** Concentración de cianidinas (mg/kg de pulpa seca) en frutos de oliva de cultivo ecológico y convencional en cuatro estados de madurez a lo largo de las campañas 2008/09 y 2009/10 (IM: índice de madurez).

Como era esperado, los perfiles de ambas campañas son cualitativamente iguales, siendo la familia de secoiridoides la más abundante. Su proporción con respecto a los fenoles totales disminuye con la maduración, representando en frutos de índice 3 un porcentaje entre el 85 y 90 % que fue disminuyendo hasta ser del orden del 70 % en la campaña 2008 y del 40-45 % en la campaña 2009. La mayor degradación de secoiridoides en el año 2009 pudo estar relacionada con las mayores temperaturas del invierno, ya que la temperatura mínima y máxima de los meses octubre a diciembre fueron 6.5 °C y 15.5 °C, respectivamente, mientras que en 2008 fueron 4.4 °C y 12.7 °C (Datos meteorológicos de la estación de la Granadella, anejo al final del documento).

Se identificaron los lignanos acetoxipinoresinol, derivado de acetoxipinoresinol y pinoresinol, aunque el pinoresinol no se pudo cuantificar en el año 2008 por estar su concentración por debajo del límite de cuantificación. Además, en el año 2009 estuvo presente en muy baja concentración, del orden del 5-15 % de los lignanos. El derivado de acetoxipinoresinol es el lignano mayoritario. Este compuesto experimentó una disminución con la maduración en 2009; sin embargo, en 2008 la tendencia no fue tan clara. Las tendencias entre cultivo convencional y ecológico fueron similares en cada campaña, aunque se observaron a lo largo de la maduración fluctuaciones en la composición difíciles de interpretar. Destaca que el derivado de acetoxipinoresinol estuvo presente en concentración más elevada en los frutos de cultivo convencional, aunque con escasa significación.

La mayor concentración de cianidina rutinósido en el año 2008 podría deberse a una mayor radiación neta en ese año. A pesar de las bajas temperaturas ambientales, Lleida es una zona de gran radiación solar neta y según los registros de este parámetro, en el año 2008 la

radiación fue superior a la 2009. Numerosos estudios llevados a cabo en diferentes cultivos indican que estos compuestos juegan un papel fisiológico protegiendo del daño ocasionado por la luz solar, por lo que podría existir esa correlación positiva entre intensidad y horas de luz y concentración de cianidina-rutinósido. Merzlyak y Chivkunova (2000), después de haber estudiado la exposición a la luz de dos variedades de manzanas, propusieron que las antocianidinas tienen una función protectora actuando como filtro, completando así la banda de absorción de las clorofilas. Jia et al. (2005) encontraron que los frutos cubiertos con bolsas forman menos antocianos que los que están sin proteger. También en uva hay estudios que relacionan los antocianos con la luz (Bergqvist et al., 2001; Spayd et al., 2002).

En definitiva, a la vista de los resultados de nuestro trabajo, se sugiere que no hay una relación definida entre el sistema de cultivo, convencional y ecológico, y la concentración de fenoles a lo largo de la maduración. Al mismo tiempo, se observa que la variabilidad interanual debida a factores agroclimáticos es mucho más importante que el sistema de cultivo.



### 6.3. LOCALIZACIÓN TISULAR DE LA ENZIMA $\beta$ -GLUCOSIDASA EN OLIVAS DE LA VARIEDAD ARBEQUINA

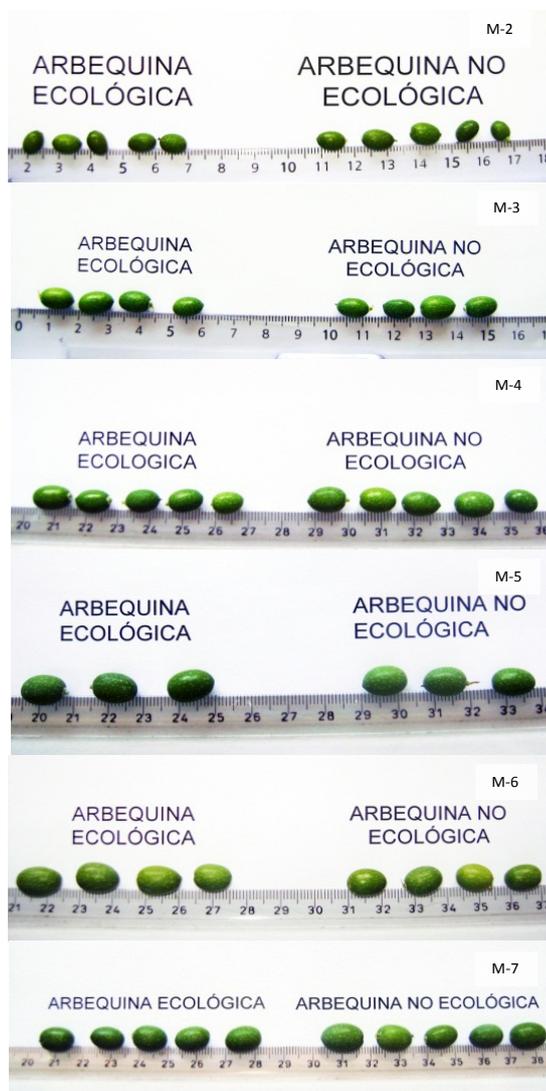
En esta experiencia se estudió la localización *in situ* de la enzima  $\beta$ -glucosidasa a nivel celular en los primeros estadios de desarrollo del fruto. Este estudio se llevó a cabo en frutos de la variedad *Arbequina* de cultivo ecológico y convencional de Els Torms (Lleida) durante la campaña 2009/10.

#### 6.3.1. Desarrollo del fruto

Este estudio se lleva a cabo en estadios muy tempranos de crecimiento del fruto del olivo, realizando muestreos semanales del 18 de junio al 29 de julio de 2009. Las características del fruto se muestran en la Figura 23. El peso medio del fruto aumentó de manera casi proporcional semanalmente, desde 0.07 g en el primer muestreo a 0.66 g en el séptimo, y de igual manera en los frutos ecológicos y convencionales. La humedad del fruto fue muy alta durante los primeros muestreos (63-65%), siendo un poco mayor en los frutos convencionales que en los ecológicos. A partir del segundo muestreo, la humedad comenzó a disminuir, hasta hacerlo de una forma más acusada después del cuarto, alcanzando una humedad del 51.2% en los frutos ecológicos y un 53.8% en los convencionales en el séptimo muestreo. El peso del hueso mostró una tendencia similar en los frutos de ambos tipos de cultivo: del primer al cuarto muestreo, los frutos no contenían hueso; en cambio, fue en el quinto muestreo cuando el hueso ya se pudo distinguir en el fruto, representando un 17.2 y un 12.6% del peso total del fruto en los frutos ecológicos y convencionales, respectivamente. El hueso incrementó su tamaño y peso hasta el último muestreo, en que representó el 30.1% y el 32.6% del peso total del fruto en los frutos ecológicos y convencionales, respectivamente.

Así por tanto, con el análisis de los pesos y la humedad de los frutos a lo largo de los siete muestreos, se podría decir que los frutos de ambos cultivos tuvieron un crecimiento semejante. En la Figura 40A se muestran fotografías de los frutos del segundo al séptimo muestreo (no se dispone de fotografías del primer muestreo) de ambos tipos de cultivo, en las que se puede observar que los frutos crecen de manera paralela. Como se puede observar en la Figura 40B, en la que se muestran los frutos seccionados del tercer al quinto muestreo, durante el tercer y cuarto muestreo, el hueso se estaba formando, ocupando entre el 80% y el 90% del volumen del fruto, que presentaba muy poca cantidad de pulpa. También se observa una cavidad en el centro del endocarpo, que contenía la semilla. En estos muestreos, aunque el hueso se estaba formando, se consideró que el porcentaje de hueso fue cero, ya que no se podía distinguir del resto del fruto, además de no tener la pared endurecida. Fue en el quinto muestreo cuando ya se pudo distinguir, separar y pesar el hueso del fruto por separado. En la fotografía se puede observar un hueso mucho más endurecido, que mostró dificultad al corte. En el quinto, sexto y séptimo muestreos, el hueso ya estaba totalmente formado, con una pared lignificada más gruesa y endurecida, y claramente diferenciado de la pulpa y la piel. Por tanto, en los

muestreros del 1 al 4 se realizaron extracciones de fenoles del fruto entero, mientras que del muestreo 5 al 7, ya se pudo separar el hueso, por lo que las extracciones se realizaron solo de la pulpa.



**Figura 40A.** Fotografías correspondientes a las olivas de la variedad *Arbequina* en las diferentes fechas de muestros de cultivo ecológico y de cultivo convencional.



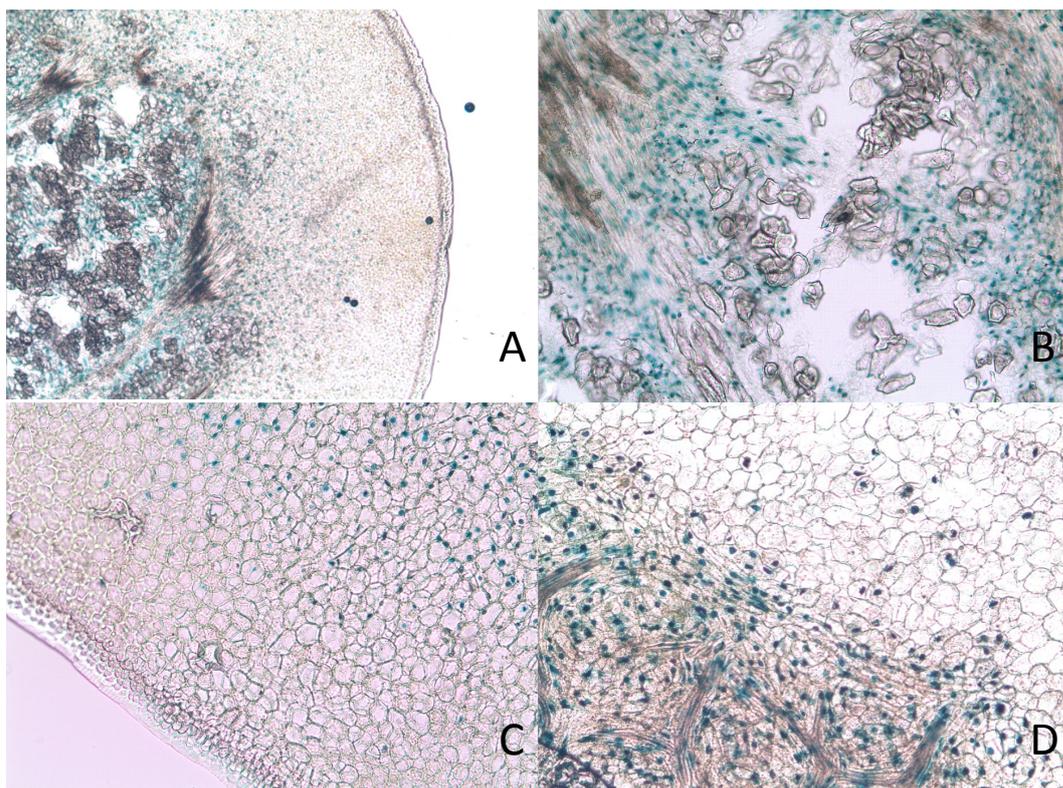
**Figura 40B.** Fotografías correspondientes a las olivas de la variedad *Arbequina* en las diferentes fechas de muestreos de cultivo ecológico y de cultivo convencional.

### 6.3.2. Localización de la enzima $\beta$ -glucosidasa

Con el objetivo de estudiar la distribución *in situ* de la actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en la oliva, se realizaron cortes longitudinales de la oliva mediante un vibratomo y se incubaron las láminas durante 1 hora a 37 °C en una solución que contenía un sustrato específico para la enzima llamado X-Glc. Cuando la enzima  $\beta$ -glucosidasa hidroliza este sustrato, se forma un precipitado de color azul, cuya visualización se realiza mediante un microscopio óptico. En todos los muestreos, se pudo llegar a cortar hasta a nivel del hueso, por lo que en las láminas obtenidas se pueden observar todas las partes del fruto: hueso, pulpa y piel. En la observación de las láminas, no se encontraron diferencias apreciables en la distribución ni en la cantidad de actividad entre las láminas frutos ecológicos o convencionales.

Las láminas fueron observadas mediante microscopio óptico y fotografiadas a cuatro aumentos diferentes: a 40x y a 100x para observar la distribución general de los tejidos y las diferentes partes del fruto; y a 400x y a 1000x para observar las células más detalladamente.

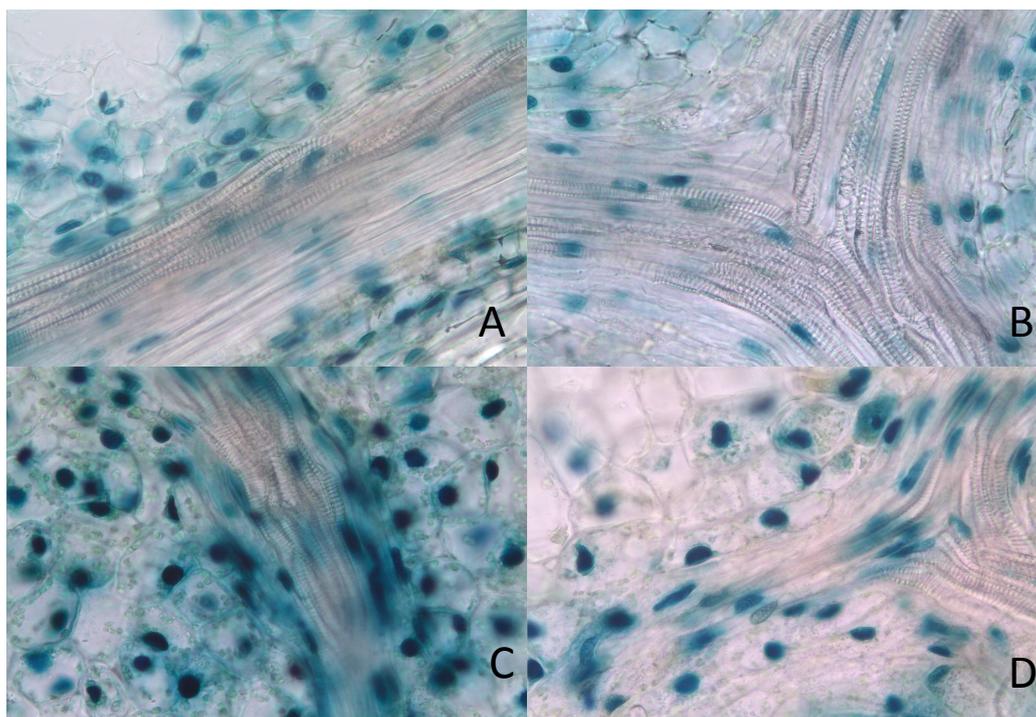
En la Figura 41, se pueden observar fotografías de láminas de los diferentes muestreos a 40x (Figura 41A) y a 100x (Figuras 41B, 41C y 41D). En general, cuando las láminas se observaron a un menor número de aumentos, se pudo distinguir la presencia de una mayor actividad  $\beta$ -glucosidasa en la zona de formación del hueso que en el resto de la lámina.



**Figura 41.** Fotografías de las secciones de los frutos: Fig 41A (40X) sección del segundo muestreo; Fig 41B (40X) sección del segundo muestreo; Fig 41C (40X) sección del tercer muestreo; Fig 41D (40X) sección del séptimo muestreo.

En la Figura 41A, que pertenece al segundo muestreo, se puede observar claramente una concentración de actividad  $\beta$ -glucosidasa en el centro de la sección, dónde también se pueden ver algunas fibras del hueso en formación. En la Figura 41B, que también corresponde al segundo muestreo, se puede observar el centro de una de las secciones más detalladamente, en dónde las células están esclerificando para formar el hueso. En la Figura 41C, que pertenece al tercer muestreo, se observa cómo hay más actividad en las células del centro de la lámina que en las situadas más hacia el exterior. Lo mismo se observa en la Figura 41D, la cuál pertenece al séptimo muestreo, en la cuál son visibles más cantidad de fibras del hueso, rodeadas por células con actividad  $\beta$ -glucosidasa, disminuyendo la cantidad de células reactivas a medida que están situadas más hacia el exterior.

En la Figura 42 se muestran secciones del hueso de diferentes muestreos a 400x. Las Figuras A, B, C y D pertenecen a los muestreos 2, 3, 4 y 7, respectivamente. En las fotografías, se pueden ver claramente las fibras del hueso y cómo las envuelven células con actividad  $\beta$ -glucosidasa. En estas células se tiñe principalmente el núcleo.

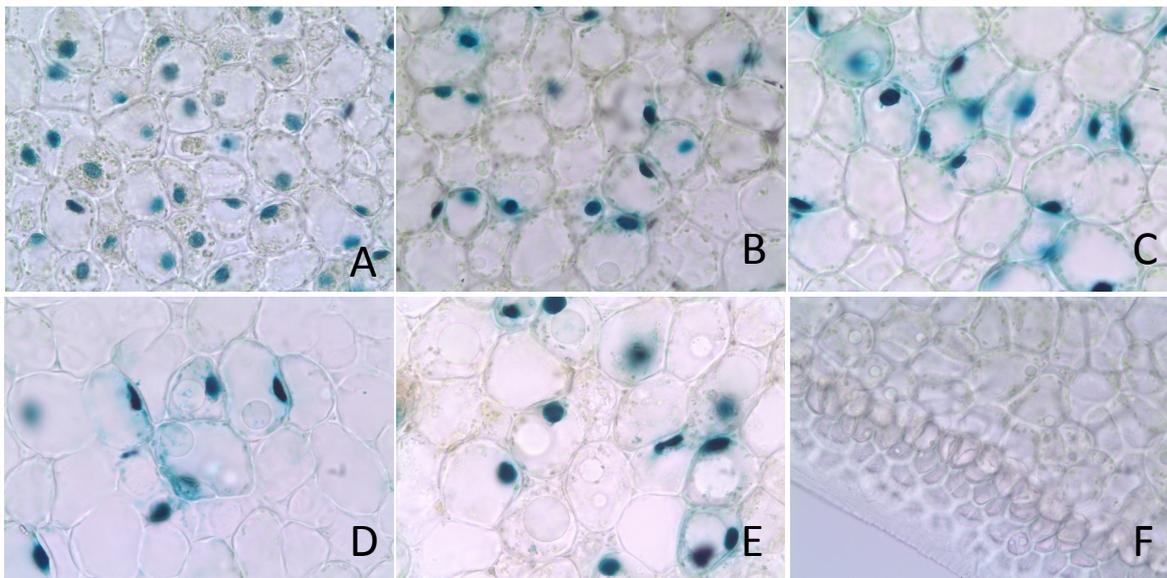


**Figura 42.** Fotografías de las secciones de los frutos en la parte del hueso: Fig 42A (400X) sección del segundo muestreo; Fig 42B (400X) sección del tercer muestreo; Fig 42C (400X) sección del cuarto muestreo; Fig 42D (400X) sección del séptimo muestreo.

En la Figura 43 se observa la parte de la pulpa (A, B, C, D y E) y la parte de la piel (F) de secciones de frutos a 400x. Las fotografías A, B, C, D, y E pertenecen a los muestreos 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente. En primer lugar, se observa como aumenta el tamaño de las células a medida que crece el fruto, y que en cada muestreo, existe una mayor acumulación de aceite y las gotas de aceite son más grandes, a pesar de ser estadios tan tempranos de desarrollo de fruto. Con respecto a la actividad  $\beta$ -glucosidasa, se identifica que la parte teñida de la célula corresponde al núcleo. Aunque parece que hay un mayor número de células reactivas en la Figura 43A, se explica porque en el tercer muestreo todavía no se podía diferenciar la parte del hueso de la de la pulpa. Por tanto, la alta actividad enzimática observada pertenecería a la alta actividad en la zona de formación del hueso. Asimismo, la actividad  $\beta$ -glucosidasa también se localiza en otras partes de la célula, cómo en algunos cloroplastos y dentro de las gotas de aceite, tal y como se puede observar por ejemplo en las Figuras 43C y 43D. Basándonos en el estudio de Mazzuca et al. (2006), esta diferente localización podría deberse a la existencia de dos isómeros de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, uno que se detectaría en el núcleo y otro que se detectaría en los cloroplastos y en las gotas de aceite. La actividad detectada en el núcleo se atribuiría a una enzima no específica que hidrolizaría el sustrato X-Glc. Por el contrario, la enzima detectada en los cloroplastos y las gotas de aceite tendría una mayor especificidad por la molécula de oleuropeína. En el estudio de Mazzuca et al. (2006) plantearon la hipótesis sobre el origen de la actividad en estos orgánulos: la isoforma presente en los cloroplastos sería sintetizada en el citoplasma y entraría en el cloroplasto por la escisión de las secuencias

peptídicas de tránsito localizadas en el extremo N-terminal de la proteína precursora de  $\beta$ -glucosidasa (Mieszczak et al., 1992). Por otra parte, la enzima localizada en las gotas de aceite serían fragmentos del retículo endoplasmático atrapados durante la formación del aceite.

En la Figura 43F se muestra la parte de la piel de una sección de la oliva. Las células más internas de la piel son más grandes y contienen más cloroplastos que las externas. En relación a la actividad  $\beta$ -glucosidasa, en la piel del fruto no se observaron células reactivas en ninguna de las muestras.



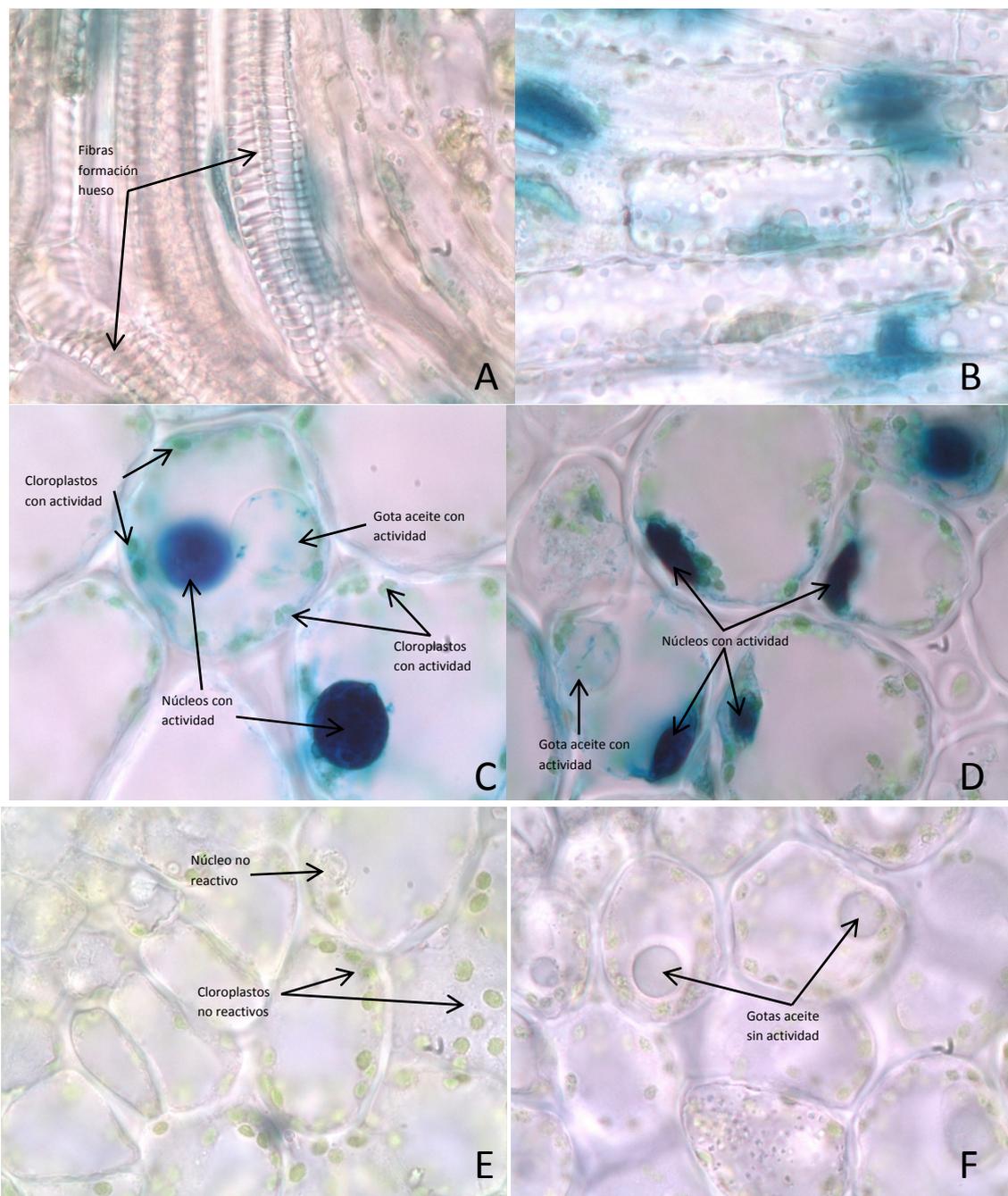
**Figura 43.** Fotografías de las secciones de los frutos: Fig 43A (400X) sección del tercer muestreo; Fig 43B (400X) sección del cuarto muestreo; Fig 43C (400X) sección del quinto muestreo; Fig 43D (400X) sección del sexto muestreo; Fig 43E (400X) sección del séptimo muestreo; Fig 43F (400X) sección del séptimo muestreo.

Con el análisis de las fotografías, se puede afirmar que hasta el cuarto muestreo, se observaron más células reactivas en el centro de las láminas, rodeando la zona de formación del hueso. No obstante, a partir del quinto muestreo, aunque seguía habiendo mayor actividad en la zona del centro de la lámina, existían también células reactivas en la pulpa. Este hecho coincide con las observaciones de Mazzuca et al. (2006), que afirmó que en frutos inmaduros, las células reactivas se localizaron en la parte del mesocarpo más interna, mientras que en los frutos verdes, se distribuían por todo el mesocarpo.

En la Figura 44 se muestran fotografías a 1000x del hueso (44A y 44B), la pulpa (44C y 44D) y la piel (44E y 44F). En la Figura 44A, se pueden observar las fibras de formación del hueso. En la Figura 44B se muestra la diferente forma que tienen las células que están cerca del hueso, ya que son más angulares que las células de la pulpa. En las Figuras 44C y 44D, donde se muestran células de la pulpa, la parte teñida es el núcleo. Sin embargo, se pueden observar otros

componentes celulares como los cloroplastos (algunos de ellos teñidos), gotas de aceite, las paredes celulares y los espacios intracelulares. En estas dos fotografías se observa actividad  $\beta$ -glucosidasa en las gotas de aceite, localizada en unas estructuras de forma alargada, lo que podrían ser fragmentos del retículo endoplasmático. En la Figuras 44E y 44F, en las que se muestran fotografías de las células de la piel del fruto, se observa que estas células no son reactivas al X-Glc (no tienen los núcleos de color azul), y su forma y tamaño es menor cuanto más al exterior se encuentran. En estas fotografías también se pueden distinguir los cloroplastos, las paredes celulares, los espacios intracelulares y pequeñas gotas de aceite.

Como se ha visto, existe una alta actividad  $\beta$ -glucosidasa en la zona de formación del hueso, sobretodo en los frutos del primer al cuarto muestreo. Se cree que esta actividad podría estar relacionada con la formación de la lignina, que es un componente del hueso junto con la celulosa y la hemicelulosa. Algunos estudios (Dharmawardhana et al., 1995; Escamilla-Treviño et al., 2006; Hösel et al., 1978) han señalado que la enzima  $\beta$ -glucosidasa puede estar implicada en el momento previo a la unión de los monolignoles para formar la lignina. Una de las hipótesis planteadas es que los monolignoles son sintetizados en el citoplasma de la célula y posteriormente transportados a través de la célula en su forma glucosilada, y que finalmente, cuando llegan a la pared celular, la enzima  $\beta$ -glucosidasa libera la glucosa de la molécula como paso previo a la unión de los monolignoles. En el presente estudio, se ha observado que las células más reactivas se encuentran rodeando las fibras que formarán el hueso, el cual está formado por lignina. Así, la actividad localizada en estos primeros muestreos se ocuparía en mayor parte de la formación de la lignina, más que de la hidrólisis de los compuestos fenólicos a sus formas agliconas, tal y como demuestra su ubicación en la zona de formación del hueso y la poca cantidad de oleuropeína degradada en estos primeros estadíos. En la Figura 25, se puede observar como la concentración de oleuropeína incluso aumenta del primer al segundo muestreo (22.6  $\mu\text{mol/g}$  en los frutos ecológicos y 52.8  $\mu\text{mol/g}$  en los frutos convencionales).



**Figura 44.** Fotografías de las secciones de los frutos a 1000X: Fig 44A y 44B parte del hueso; Fig 44C y 44D parte de la pulpa; Fig 44E y 44F parte de la piel.

Según la actividad  $\beta$ -glucosidasa cuantificada tal y como se muestra en la Figura 26, ésta aumenta a partir del cuarto muestreo. Esto coincide con el final de la fase de formación del hueso y con el hecho de que empiezan a observarse células reactivas en el resto del fruto, es decir, que no sólo se encuentran en la zona del endocarpo sino también en la zona del mesocarpo, por lo que se registra una mayor actividad enzimática. Que la enzima  $\beta$ -glucosidasa se localice en las células de la pulpa podría justificarse como mecanismo de defensa del fruto: la enzima hidroliza la oleuropeína formándose sus derivados agliconas

(Konno et al., 1999; Bianco et al., 1999), que se ha demostrado que tienen actividad antimicrobiana (Saija y Uccella, 2001) y actúan contra el ataque de herbívoros e insectos (Ryan y Robards, 1998). Spadafora et al. (2008) comprobaron como después de 20 minutos de realizar una punción al fruto de la oliva simulando la acción de la mosca del olivo (*Bactrocera oleae*), se observó una alta actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa en el tejido dañado, que posteriormente fue disminuyendo hasta valores comparables a frutos intactos a las 3 horas. Este hecho demostraría que desde el momento que los frutos empiezan a ser más susceptibles al ataque de insectos, que es cuando empiezan a tener pulpa que puede ser atravesada, se detecta actividad enzimática en las células del mesocarpo. Además, estos mismos autores realizaron la prueba en dos variedades de oliva, una susceptible al ataque de mosca y la otra no: en la susceptible, el contenido en oleuropeína se mantuvo, mientras que en la poco susceptible, el contenido en oleuropeína disminuyó. Esto significa que en la poco susceptible, esta oleuropeína fue degradada hacia los derivados secoiridoides, cuya concentración evitaría la deposición de huevos o posteriores punciones. La disminución en las concentraciones de oleuropeína y de su precursor ligustrósido, junto con el aumento en concentración de las formas agliconas de ambos (3,4-DHPEA-EA, 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EA y *p*-HPEA-EDA) debido a la actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa se puede observar en la Figura 26.

### 6.3.3. Conclusión

En esta experiencia se ha puesto de manifiesto la diferente localización de la enzima  $\beta$ -glucosidasa según el estado de desarrollo del fruto. En los primeros estadios de formación del fruto, cuando se está formando el hueso, la actividad  $\beta$ -glucosidasa se concentra en la zona de formación de éste. Esta actividad se cree que está dedicada a la formación de la lignina. En cambio, a partir del cuarto muestreo, coincidiendo con el final de la formación del hueso y el principio del engrosamiento de la pulpa, esta actividad enzimática empieza a aparecer también en las células de la pulpa. Esto se traduce en un incremento de la actividad enzimática y de la concentración de las formas agliconas de la oleuropeína, justificándose como mecanismo de defensa ante el posible ataque de herbívoros o insectos.



#### 6.4. ESTUDIO DE ACEITES DE OLIVA ECOLÓGICOS DE LA VARIEDAD *ARBEQUINA* DE LA PROVINCIA DE LLEIDA DURANTE LAS CAMPAÑAS OLEÍCOLAS 2009/10 Y 2010/11

El objetivo de esta experiencia fue la evaluación en parámetros de calidad de los aceites comerciales de la variedad *Arbequina* de cultivo ecológico de almazaras situadas en la zona olivarera de Lleida, todas ellas reconocidas por el Consejo Catalán de Producción Agraria Ecológica (CCPAE) durante las campañas oleícolas de 2009 y 2010, tal y como se detalla en el apartado 5.2.1.1. de Material y métodos. En la campaña 2010 se tomaron muestras de las mismas almazaras que en 2009 (las almazaras de la 1 a la 8), y se incorporaron 3 almazaras más al estudio (almazaras 9, 10 y 11).

##### 6.4.1. Parámetros de calidad

En la Tabla 21 se muestran los valores medios de algunos parámetros de calidad y el rango de valores de las muestras analizadas. De acuerdo con los valores obtenidos para acidez, índice de peróxidos,  $K_{270}$  y  $K_{232}$ , todos los aceites analizados se incluirían en la categoría de aceite virgen extra, dado que todos los valores son inferiores a los marcados por el Reglamento (CEE) núm. 2568/91 para esta categoría (Tabla 1).

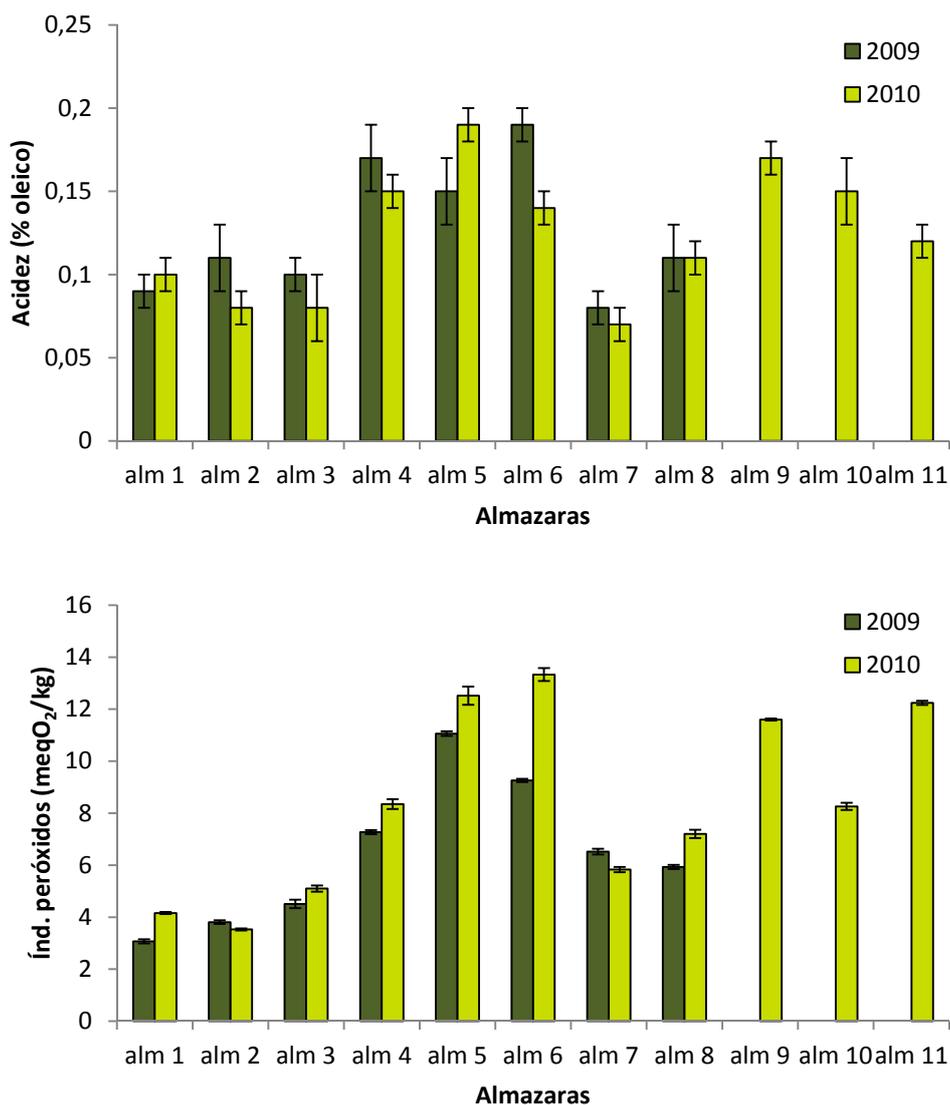
**Tabla 21.** Valores medios y rangos de los parámetros de calidad, estabilidad oxidativa,  $\alpha$ -tocoferol y fenoles totales de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.

	Campaña 2009 (n=8)		Campaña 2010 (n=11)		Almazara	Campaña
	Media	Rango	Media	Rango		
<b>Acidez</b> (% ácido oleico/kg)	0.13	0.08 - 0.19	0.12	0.07 - 0.19	**	ns
<b>Peróxidos</b> (meq O <sub>2</sub> /kg)	6.4	3.1 – 11.1	8.4	3.5 – 13.3	**	**
<b>K<sub>270</sub></b>	0.10	0.08 - 0.15	0.11	0.09 - 0.14	**	ns
<b>K<sub>232</sub></b>	1.77	1.46 - 2.21	1.79	1.40 - 2.21	**	**
<b>Estabilidad oxidativa</b> (h)	10.2	7.1 – 17.5	9.3	4.6 – 15.4	**	ns
<b><math>\alpha</math>-tocoferol</b> (mg/kg)	158	124 - 192	180	146 - 223	**	**
<b>Fenoles totales</b> (mg ácido cafeico/kg)	153	75.8 – 311	165	67.0 – 256	**	ns

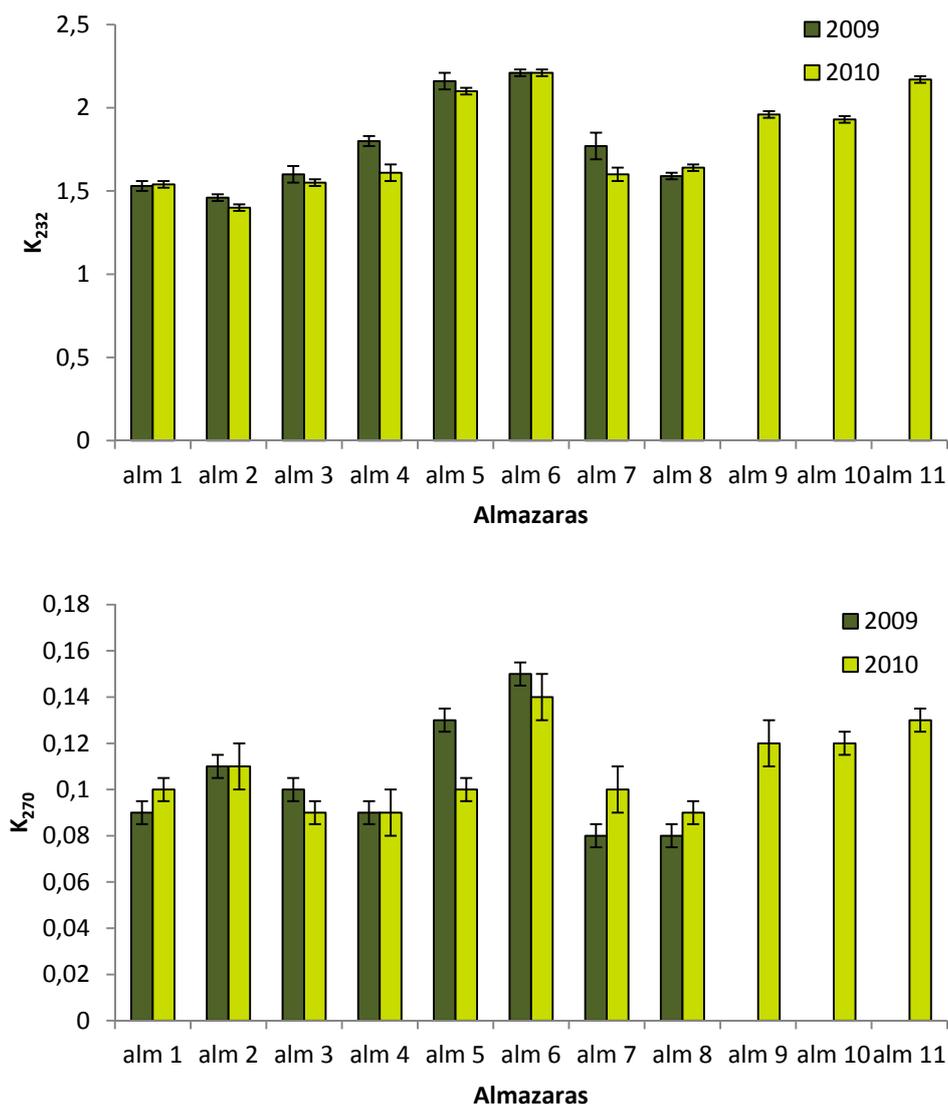
Las dos columnas de la derecha indican si existen diferencias significativas según los factores almazara y campaña (ns: no significativo con  $P \geq 0.05$ ; \* : significativo con  $P < 0.05$ ; \*\*: significativo con  $P < 0.01$ ).

Los aceites estudiados se caracterizan por valores bajos de acidez e índice de peróxidos. La acidez media fue muy similar en ambas campañas (0.13% en 2009 y 0.12% en 2010), siendo 0.19% el valor máximo detectado y 0.80% el valor máximo aceptado para la categoría de aceite de oliva virgen extra. El valor medio del índice de peróxidos, fue 6.4 meq O<sub>2</sub>/kg en 2009 y 8.4 meq/kg en 2010, siendo el valor máximo detectado 13.3 meq O<sub>2</sub>/kg, mientras que el valor máximo marcado en el reglamento para la categoría de aceite de oliva virgen extra es 20 meq O<sub>2</sub>/kg. En el análisis estadístico de los datos, según el factor campaña, el valor de acidez no fue

diferente en 2009 y 2010 ( $P \geq 0.05$ ). No obstante, el valor del índice de peróxidos fue superior en 2010 que en 2009 ( $P < 0.01$ ). El factor almazara sí fue altamente significativo en estos parámetros ( $P < 0.01$ ), por lo que en las Figuras 45 y 46 se representan estos valores según almazara. Se puede observar que la diferencia entre valores es más importante entre almazaras que entre campañas en cada almazara. Las almazaras 5 y 6 tuvieron los valores más altos en estos parámetros en ambas campañas, como también en los índices ultravioleta  $K_{232}$  y  $K_{270}$ . También fueron altos los valores de acidez en el aceite de la almazara 9 y el de peróxidos en las almazaras 9 y 11, y los valores de  $K_{232}$  y  $K_{270}$  en las almazaras 9, 10 y 11.



**Figura 45.** Valores de acidez e índice de peróxidos por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.



**Figura 46.** Valores de  $K_{232}$  y  $K_{270}$  por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.

Comparando con aceites convencionales, se han encontrado valores similares en aceites de la variedad *Arbequina* de la zona de Les Garrigues en trabajos previos, con medias que oscilan alrededor del 0.18% en acidez y 6 meq  $O_2/kg$  en el índice de peróxidos (Morelló et al., 2006; Motilva et al., 2000; Romero et al., 2003). La acidez libre es el resultado de la lipólisis, que es la degradación de los triglicéridos que conforman el aceite de oliva. Los valores de acidez son altos si las olivas no están en buenas condiciones sanitarias, a causa de la presencia de plagas u hongos en los frutos, o si el proceso de extracción del aceite es inadecuado, con largas esperas entre la recolección del fruto y la extracción del aceite o con un contacto prolongado entre el aceite y las aguas de vegetación. El índice de peróxidos es un indicativo de la oxidación inicial y cuando sus valores son altos, sugieren que se han utilizado olivas dañadas por el frío o condiciones inadecuadas en el proceso de extracción. Como se ha comentado, los valores bajos en acidez y peróxidos detectados en las muestras de este estudio son comparables a los

obtenidos en aceites convencionales de la misma variedad y zona de producción, y sugieren que los frutos procedentes de la agricultura ecológica utilizados como materia prima para la extracción de aceite son de una alta calidad, a pesar de que su cultivo está sometido a una legislación más rigurosa en el uso de pesticidas y fertilizantes que en la agricultura convencional. Estos valores también sugieren que la extracción del aceite en las almazaras se lleva a cabo correctamente, tanto desde el punto de vista de la tecnología como desde el de proceso.

#### **6.4.2. Perfil de ácidos grasos**

En todas las muestras analizadas, el contenido en ácidos grasos estuvo entre los límites especificados por el Reglamento (CEE) núm. 2568/91 para el aceite de oliva virgen extra (Tabla 22). En el perfil de ácidos grasos, el oleico fue el mayoritario (con valores medios de 75.2% en 2009 y 74.4% en 2010), seguido por el ácido palmítico (con valores medios de 11.8% en 2009 y 12.1% en 2010) y ácido linoleico (con valores medios de 7.9% en 2009 y 8.3% en 2010). No se detectaron diferencias significativas ( $P \geq 0.05$ ) en los porcentajes de ácidos grasos entre campañas, excepto para el ácido eicosenoico ( $P < 0.05$ ), que es un ácido graso minoritario.

En la Tabla 22 también se muestra el porcentaje de ácidos grasos saturados (SAF), el de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA), el de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) y la relación entre monoinsaturados y poliinsaturados (MUFA/PUFA). Estos parámetros se utilizan normalmente para comparar la composición de grasas de diferentes orígenes. Los aceites de oliva se caracterizan por tener un alto contenido en MUFA, debido a que el ácido oleico (C18:1) es el mayoritario, con un contenido entre el 56 y el 84%. La ingesta de grasas con alto contenido en MUFA, típica de los países mediterráneos en los que se utiliza el aceite de oliva como principal grasa culinaria, se ha relacionado con una incidencia especialmente baja de enfermedades cardiovasculares en su población (Gimeno et al., 2002; Pérez-Jiménez et al., 2002). En el presente estudio, se dieron valores iguales o muy similares en estos parámetros entre campañas, no detectándose diferencias entre ellas ( $P \geq 0.05$ ). Sin embargo, sí se observó que a pesar de ser aceites de la misma variedad y tipo de cultivo, existieron unos rangos más o menos amplios en los porcentajes de SAF, MUFA y PUFA, y que el factor almazara fue significativo en todos ellos. En diversos estudios se ha comprobado que existe una dependencia de la variedad, del estado de maduración de la oliva o de la zona de cultivo que es determinante en el contenido en ácidos grasos del aceite (Cimato et al., 1991; Gómez-González et al., 2011; Tous y Romero, 1994; Uceda et al., 1994).

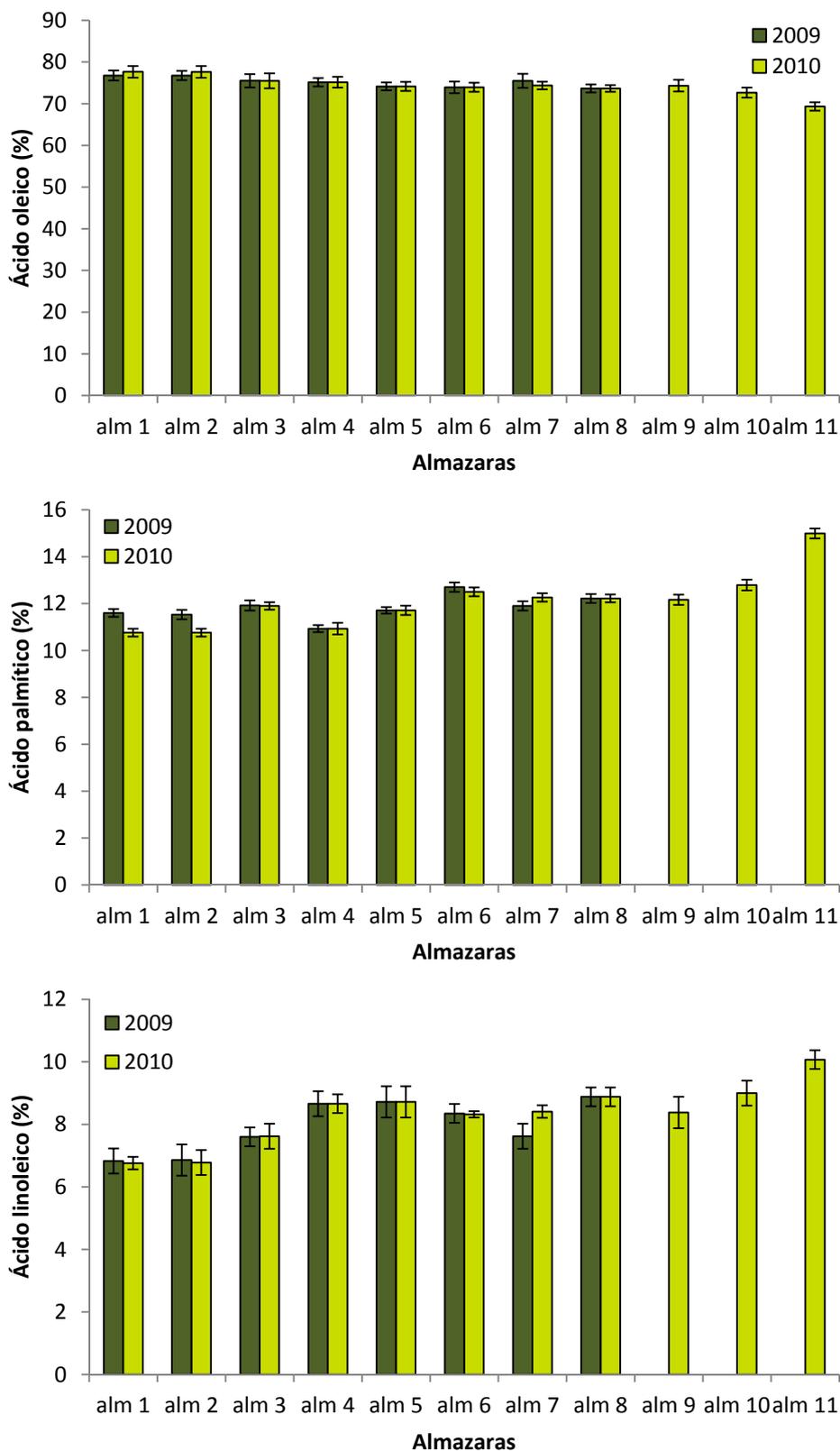
**Tabla 22.** Valores medios y rangos de los porcentajes (%) de ácidos grasos individualmente y porcentajes de ácidos grasos saturados (SAF), monoinsaturados (MUFA), poliinsaturados (PUFA) y relación MUFA/PUFA de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.

Ácido graso	Campaña 2009		Campaña 2010		Almazara	Campaña
	Media	Rango	Media	Rango		
Palmítico	11.8	10.9 - 12.7	12.1	10.8 - 15.0	**	ns
Palmitoleico	0.84	0.72 - 0.90	0.84	0.69 - 1.32	**	ns
Esteárico	1.8	1.7 - 2.2	2.1	1.8 - 2.3	ns	ns
Oleico	75.2	73.7 - 76.8	74.4	69.4 - 77.7	**	ns
Linoleico	7.9	6.8 - 8.9	8.3	6.8 - 10.1	**	ns
Araquídico	0.39	0.35 - 0.40	0.39	0.35 - 0.42	ns	ns
Linoléico	0.47	0.40 - 0.50	0.47	0.42 - 0.52	*	ns
Eicosenoico	0.29	0.26 - 0.30	0.29	0.27 - 0.32	*	*
Behénico	0.12	0.11 - 0.14	0.12	0.11 - 0.12	ns	ns
SAF	14.6	12.5 - 15.3	14.6	13.1 - 17.5	*	ns
MUFA	75.5	74.8 - 77.8	75.5	71.0 - 79.0	**	ns
PUFA	8.7	7.2 - 9.4	8.8	7.2 - 10.6	**	ns
MUFA/PUFA	9.2	8.00 - 10.76	8.7	6.7 - 10.9	**	ns

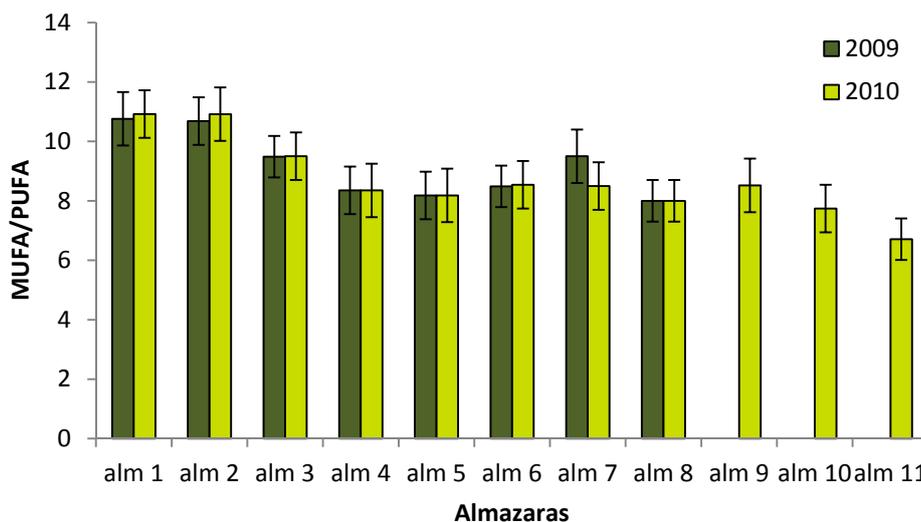
Las dos columnas de la derecha indican si existen diferencias significativas según los factores almazara y campaña (ns: no significativo con  $P \geq 0.05$ ; \* : significativo con  $P < 0.05$ ; \*\*: significativo con  $P < 0.01$ ).

En la representación gráfica de los valores por almazaras, en la Figura 47 se muestran los porcentajes de los ácidos grasos mayoritarios oleico, palmítico y linoleico, y en la Figura 48 la relación entre ácidos monoinsaturados/poliinsaturados (MUFA/PUFA) por almazaras. Como se puede observar, cada almazara obtiene valores muy similares entre campañas. Motilva et al. (2001) observaron en su estudio que la almazara de origen del aceite es un factor significativo en el perfil de ácidos grasos del aceite, y que siempre eran unas mismas almazaras las que presentaban contenidos en oleico más altos. Estos autores lo correlacionaron con la localización de las almazaras y con la existencia de diferentes microclimas en la zona de producción.

En el presente trabajo, los porcentajes de ácidos grasos fueron muy similares entre campañas en cada almazara, pero no así entre almazaras. Los aceites de las almazaras 1 y 2 fueron los que presentaron un mayor contenido en oleico, en torno al 77% en ambas campañas y mayores valores en la relación MUFA/PUFA (aproximadamente 11). En cambio, el aceite de la almazara 11 fue el que presentó un menor porcentaje de ácido oleico (69.4%) y mayor porcentaje de palmítico (15.0%) y linoleico (10.1%), y por tanto, una menor relación MUFA/PUFA (6.7).



**Figura 47.** Valores de los porcentajes de ácido oleico, palmítico y linoleico por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.



**Figura 48.** Valores de la relación MUFA/PUFA por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.

La composición en ácidos grasos en aceites de la variedad *Arbequina* de cultivo convencional de la zona de Les Garrigues han sido estudiados en varias campañas anteriores por Motilva et al. (2000), Tovar et al. (2001a), Romero et al. (2003) y Morelló et al. (2006). Tomando estos trabajos como referencia, el contenido medio en ácido oleico sería aproximadamente del 73%, el de palmítico entre el 12 y el 14% y el de linoleico entre 9.5 y 10%. Si comparamos con los resultados de este estudio, el aceite ecológico contuvo en términos generales un porcentaje inferior de ácido linoleico y ligeramente superior de oleico respecto a los valores medios, aunque los valores de los aceites ecológicos están dentro del intervalo de confianza (95%). El aceite de oliva *Arbequina* de la zona de Les Garrigues se caracteriza por tener un alto contenido en oleico, mayor que el aceite de *Arbequina* de la zona litoral de la Denominación de Origen Protegida “Siurana” (Romero-Aroca et al., 2002). Un contenido intermedio en oleico fue determinado en un estudio en la zona del Priorat con datos obtenidos a partir de 167 aceites pertenecientes a 6 campañas. Los valores de oleico extremos fueron 65.52 y 77.70%, con un valor medio de 71.22%. El cultivo de la *Arbequina* se ha extendido por todo el mundo, y debido a las grandes diferencias agroclimáticas, en aceites de la misma variedad se han determinado porcentajes de oleico tan dispares como 52% en el noroeste de Argentina (Rondanini et al., 2011), 54% en la zona de Australia (Mailer et al., 2010) o del 60 al 67% en Uruguay (Feippe et al., 2010).

Gutiérrez et al. (1999) determinaron que los aceites ecológicos de la variedad *Picual* contenían un mayor porcentaje de ácido oleico y menor de linoleico, y Dolgun et al. (2010) determinaron también un mayor contenido en ácido oleico en aceites ecológicos de las variedades *Gemlik* y *Memecik*. No obstante, Anastasopoulos et al. (2011) en aceites de la variedad *Koroneiki* y Samman et al. (2008) en aceites comerciales no encontraron diferencias significativas en la

composición en ácidos grasos de acuerdo con el tipo de cultivo o estas no fueron estables a lo largo de la maduración.

Con los resultados obtenidos en el presente estudio y debido a la variabilidad existente entre almazaras, no podríamos afirmar que el contenido en ácido oleico es superior en los aceites ecológicos que en los convencionales. Para ello, sería necesario realizar las determinaciones en un mayor número de muestras y de campañas y hacerlo de forma paralela con aceites ecológicos y convencionales de parcelas muy próximas, con tal de conocer y establecer la variabilidad entre almazaras en los aceites de ambos tipos de cultivo.

#### **6.4.3. Color y perfil pigmentario**

En la Tabla 23 se muestra el contenido pigmentario determinado mediante espectrofotometría. Este método se utiliza comúnmente debido a su rapidez y simplicidad, y da como resultado el contenido aproximado de pigmentos en el aceite, basándose en los pigmentos mayoritarios en cada fracción, feofitina-a en la clorofílica y luteína en la carotenoide. Los valores medios fueron 5.5 y 5.3 mg de clorofilas/kg y mg de carotenoides/kg, respectivamente en 2009 y 7.0 y 7.2 mg de clorofilas/kg y mg de carotenoides/kg, respectivamente en 2010. Según este parámetro, el contenido en clorofilas y carotenoides fue muy equilibrado en las dos campañas, siendo la relación clorofilas/carotenoides próxima a 1 en ambas.

El contenido pigmentario mediante espectrofotometría de los aceites de cultivo convencional de la variedad *Arbequina* de la zona de Lleida fue estudiado durante 9 campañas consecutivas, desde 1995/96 a 2003/04 (Morelló et al., 2006; Motilva et al., 1998; Romero et al., 2003). Revisando estos trabajos, se ha observado que el contenido en pigmentos se movió en un rango amplio de 5.13 a 12.24 mg clorofilas/kg y de 5.66 a 11.08 mg carotenoides/kg. Como se muestra en la Tabla 23, los valores medios obtenidos para el aceite ecológico serían similares a los del aceite convencional. La cantidad equilibrada de pigmentos, con valores cercanos a 1 en la relación clorofilas/carotenoides, ya fue observada por Morelló et al. (2006) en aceites de *Arbequina* de la zona de Lleida. Dolgun et al. (2010) determinaron que los aceites convencionales de la variedad *Gemlik* contenían más pigmentos (clorofilas y carotenoides) que los ecológicos, y los convencionales de la variedad *Memecik* más carotenoides que los ecológicos. En cambio, Ranalli y Contento (2010) determinaron que no había diferencias en el contenido en pigmentos ni en las coordenadas de color entre aceite ecológico y aceite convencional.

**Tabla 23.** Valores medios y rangos del contenido en pigmentos totales determinados por espectrofotometría (mg/kg de aceite), del perfil pigmentario por HPLC (mg/kg de aceite) y de las coordenadas CIELAB de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.

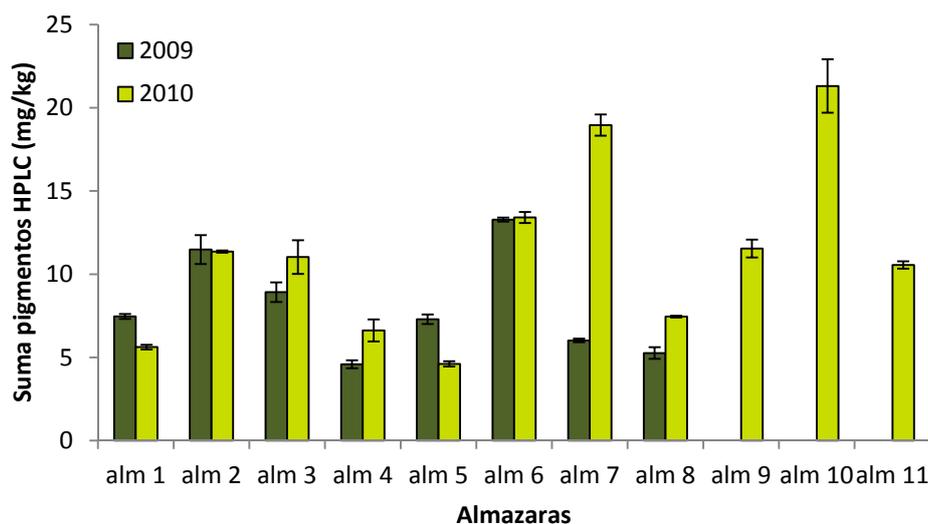
	Campaña 2009		Campaña 2010		Almazara	Campaña
	Media	Rango	Media	Rango		
<i>Espectrofotometría</i>						
Carotenoides	5.3	4.0 - 7.9	7.2	5.2 - 10.6	**	**
Clorofilas	5.5	3.45 - 12.6	7.0	2.7 - 14.5	**	ns
Total pigmentos	11.0	7.4 - 20.5	14.1	7.9 - 25.1	**	ns
<i>HPLC</i>						
Clorofílida b	nd	nd	nd	nd	-	-
Clorofílida a	nd	nd	nd	nd	-	-
Feofórbido a	0.06	0 - 0.22	0.15	0 - 0.73	**	*
Clorofila b	0.14	0.07 - 0.33	0.25	0 - 0.84	**	*
Clorofila a	0.21	0 - 0.90	0.70	0 - 3.64	**	**
Feofitina b	nd	nd	0.01	0 - 0.11	**	ns
Feofitina a	2.94	1.50 - 6.23	4.02	0.77 - 7.58	**	*
Total clorofilas	3.35	1.66 - 6.56	5.12	1.09 - 11.74	**	**
Neoxanteno	0.19	0.08 - 0.38	0.22	0.05 - 0.76	**	ns
Violaxanteno	0.44	0.17 - 0.94	0.69	0.18 - 2.00	**	**
Luteoxanteno	0.04	0.01 - 0.08	0.04	0 - 0.10	**	ns
Anteraxanteno	0.23	0.11 - 0.50	0.34	0.11 - 0.67	**	**
Mutatoxanteno	0.01	0 - 0.03	0.02	0 - 0.04	**	**
Luteína	2.49	1.76 - 3.47	3.00	2.11 - 4.26	**	**
β-criptoxanteno	0.08	0.05 - 0.17	0.11	0.01 - 0.23	**	**
Violaxanteno monoesterificado	0.05	0.03 - 0.13	0.10	0.03 - 0.17	**	**
Neoxanteno esterificado	0.11	0 - 0.27	0.18	0.07 - 0.37	**	**
β-caroteno	1.07	0.66 - 2.06	1.32	0.80 - 2.01	**	*
Total carotenoides	4.68	2.93 - 7.14	6.01	3.52 - 9.58	**	**
Total pigmentos	8.04	4.59 - 13.28	11.13	4.61 - 21.31	**	**
<i>CIELAB</i>						
L*	85.79	73.49 - 93.35	87.15	81.52 - 89.97	**	ns
a*	-2.61	-4.87 a 1.78	-2.13	-3.37 a -0.90	**	*
b*	81.03	62.61 - 102.33	98.77	66.29 - 115.81	**	**

Las dos columnas de la derecha indican si existen diferencias significativas según los factores almazara y campaña (ns: no significativo con  $P \geq 0.05$ ; \* : significativo con  $P < 0.05$ ; \*\*: significativo con  $P < 0.01$ ).

En la Tabla 23 se muestran los rangos de valores y los valores medios de los compuestos que conforman el perfil pigmentario del aceite determinado mediante HPLC-DAD de ambas campañas. El perfil pigmentario es el típico en aceites de oliva, en que feofitina-a es el pigmento clorofílico mayoritario y luteína el carotenoide (Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera, 1996a). No se detectaron clorofílicas en ninguna de las muestras, y el pigmento feofitina-b sólo se cuantificó en una de las muestras de la campaña de 2010. En la fracción carotenoide, se detectaron los pigmentos característicos de los aceites de oliva de la variedad *Arbequina* (feofórbido-a y violaxanteno y neoxanteno esterificados) (Criado et al., 2007a; Mínguez-Mosquera y Gallardo-Guerrero, 1995; Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández, 1989).

Según los resultados, los aceites de 2010 fueron más pigmentados que los de 2009 ( $P < 0.01$ ), con valores medios en la suma de pigmentos de 11.13 mg/kg y 8.04 mg/kg, respectivamente. Los aceites en 2010 mostraron un contenido mayor en compuestos carotenoides ( $P < 0.01$ ) debido al alto contenido en xantofilas, principalmente luteína, y en compuestos clorofílicos ( $P < 0.01$ ). En la mayoría de compuestos, fue significativo el factor campaña, siendo mayor su concentración en 2010 que en 2009. Como se observa en las figuras del anejo del final del documento, en las que se representa las condiciones climáticas de los dos años de la estación meteorológica de La Granadella, los días de lluvia estuvieron más repartidos durante el año 2010 que en el año 2009, en que la cantidad de precipitación acumulada fue similar pero concentrada en unos días puntuales. Por tanto, probablemente los frutos de 2010 recibieron una menor cantidad de horas de sol, por lo que la degradación de los pigmentos clorofílicos y carotenoides fue menor (Chen y Huang, 1998; Serani y Piacenti, 1992).

En todos los compuestos pigmentarios, fue altamente significativo el efecto almazara ( $P < 0.01$ ), lo que significa que dentro de cada campaña, los valores fueron diferentes dependiendo de la almazara de origen del aceite. En la Figura 49 se puede observar gráficamente la suma de las concentraciones de pigmentos para cada almazara. Se puede observar como sólo en algunas de las almazaras de las que se dispuso de muestra en las dos campañas, fue mayor el contenido pigmentario en 2010 que en 2009. De entre ellas, destaca la almazara 7, en la que el contenido pigmentario del aceite en 2010 triplicó el de 2009. De los aceites analizados, fue el de la almazara 10, de la que sólo se dispuso de muestra en 2010, el que mostró una mayor cantidad de pigmentos, con una concentración de 21.31 mg/kg aceite (11.73 mg clorofilas/kg y 9.58 mg carotenoides/kg). Probablemente, estos valores tan altos de pigmentos en 2010 podrían haber provocado que en el estudio estadístico el factor campaña fuera significativo, aunque no se observa una tendencia igual en todas las almazaras.

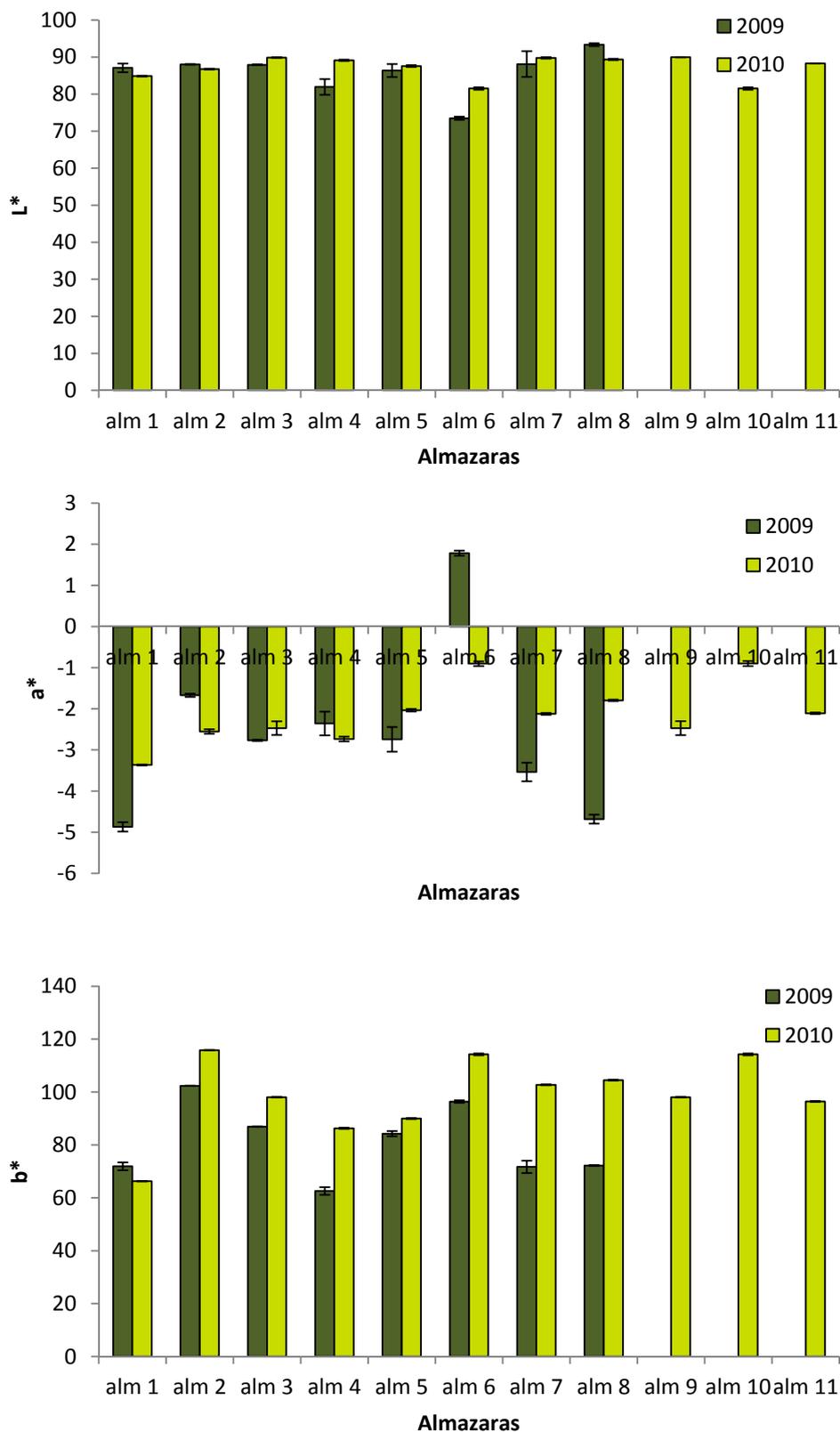


**Figura 49.** Valores de la suma de pigmentos determinados por HPLC por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.

Las diferencias en el contenido pigmentario entre almazaras están muy relacionadas con el manejo de la plantación, así como con la tecnología y el proceso utilizado durante la extracción del aceite. Respecto a los factores agronómicos, la aplicación de riego al olivo provoca una disminución del contenido pigmentario en los aceites (Criado, 2005; Tovar et al., 2001a). Criado (2005) comprobó que la transferencia de pigmentos del fruto al aceite se produce con una mayor dificultad en frutos de regadío (un 8% fueron transferidos frente a un 26% en los frutos de secano). Respecto a la tecnología, el sistema de extracción elegido influye en el contenido pigmentario, siendo mayor en los aceites obtenidos en un molino de martillos que en un molino de piedras (Mailer y Ayton, 2004) y mayor en los obtenidos por presión que con el sistema de 3 fases (Salvador et al., 2003; Torres y Maestri, 2006). Las temperaturas y los tiempos del batido influyen en el contenido pigmentario. Psomiadou y Tsimidou (1998) llevaron a cabo un estudio acerca de la influencia de la aplicación de dos temperaturas diferentes durante el batido de la pasta (30 y 45 °C) en el contenido de pigmentos de los aceites obtenidos. Los aceites procedentes de pastas batidas a 45 °C tenían un contenido ligeramente superior de pigmentos, principalmente de feofitina-a. Resultados similares obtuvieron Amirante et al. (2001), que aplicaron 3 temperaturas (27, 32 y 35 °C) y 3 tiempos de batido (30, 45 y 60 minutos) diferentes y observaron que los aceites procedentes de pastas batidas a mayor temperatura tenían mayor contenido en clorofilas. Además, para una misma temperatura el contenido de clorofilas era mayor a medida que aumentaba el tiempo de batido. También se ha demostrado que el uso de coadyuvantes como el microtalco natural aumenta la transferencia de pigmentos al aceite (Criado et al., 2007b) y que el filtrado mediante membrana de ultrafiltración disminuye el contenido en pigmentos del aceite (Bottino et al., 2008).

Respecto al perfil pigmentario, solo existe un trabajo de Criado et al. (2008) en aceite de oliva *Arbequina* de cultivo convencional en la zona de Lleida, llevado a cabo durante las campañas 2002/03 y 2003/04. Comparándolo con los resultados de este trabajo, los aceites ecológicos y convencionales contendrían los mismos compuestos y sus valores medios y rangos en el contenido en clorofilas y carotenoides serían similares. La única diferencia detectada sería que en el estudio de Criado et al. (2008), los aceites tuvieron una mayor concentración en clorofila-a y menor en feofitina-a que en los aceites ecológicos estudiados. También en un estudio de Gallardo-Guerrero et al. (2005) en aceites de *Arbequina* del sur de España, fue mayor el contenido en clorofila-a. En relación a las diferencias entre campañas, en el estudio de Criado et al. (2008) también se detectaron en el contenido en clorofilas y carotenoides. Estas diferencias se atribuyeron al amplio rango en las concentraciones de pigmentos, principalmente en la campaña 2003/04, que fue de 3.14-18.80 mg pigmentos/kg, muy similar a nuestro rango. Además, esta campaña sería más adecuada para la comparación que la 2002/03, debido a las importantes heladas que se produjeron en diciembre de 2001, dañando los olivos, y afectando la producción de la campaña siguiente (Morelló et al., 2003).

Las diferencias entre los parámetros de color CIELAB fueron altamente significativos según el factor almazara ( $P < 0.01$ ), mientras que solo entre los parámetros  $a^*$  y  $b^*$  hubo diferencias significativas entre campañas. En la Figura 50 se muestran los valores de estos parámetros según almazaras. Los valores de  $a^*$  fueron siempre negativos, excepto en el aceite de la almazara 6 en 2009. Los valores del parámetro  $b^*$ , todos los aceites se colocaron en la zona de los amarillos y en todas las almazaras, excepto en la 1, el valor del parámetro  $b^*$  fue superior en los aceites de 2010 que en los de 2009. Siendo  $b^*$  el parámetro que cuantifica el color entre  $-b^*$  (azul) y  $+b^*$  (amarillo), se podría decir que, en general, los aceites de oliva fueron más amarillos en 2010.

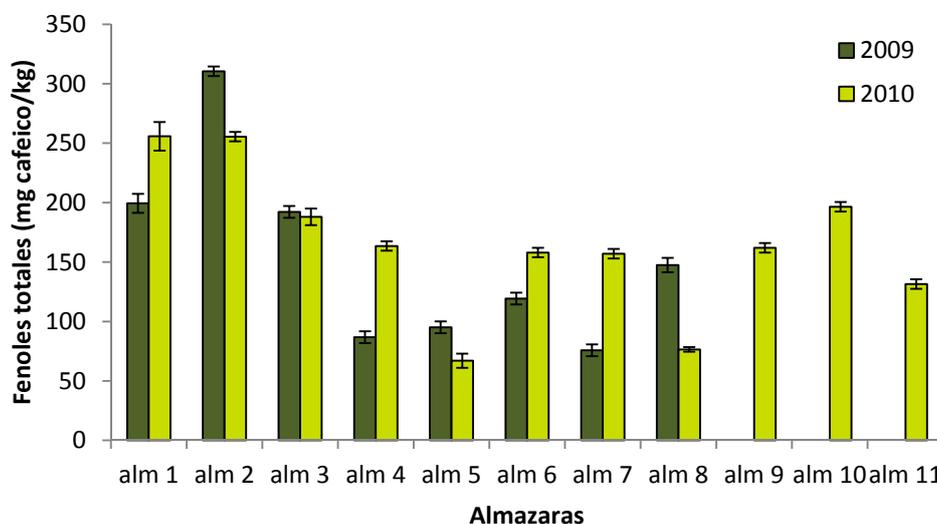


**Figura 50.** Valores de los parámetros CIELAB por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad Arbequina de las campañas 2009 y 2010.

Respecto a las coordenadas cromáticas, Motilva et al. (1998), Romero et al. (2003) y Criado et al. (2008) determinaron las coordenadas CIELAB del aceite de la variedad *Arbequina* de cultivo convencional de la misma zona que este estudio durante 7 campañas oleícolas: desde la campaña 1995/96 a la 1999/00 y de 2002/03 a 2003/04. Recopilando los valores obtenidos en estos estudios, la coordenada L\* se movería en un rango de 76.0 a 92.6, la a\* de -6.19 a 1.42 y la b\* de 67.6 a 113.9. Por tanto, los valores obtenidos en el presente estudio estarían dentro de estos rangos.

#### 6.4.4. Contenido fenólico

En primer lugar, se determinó el contenido fenólico total mediante el reactivo de Folin Ciocalteu (Tabla 21). Con este método se realiza una aproximación del contenido fenólico total de los aceites expresado con un compuesto de referencia, ácido cafeico en este caso. Los valores medios fueron 153 mg/kg en 2009 y 165 mg/kg en 2010, siendo significativo el factor almazara ( $P < 0.01$ ). Como se puede observar, cuando se representa el valor de fenoles totales por almazaras (Figura 51), éste fue muy diferente entre almazaras, pero fue similar entre campañas en la mayoría de ellas. Los valores más altos fueron los de las almazaras 1 y 2, mientras que los más bajos fueron los de la almazara 5.



**Figura 51.** Valores de fenoles totales por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.

Comparando los resultados con estudios previos en aceites de olive *Arbequina*, Motilva et al. (1998) y Romero et al (2003) determinaron el contenido en fenoles totales desde la campaña 1995/96 a la 1999/00. Los valores obtenidos mostraron una gran dispersión, dependiendo tanto de la almazara como del estado de maduración de la oliva, con un rango de 84.0 a 273 mg/kg. Este rango de valores sería similar al determinado en aceites ecológicos. Aranda

Palomo (2003) determinó que el valor medio en fenoles totales de aceites de la variedad *Cornicabra* (determinado a partir de 188 muestras de las campañas 1994/95 a la 1999/00) es de 150 mg ácido cafeico/kg aceite, por lo que sería un contenido similar al de *Arbequina*. Ambos son superados por los contenidos fenólicos de aceites de las variedades *Koroneiki*, *Pajarero*, *Picual* o *Picholine* (Aparicio y Luna, 2002; Gómez-Alonso et al., 2002;).

Para un estudio más detallado, se determinó el perfil fenólico de los aceites mediante cromatografía líquida HPLC-DAD (Tabla 24). En la suma de compuestos identificados y cuantificados por HPLC-DAD, cuyas medias fueron 677 mg de fenoles/kg aceite en 2009 y 688 mg de fenoles/kg aceite en 2010, se detectaron diferencias significativas según el factor almazara ( $P < 0.01$ ).

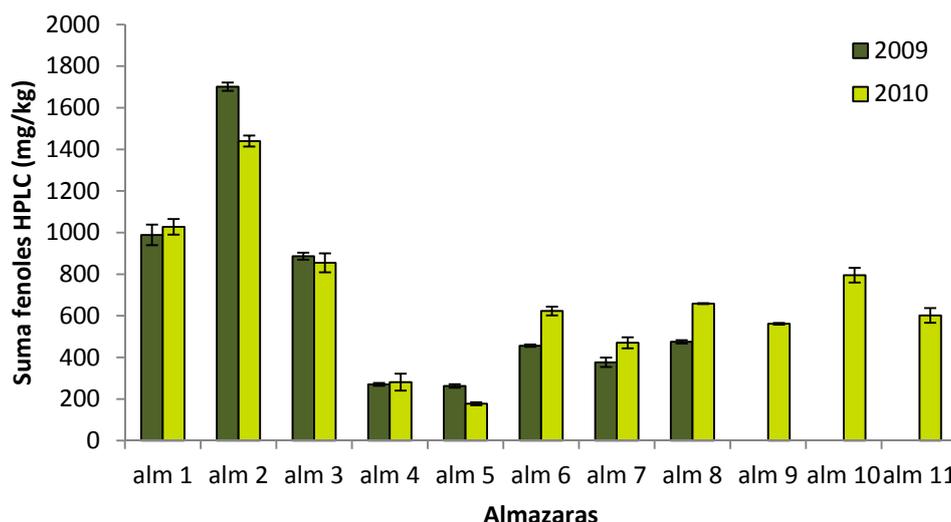
Cuando se representa según almazara (Figura 52), se observa que la concentración en fenoles fue muy variable entre almazaras y entre campañas. Las almazaras 1, 2 y 3 mostraron los valores más altos en ambas campañas, mientras que la 5 fue la que mostró valores más bajos. El contenido fenólico es altamente dependiente de la tecnología y las condiciones de procesado utilizadas en las almazaras. Con el uso de un molino de martillos se obtienen aceites con un mayor contenido fenólico que con molinos de piedras (Caponio et al., 2003; Di Giovacchino et al., 1994). Aranda Palomo (2003) determinó que el contenido en fenoles totales de los aceites de *Cornicabra* obtenidos por el sistema de 3 fases (144 mg cafeico/kg) era inferior al de las muestras obtenidas con sistema de 2 fases (164 mg cafeico/kg). Estos resultados pueden explicarse por la necesidad de diluir la pasta de aceituna batida con agua caliente antes de entrar al decantador centrífugo de 3 fases, operación que no es necesaria en el sistema de 2 fases. Este hecho provocaría una redistribución de las sustancias fenólicas entre la fase acuosa y la fase oleosa, reduciéndose el contenido en fenoles en la fase apolar. Resultados similares fueron obtenidos por Angerosa y Di Giovacchino (1996), De Stefano et al. (1999) y Gimeno et al. (2002).

El contenido fenólico de estos aceites, como en la mayoría de aceites de oliva, se caracterizó por un contenido mayoritario en derivados secoiridoides, que representaron un 94.2% y un 93.1% del contenido fenólico total en 2009 y 2010 respectivamente. Los compuestos mayoritarios fueron las formas dialdehídicas de oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EDA) y de ligustrósido aglicona (*p*-HPEA-EDA), que representaron más del 50% y del 20% del contenido fenólico total, respectivamente. Los lignanos fueron el segundo grupo en importancia representando un 4.0% y un 5.4% del contenido fenólico de los aceites en 2009 y 2010 respectivamente.

**Tabla 24.** Valores medios y rangos del perfil fenólico por HPLC (mg/kg de aceite) de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.

	Campaña 2009		Campaña 2010		Almazara	Campaña
	Media	Rango	Media	Rango		
Hidroxitirosol	1.8	0.2 - 4.3	2.1	0.6 - 5.0	**	ns
Tirosol	3.6	1.3 - 10.1	3.7	1.2 - 7.9	**	ns
<b>Fenil alcoholes</b>	5.4	2.3 - 14.3	5.8	1.8 - 10.1	**	ns
Ácido vainílico	0.4	0.1 - 1.3	0.5	0.1 - 1.4	**	ns
Vainillina	0.3	0.2 - 0.5	0.4	0.2 - 0.6	**	*
Ácido <i>p</i> -cumárico	0.2	0.1 - 0.4	0.3	0.2 - 0.5	**	*
<b>Ácidos fenólicos</b>	1.0	0.4 - 2.2	1.2	0.5 - 2.3	**	*
3,4-DHPEA-AC	52.5	10.0 – 89.6	55.4	5.0 – 83.4	**	ns
3,4-DHPEA-EDA	391	75.4 – 1288	364	44.8 - 920	**	ns
<i>p</i> -HPEA-EDA	106	28.4 - 176	51.9	29.5 - 147	**	**
<i>p</i> -HPEA-EA	18.2	8.9 - 39.4	20.7	9.1 – 32.9	**	ns
3,4-DHPEA-EA	69.3	31.4 – 200	145	51.3- 276	**	**
<b>Derivados secoiridoides</b>	637	230 – 1623	637	148 – 1382	**	ns
<b>Lignanos</b>	29.1	15.6 - 68.0	32.1	20.4 - 47.5	**	ns
Luteolina	3.1	1.4 - 4.3	2.8	1.3 - 5.1	**	ns
Apigenina	1.5	0.9 – 2.3	2.2	1.3 - 3.8	**	**
<b>Flavonoides</b>	4.7	2.5 - 6.2	4.9	2.7 - 8.9	**	ns
<b>Suma fenoles</b>	677	262 – 1701	681	177 – 1440	**	ns

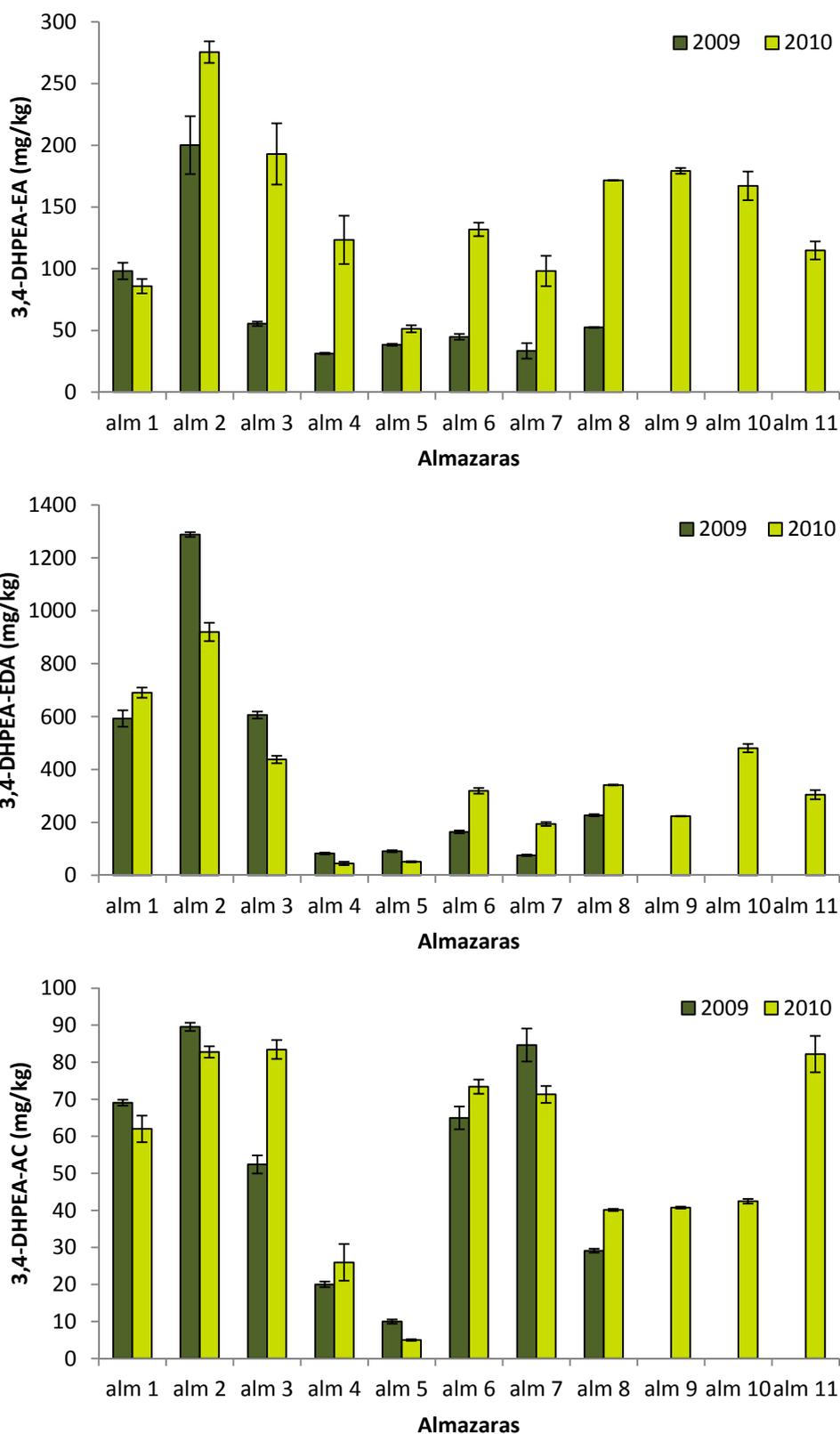
Las dos columnas de la derecha indican si existen diferencias significativas según los factores almazara y campaña (ns: no significativo con  $P \geq 0.05$ ; \* : significativo con  $P < 0.05$ ; \*\*: significativo con  $P < 0.01$ ).



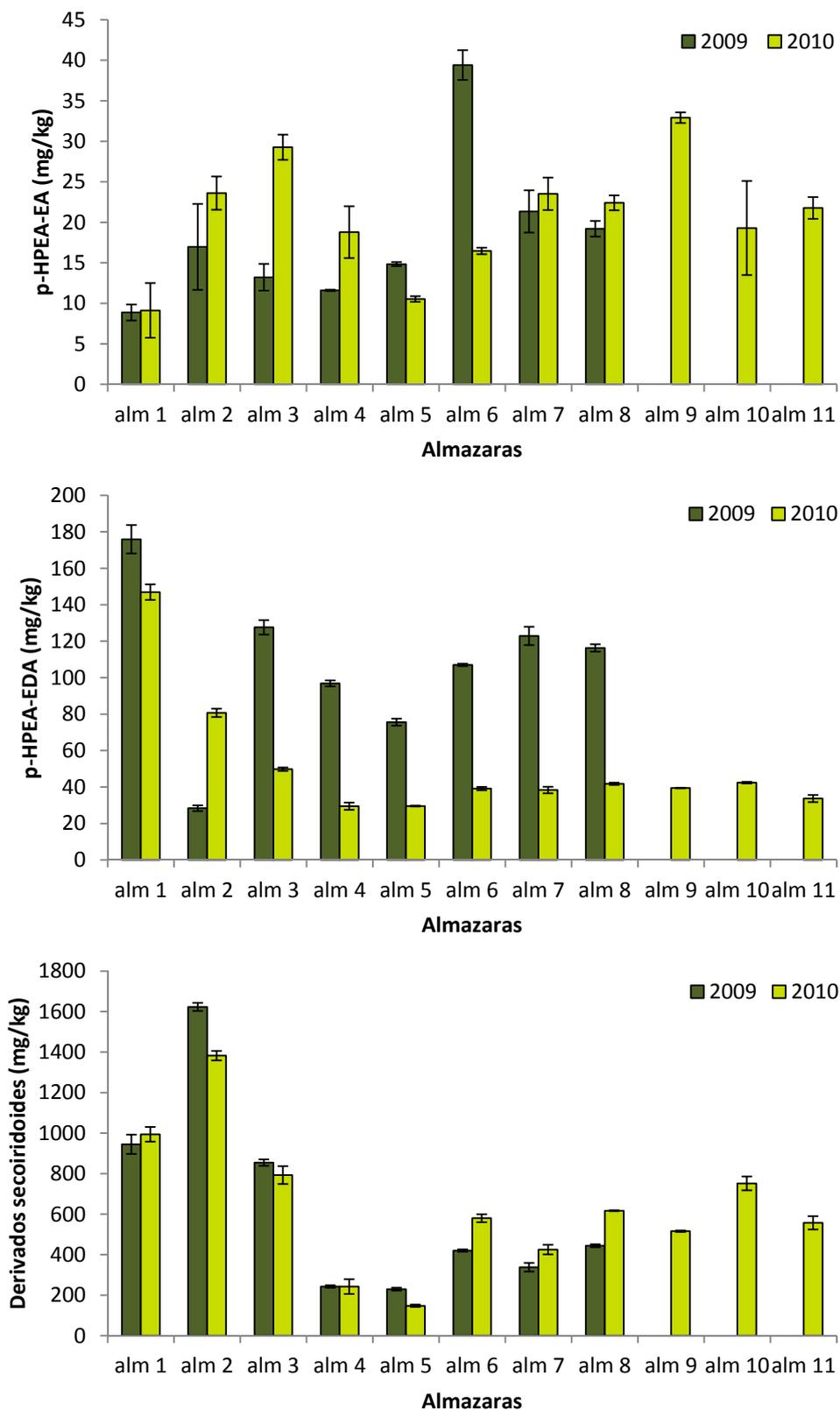
**Figura 52.** Valores de la suma de fenoles determinados por HPLC por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.

En la Figura 53 se muestran los valores por almazaras y campaña de los derivados secoiridoides determinados, así como la suma de todos ellos. Como se puede observar, las almazaras 1, 2, 3 y 10 fueron las que mostraron un mayor contenido en 3,4-DHPEA-EDA y en la suma de derivados secoiridoides. Según campaña, en el grupo de los derivados secoiridoides, la concentración de la forma dialdehídica de ligustrósido (*p*-HPEA-EDA) fue superior en 2009 ( $P < 0.01$ ) mientras que el contenido en oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EA) fue superior en 2010 ( $P < 0.01$ ). Como se puede observar en la figura, este hecho se cumplió en la mayoría de almazaras para ambos compuestos. Las diferentes condiciones climáticas que conlleva el factor campaña, influirían en el proceso de maduración del fruto y en su actividad enzimática, por lo que la degradación de oleuropeína y ligustrósido, los dos compuestos fenólicos mayoritarios presentes en el fruto, sería diferente de una campaña a otra, y por tanto, el contenido de los compuestos derivados de ellos también variaría entre campañas.

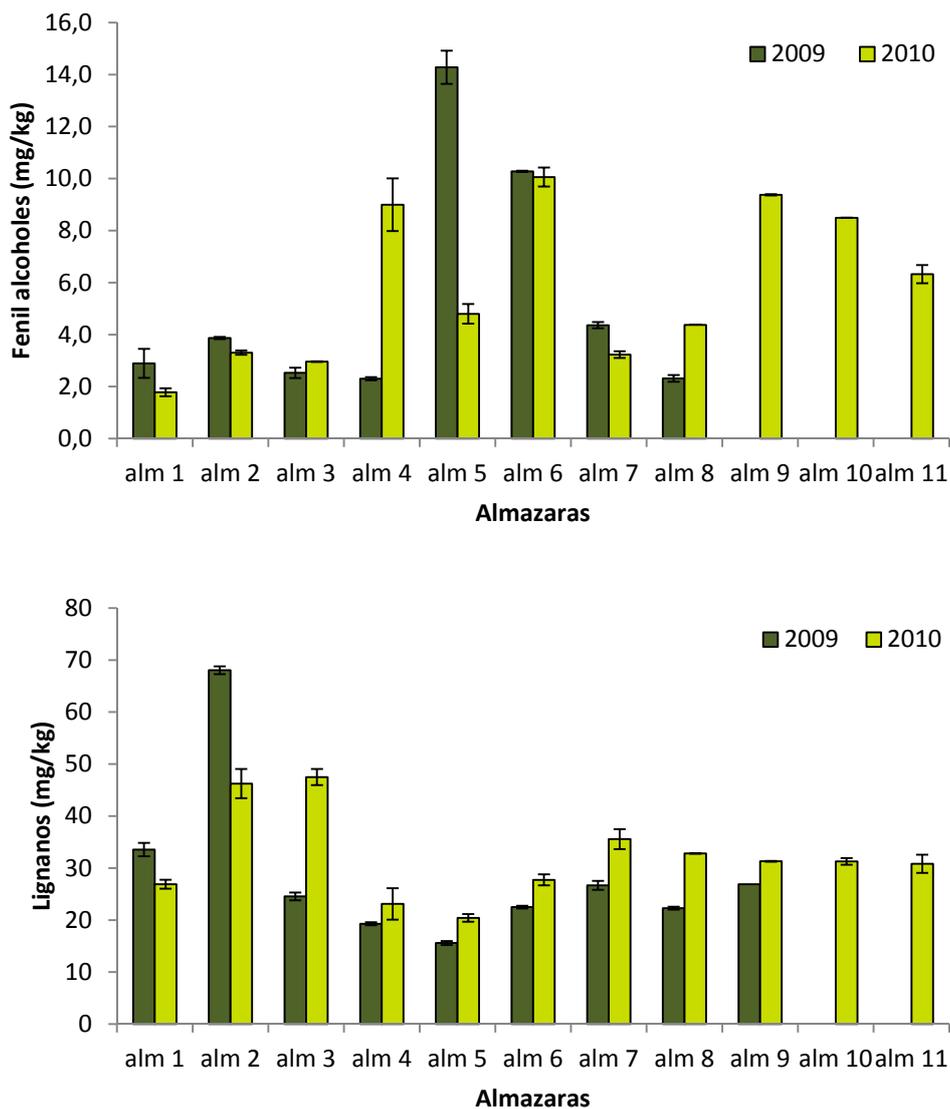
En la Figura 54 se muestran las concentraciones por almazaras, que fue un factor significativo en todas ellas, de los compuestos fenólicos de las familias alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos, lignanos y flavonoides. Por familias, sólo se detectaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) según campaña en las concentraciones de los ácidos fenólicos, aunque su contenido es muy minoritario. En los lignanos, las almazaras que mostraron mayores contenidos en lignanos fueron la 2 y la 3.



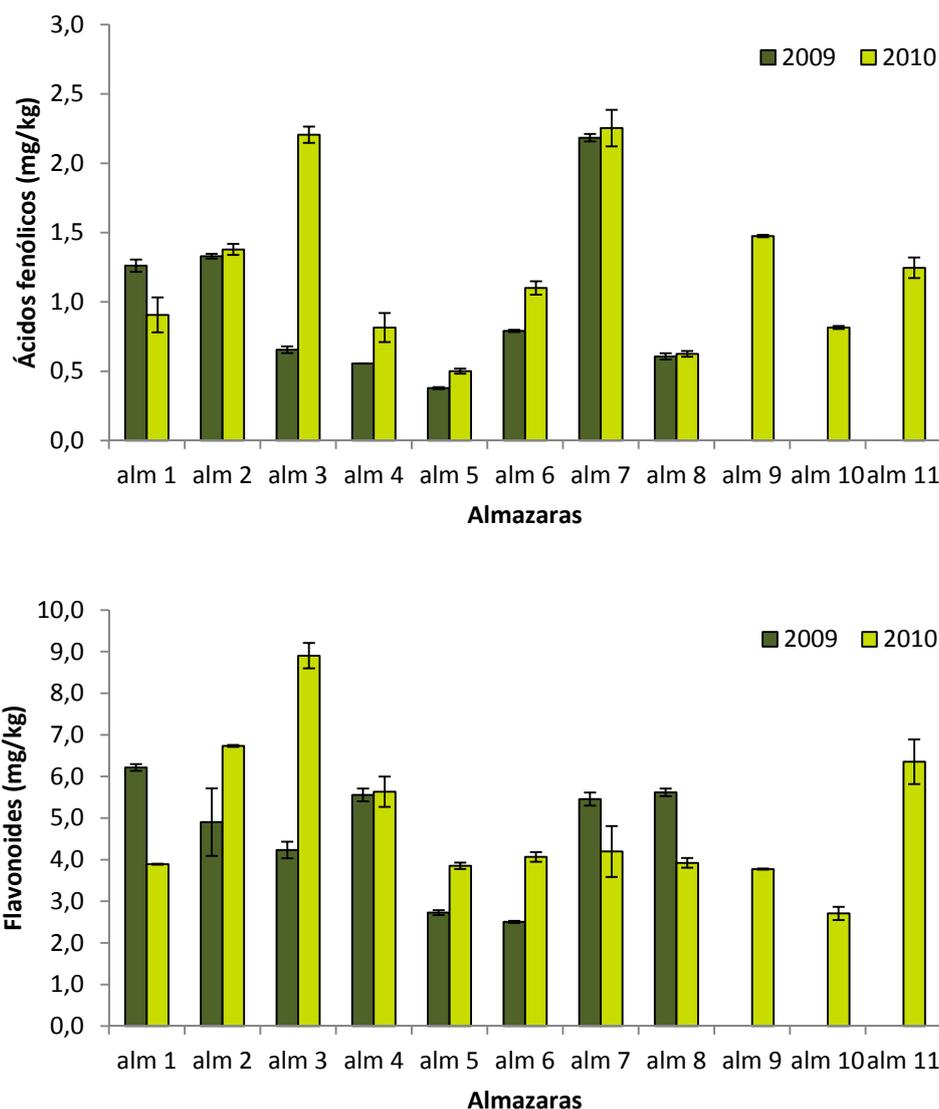
**Figura 53A.** Valores de los derivados secoiridoides determinados por HPLC por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.



**Figura 53B.** Valores de los derivados secoiridoideos determinados por HPLC por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.



**Figura 54A.** Valores de la suma de fenoles por familias determinados por HPLC por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.



**Figura 54B.** Valores de la suma de fenoles por familias determinados por HPLC por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.

Morelló et al. (2006) determinaron el perfil fenólico de aceites de oliva *Arbequina* de la zona de Les Garrigues durante 4 campañas consecutivas, de 2000/01 a 2003/04. Comparando con los aceites analizados en el presente trabajo, se observa una diferencia en los valores de tirosol e hidroxitirosol: en el estudio de Morelló et al. (2006), los valores máximos que se detectaron fueron 0.38 mg/kg en hidroxitirosol y 1.04 mg/kg en tirosol, mientras que en éste se han cuantificado mayores concentraciones de ambos compuestos, con medias de 1.60 mg hidroxitirosol/kg y 3.49 mg/kg de hidroxitirosol en 2009, y de 2.19 mg tirosol/kg y de 2.19 mg hidroxitirosol/kg y 3.79 mg tirosol/kg. Ni en el estudio de Anastasopoulos et al. (2010) ni el de Bendini et al. (2006) detectaron diferencias en los contenidos en hidroxitirosol y tirosol dependiendo de si las olivas eran cultivo ecológico o convencional, aunque Dolgun et al. (2010) sí determinaron que el contenido en tirosol era mayor en los aceites orgánicos de las variedades *Gemlik* y *Memecik* que en los convencionales. Según nuestros resultados, no se

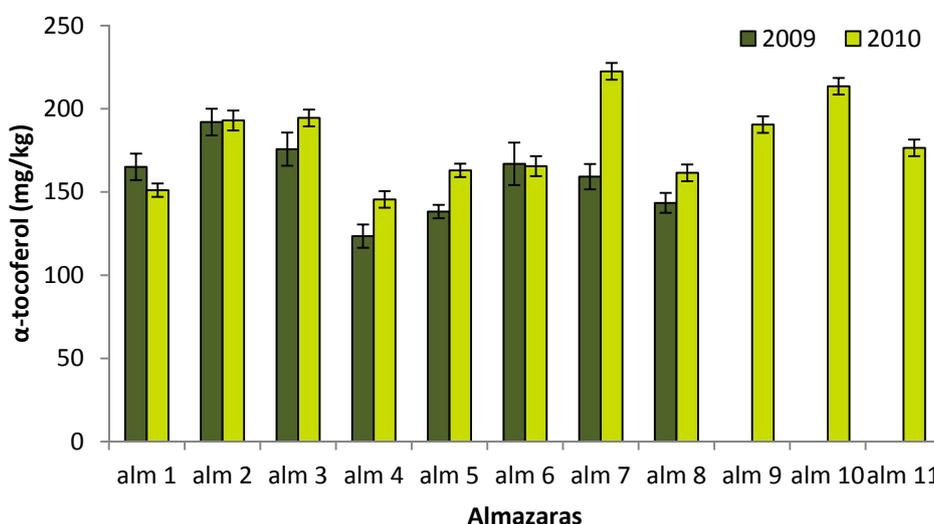
puede afirmar que los aceites ecológicos contienen más tirosol e hidroxitirosol que los convencionales, porque hay un efecto campaña importante, por lo que sería necesaria la comparación de aceites ecológicos y convencionales durante las mismas campañas oleícolas. Comparando el resto de compuestos fenólicos cuantificados con los cuantificados en el estudio de Morelló et al. (2006), tanto el perfil como las concentraciones de los diferentes compuestos fueron similares.

El contenido en fenoles es uno de los parámetros estudiados cuando se comparan productos de cultivo ecológico y convencional. A veces se plantea la hipótesis de que los productos de origen ecológico, donde el uso de pesticidas y fertilizantes de síntesis no están permitidos, contienen mayores concentraciones de compuestos fenólicos. Brandt y Molgaard (2001) apuntan que cuando hay un descenso en la disponibilidad de nitrógeno para la planta o existe el ataque de una plaga, las plantas incrementan su contenido en compuestos fenólicos para defenderse, aunque a costa de una menor tasa de crecimiento y por tanto, un menor rendimiento. En el aceite de oliva, los estudios de Anastasopoulos et al. (2011), Ranalli y Contento (2010) y Gutiérrez et al. (1999) han determinado una mayor concentración fenólica en aceites ecológicos. Anastasopoulos et al. (2011) estudiaron varios parámetros en aceite ecológico y convencional de la variedad *Koroneiki* durante 2 años (2000 y 2004), concluyendo que el aceite ecológico es de una calidad superior que el convencional, especialmente en el contenido fenólico. Ranalli y Contento (2010) determinaron que el contenido fenólico era mayor en los aceites ecológicos que en los convencionales, tanto si se extraían de olivas deshuesadas como de olivas enteras. Gutiérrez et al. (1999) estudiaron aceites de la variedad *Picual* del sur de España durante una campaña, determinando que el aceite ecológico contenía de media una mayor concentración de compuestos fenólicos que el convencional, pero estas diferencias dependían del estado de madurez del fruto. Sin embargo, otros estudios como los de Dolgun et al. (2010), Ninfali et al. (2008) y Bendini et al. (2006) anteponen otros factores como el efecto de la campaña, la variedad o el proceso de extracción antes que el tipo de cultivo (ecológico o convencional) para explicar las diferencias en el contenido fenólico de aceites de oliva. Dolgun et al. (2010) estudiaron el contenido fenólico en aceites ecológicos y convencionales de las variedades *Gemlik* y *Memecik* cultivados en Turquía durante una campaña, y aunque encontraron diferencias en las concentraciones de algunos compuestos, lo atribuyeron mayormente a diferencias genéticas y de zona geográfica de cultivo, especialmente la altitud. Ninfali et al. (2008) estudiaron las diferencias entre aceites ecológicos y convencionales de las variedades *Leccino* y *Frantoio* durante 3 campañas (2001, 2002 y 2003) cultivados en Italia y observaron que no hay diferencias o que estas no son consistentes con el tiempo en las propiedades de los aceites ecológicos y convencionales, porque existen muchos otros factores de los que dependen estas propiedades (variedad, clima, suelo, disponibilidad de nutrientes y agua, almacenamiento, etc.) y por tanto, las diferencias según el tipo de cultivo no son detectadas. Bendini et al. (2006) realizaron un estudio estadístico en aceites convencionales, ecológicos y de producción integrada, observando que no se pueden

diferenciar según el tipo de cultivo atendiendo a sus valores de contenido fenólico, resistencia a la oxidación o presencia de metales. En el capítulo 2 de esta tesis, se ha visto que en la oliva, las diferencias en el contenido fenólico entre cultivo convencional y ecológico a lo largo de la maduración son mínimas y puntuales en algunos muestreos, por lo que el tipo de cultivo, si no afecta a la composición fenólica del fruto, no debería afectar a la de los aceites obtenidos a partir de ellos.

#### 6.4.5. Contenido en $\alpha$ -tocoferol y estabilidad oxidativa

El contenido en  $\alpha$ -tocoferol de los aceites se muestra en la Tabla 21, cuyo valor medio fue estadísticamente mayor en 2010 (179.7 mg/kg) que en 2009 (158.0 mg/kg) ( $P < 0.01$ ). También fue significativo el efecto almazara, por lo que en la Figura 55 se muestran los valores del contenido de cada almazara y campaña. En la mayoría de almazaras, excepto en la 1, el contenido en  $\alpha$ -tocoferol fue mayor en 2010 que en 2009.



**Figura 55.** Valores de  $\alpha$ -tocoferol por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.

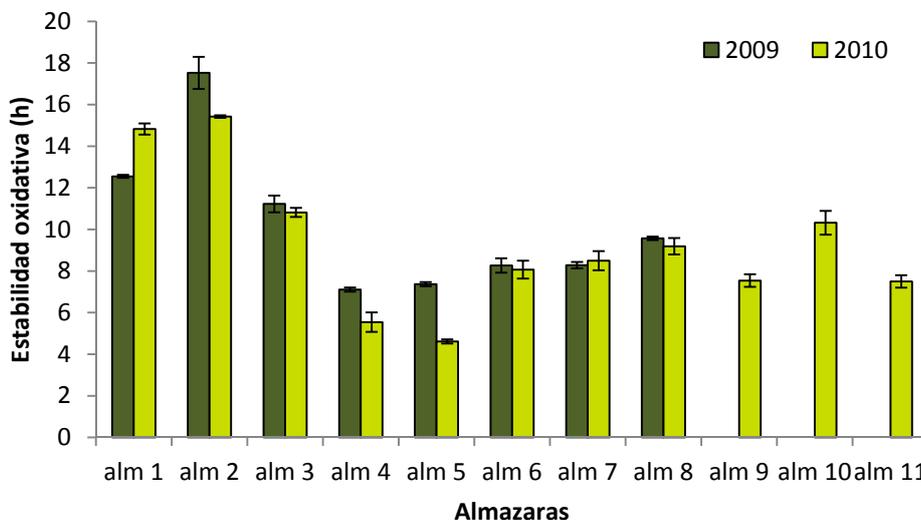
Los valores determinados son similares a los de los estudios de Romero et al. (2003) (con valores de 123 a 289 mg/kg) y Morelló et al. (2006) (con valores de 138 a 206 mg/kg) en aceites de oliva *Arbequina* convencionales de frutos cultivados en la misma zona en campañas anteriores, dependiendo de la campaña y de la fecha de recolección. En aceites de otras variedades, Dolgun et al. (2010) determinaron que el contenido en  $\alpha$ -tocoferol era mayor en el aceite ecológico (1120 mg/kg) que en el convencional (537 mg/kg) en la variedad *Gemlik*, pero no encontró diferencias significativas en el contenido en  $\alpha$ -tocoferol entre los aceites ecológicos y convencionales de la variedad *Memecik*. Gutiérrez et al. (1999) determinaron que el contenido en  $\alpha$ -tocoferol en aceites ecológicos de la variedad *Picual* era 1.3 veces mayor que en los convencionales. Posteriormente, Ninfali et al. (2008) no encontraron diferencias

significativas en el contenido en  $\alpha$ -tocoferol en aceites ecológicos y convencionales de las variedades *Frantoio* y *Leccino*. Ranalli y Contento (2010), que estudiaron el efecto de extraer el aceite a partir de olivas deshuesadas de origen ecológico y convencional de olivas de una mezcla de variedades, determinaron que los aceites ecológicos tenían una mayor concentración de  $\alpha$ -tocoferol (184 frente a 153 mg/kg en aceites de olivas enteras y 215 frente a 176 mg/kg en aceites de olivas deshuesadas).

Para explicar el efecto campaña, respecto a los factores que influyen en el contenido en  $\alpha$ -tocoferol de los aceites, Aguilera et al. (2005) y Beltrán et al. (2010) apuntaron que existe influencia de las condiciones agroclimáticas del año, sobretodo del régimen de precipitaciones, obteniendo aceites con un mayor contenido en  $\alpha$ -tocoferol cuando el año es más seco. Según los datos climáticos registrados en años 2009 y 2010 de la estación meteorológica de La Granadella (anexo al final del documento), el régimen de precipitaciones en la zona fue muy similar en ambos años, siendo la precipitación acumulada a día 31 de diciembre de 431 mm en 2009 y 420 mm en 2010. Uceda (2004) y Gutiérrez et al. (1999) determinaron que el estado de maduración también es un factor a tener en cuenta, ya que el contenido en  $\alpha$ -tocoferol disminuye a medida que avanza la maduración. Al tratarse de aceites comerciales, este es un factor de variabilidad que no se controló. No obstante, una de las posibles razones que se propone que podrían explicar el mayor contenido en tocoferol en los aceites de 2010 que en los de 2009 podría ser que las olivas de 2009 se hubieran recolectado en un estado de maduración más avanzado que las de 2010. Como se ha comentado, la fecha de recolección es un factor importante que determina el contenido en tocoferol del aceite, ya que a medida que la maduración avanza, el contenido en tocoferol en los frutos del olivo disminuye. Observando la gráfica de precipitaciones, durante las fechas de recolección (noviembre y diciembre), en 2009 llovió 26 días, mientras que en 2010 llovió 18 días. Por tanto, en 2009 se podría haber retrasado la cosecha. Además, en 2010, el 26 de noviembre se empezaron a registrar temperaturas mínimas por debajo de cero, mientras que en 2009, la primera temperatura negativa registrada fue en el 11 de diciembre. Este hecho podría haber causado que los agricultores empezaran a recoger sus olivas antes en 2010, por precaución a que las heladas dañaran la cosecha, y por tanto, las olivas de 2010 podrían haber sido menos maduras que las de 2009.

En relación a la estabilidad oxidativa (Tabla 21), se observó un rango amplio de valores, siendo el valor medio de 9.5 horas en ambas campañas, y no encontrándose diferencias significativas entre campañas ( $P \geq 0.05$ ). Sí existieron diferencias según almazaras ( $P < 0.01$ ), tal y como se representa en la Figura 56, siendo los valores de cada almazara similares entre campañas. Los aceites de las almazaras 1 y 2 mostraron los valores más altos en estabilidad oxidativa, mientras que los de las 4, 5, 9 y 11 mostraron los más bajos. En los trabajos anteriores en aceites de oliva *Arbequina* de cultivo convencional, también se observó un rango amplio de valores, de 5.4 a 16.7 horas (Romero et al., 2003) y de 8.0 a 16.6 horas (Morelló et al., 2006).

Romero Aroca (2011) presentó valores medios de estabilidad de aceites de la variedad *Arbequina* del Priorat inferiores a los de este estudio, con una media de 6.24 horas.



**Figura 56.** Valores de estabilidad oxidativa por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.

#### 6.4.6. Análisis sensorial

Los aceites fueron sometidos a evaluación sensorial por catadores expertos. Los atributos evaluados fueron frutado verde, amargo, picante y presencia de defectos. La Tabla 25 presenta un resumen de los resultados y en las Figura 57 se puede observar la variabilidad entre aceites.

Los valores medios para estos 3 atributos son similares a los de otros aceites de la zona, en la que los aceites se caracterizan por ser frutados verdes, amargos y picantes, éstos dos atributos con intensidades superiores a las de los aceites de *Arbequina* de otras zonas oleícolas (Romero Aroca, 2011).

**Tabla 25.** Valores medios de los atributos amargo, picante y frutado en aceites de *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.

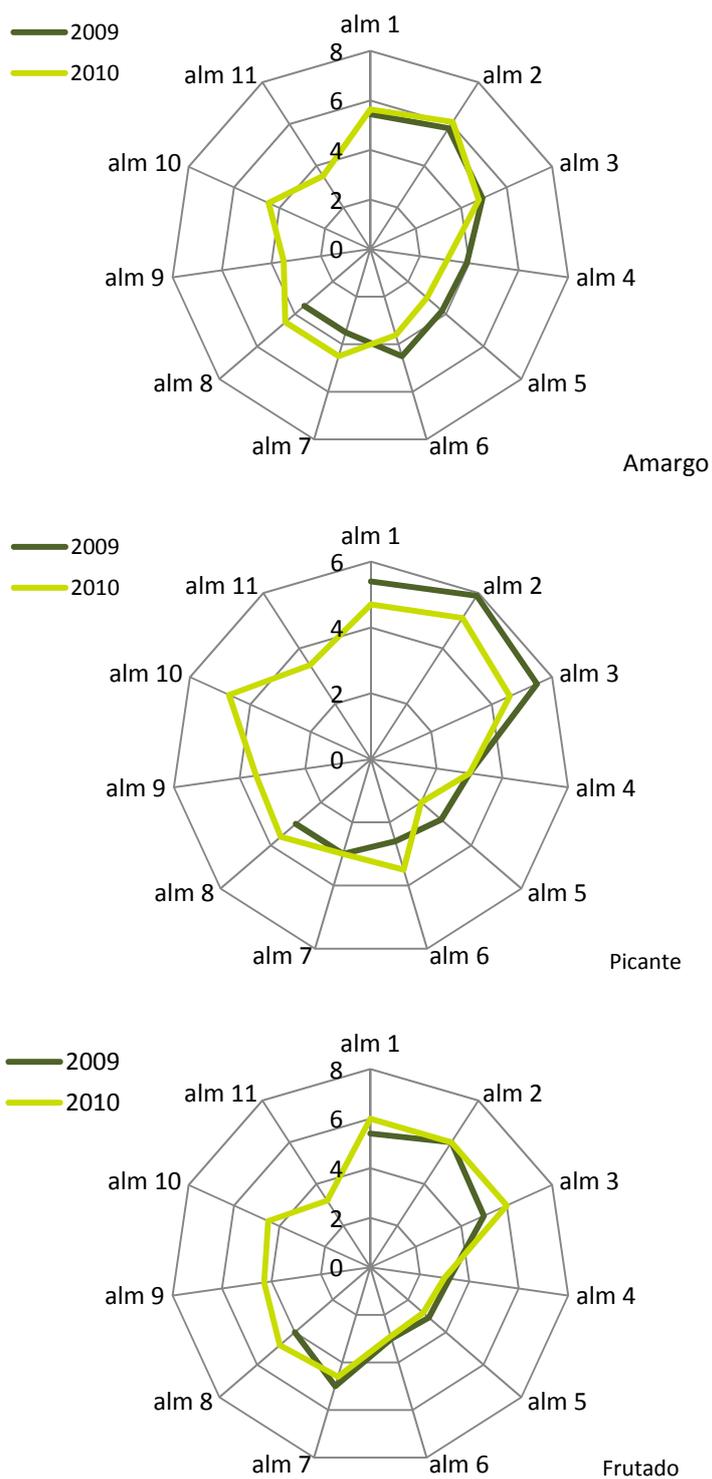
Año	AMARGO			PICANTE			FRUTADO VERDE		
	Media	Desviación estándar	Rango	Media	Desviación estándar	Rango	Media	Desviación estándar	Rango
2009	4.41	0.88	3.5-5.8	3.9	1.42	2.6-5.9	4.34	1.16	3.0-6.0
2010	4.21	1.01	3.0-6.1	3.7	0.94	2.0-5.1	4.37	1.27	2.8-6.0

Los resultados muestran un rango amplio para todos los atributos, lo que indica que a pesar de que todos los aceites han sido extraídos de olivas de la variedad *Arbequina*, los factores tecnológicos y climáticos han tenido una gran influencia. Por otra parte, el análisis de la presencia de defectos ha dado como resultado que en uno de los aceites se reconoció el atributo atrojado por todos los catadores, es decir, dicho aceite no debería haber sido comercializado como virgen extra.

Haciendo un análisis de correlación entre los atributos (Tabla 26) se observa una alta correlación entre ellos. Los aceites más amargos han sido a su vez los más frutados verde y los más picantes.

En cuanto a la correlación entre atributos sensoriales y composición, es destacable la gran influencia que ha tenido en la puntuación del carácter frutado verde con la acidez y peróxidos, con los que muestran una correlación negativa. Los aceites con valores más altos para acidez y peróxidos han perdido intensidad de frutado verde, probablemente por estar más maduros e incluso más evolucionados. También ha resultado negativa la correlación con los alcoholes fenílicos, productos que se forman a partir de los derivados secoiridoides a lo largo de la vida útil del aceite.

Por otra parte, se observa que la mayor correlación se ha dado entre los derivados secoiridoides y los atributos picante y amargo, con valores de 0.9071 y 0.8790. Los aceites de la variedad *Arbequina*, a pesar de que contienen como se ha comentado con anterioridad menos compuestos fenólicos que otros aceites de oliva, son ricos en derivados como el 3,4-DHPEA-EDA y *p*-HPEA-EDA, fracciones relacionadas con las sensaciones amarga y picante y que explicarían esta alta correlación.



**Figura 57.** Valores de amargo, picante y frutado por almazaras de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010.

**Tabla 26.** Matriz de correlación entre atributos sensoriales, parámetros de calidad y compuestos fenólicos.

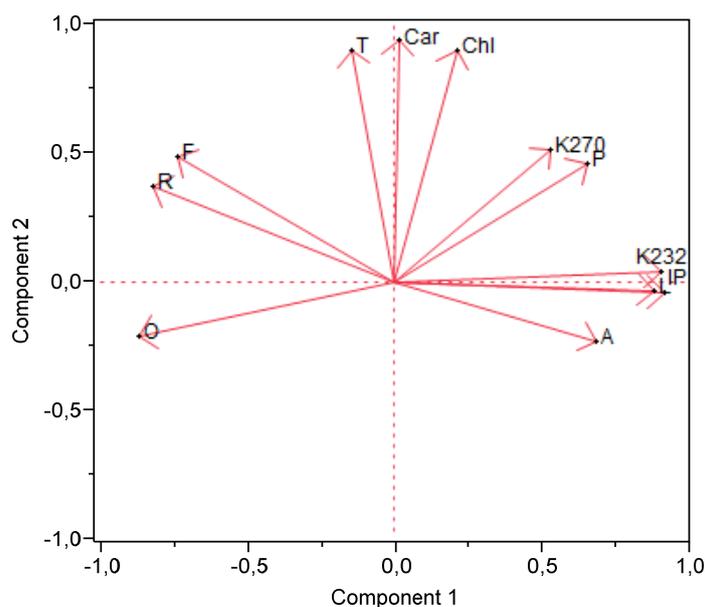
	Amargo	p	Picante	p	Frutado	p
Amargo	1					
Picante	0.8263	0.0000	1			
Frutado	0.8124	0.0000	0.7971	0.0000	1	
Acidez	-0.5340	0.0185	-0.5353	0.0182	-0.7616	0.0002
Peróxidos	-0.7753	0.0001	-0.6825	0.0013	-0.8291	0.0000
K <sub>270</sub>	-0.0231	0.9253	-0.1029	0.6751	-0.4031	0.0871
K <sub>232</sub>	-0.6254	0.0042	-0.6166	0.0049	-0.7972	0.0000
Ácidos fenólicos	0.1902	0.4355	0.1809	0.4585	0.4932	0.0319
Flavonoides	0.1640	0.5022	0.2837	0.2391	0.3935	0.0956
Alcoholes fenólicos	-0.4358	0.0621	-0.3993	0.0903	-0.6094	0.0056
Derivados secoiridoides	0.8790	0.0000	0.9071	0.0000	0.7948	0.0000

#### 6.4.7. Clasificación de los aceites

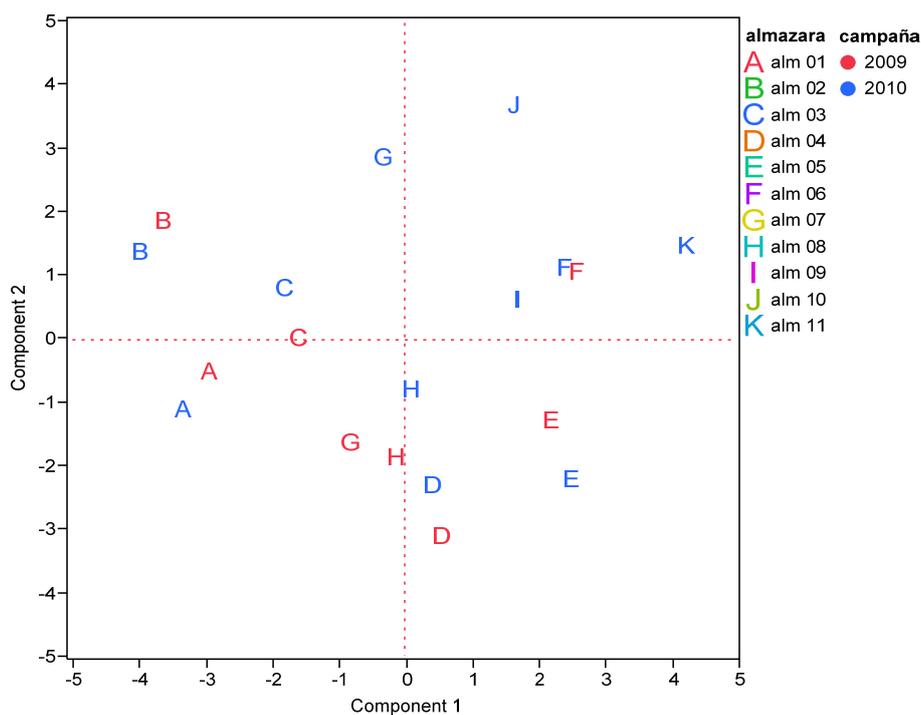
Una vez se dispuso de los valores de todos los parámetros estudiados, se decidió llevar a cabo un estudio estadístico utilizando el análisis de componentes principales (PCA). En la Figura 58 se muestran los dos componentes principales del modelo, que explican un 76.2% de la variabilidad. Como se observa claramente, hay una relación positiva entre el ácido oleico, el contenido en fenoles y el contenido en oleico de los aceites. Con estos factores, se relacionan negativamente los parámetros de calidad (K<sub>270</sub>, K<sub>232</sub>, índice de peróxidos y acidez) y el contenido en palmítico.

Representando los valores de las diferentes almazaras en el modelo (Figura 59), se observa claramente como la mayoría de los aceites procedentes de las diferentes almazaras se agrupan entre ellos, independientemente de la campaña. Por razones de confidencialidad, no se nombran a las almazaras por su nombre real, pero sí se sabe las características de ellas. Las almazaras 1,2, 3 y 7 son empresas pequeñas que poseen su propio molino y fincas, lo que les permite ajustar muy bien tanto las condiciones de trabajo como el momento de la recolección. Como se observa en la Figura 6.4.14., sus aceites son muy cercanos entre campañas, y son los de mejor calidad, según los parámetros insertados en el modelo. Los aceites de la almazara 7 se encuentran separados en la representación. Esta almazara hace poco tiempo que se ha creado, por lo que la de 2009 fue una de sus primeras producciones. La experiencia adquirida en esa campaña les permitió en 2010 conseguir un aceite más rico en fenoles y pigmentos. Los aceites de las almazaras 4 y 8 pertenecen a las cooperativas de dos localidades, por lo que las fincas son de diferentes dueños y el volumen de trabajo en la época de recolección de la oliva

es muy grande, lo que probablemente no les permita cuidar tanto las condiciones como un productor más pequeño. Estos aceites presentaron mayor acidez y menor contenido en fenoles y pigmentos. La almazara 5, que pertenece a un pequeño productor sin molino propio, produjo aceites similares a los de las almazaras 4 y 8. La almazara 6 pertenece a una empresa grande, a la que su gran producción le permite estandarizar muy bien sus aceites, siendo los más similares entre campañas. Los aceites de las almazaras 9 y 11 pertenecen a pequeños productores, mientras que el aceite de la almazara 10 pertenece a una gran empresa, y destaca por su alto contenido pigmentario.



**Figura 58.** Análisis de componentes principales de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010 basado en los principales parámetros de estudio (A: acidez; IP: índice de peróxidos; K<sub>232</sub>; K<sub>270</sub>; Chl: clorofilas HPLC; Car: carotenoides HPLC; P: palmítico; O: oleico; L: linoleico; T:  $\alpha$ -tocoferol; R: estabilidad oxidativa; F: fenoles HPLC).



**Figura 59.** Análisis de componentes principales de los aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* de las campañas 2009 y 2010 basado en los principales parámetros de estudio (A: acidez; IP: índice de peróxidos;  $K_{232}$ ;  $K_{270}$ ; Chl: clorofilas HPLC; Car: carotenoides HPLC; P: palmítico; O: oleico; L: linoleico; T:  $\alpha$ -tocoferol; R: estabilidad oxidativa; F: fenoles HPLC).

#### 6.4.8. Conclusión

En conclusión, y de acuerdo a los parámetros estudiados, podemos afirmar que la mayoría de aceites ecológicos de la variedad *Arbequina* son de una gran calidad y comparables al aceite convencional de la misma variedad producido en la zona. Según las muestras analizadas, los aceites se clasificarían en la categoría de aceite de oliva virgen extra, la de mayor calidad según el Reglamento Europeo vigente núm. 2568/91, a excepción de un aceite en el que se detectaron defectos sensoriales.

No obstante, fueron detectadas diferencias entre las diferentes almazaras. En términos globales, se podría decir que los aceites de las almazaras 1, 2 y 3 fueron los de mayor calidad, debido a sus bajos valores de acidez, peróxidos e índices espectrofotométricos y altos valores en la relación MUFA/PUFA, fenoles,  $\alpha$ -tocoferol y estabilidad oxidativa. Sin embargo, en la evaluación sensorial resultaron amargos y picantes.

Estas diferencias entre almazaras han sido, en la mayoría de los parámetros estudiados, más importantes que las diferencias entre campañas. La variabilidad entre almazaras puede deberse a factores agronómicos y a factores de proceso, principalmente. Entre los factores agronómicos, diferencias en la fertilización, en el control de plagas, el aporte de agua o condiciones microclimáticas diferentes, pueden haber sido definitivos para el fruto, y por tanto,

para la calidad de su aceite. Además, el momento de recolección de las olivas, su estado sanitario y el proceso de extracción del aceite, la tecnología utilizada, y sobretodo el tiempo y la temperatura de batido, de las diferentes almazaras podrían ser los causantes de esta variabilidad. Ésta también se observa cuando se analizan aceites de cultivo convencional debido a las mismas razones, por lo que según los resultados obtenidos y comparándolos con estudios anteriores, se podría decir que las características del aceite dependerían más de la almazara de producción y de la campaña que del tipo de cultivo.

El peso de la campaña ha sido menor de lo esperado, si se tiene en cuenta que el contenido fenólico en frutos es altamente dependiente de las condiciones climáticas de cada año, tal y como se ha demostrado en el capítulo 2. Que estas diferencias sean tan evidentes en los frutos pero no en los aceites podría ser debido a que las empresas ajustan el momento de la cosecha y tipifican sus aceites de manera que de un año a otro sean lo más homogéneos posible.



## 6.5. CARACTERIZACIÓN DE ACEITES DE OLIVA DE LAS VARIETADES EN RETROCESO *NEGRAL*, *VERDAL*, *MANÇANENC*, *ARBRE BLANC*, *GROSSAL* Y *BECARUT* DE PRODUCCIÓN ECOLÓGICA DURANTE LAS CAMPAÑAS OLEÍCOLAS 2009/10 y 2010/11

Esta experiencia se diseñó para caracterizar aceites de oliva de las variedades en retroceso *Negral*, *Verdal*, *Mançanenc*, *Arbre Blanc*, *Grossal* y *Becarut* durante dos campañas oleícolas consecutivas. Estas variedades fueron cultivadas mediante técnicas de producción ecológica en las fincas de la empresa El Molí dels Torms, en Les Garrigues (Lleida) y fueron recolectadas durante los meses de noviembre de 2009 y de 2010. Se dispuso de frutos de la variedad *Arbre Blanc* sólo en 2009, debido a que esta variedad presenta vecería, por lo que la producción de los árboles en 2010 fue muy baja. Los frutos de la variedad *Becarut* fueron incorporados al estudio en 2010.

### 6.5.1. Características de los frutos

Los frutos se caracterizaron según los parámetros de índice de madurez, peso medio del fruto, humedad, relación pulpa/hueso y contenido en aceite, tal y como se muestra en la Tabla 27. Las olivas de la variedad *Grossal* fueron las más grandes en ambas campañas (4.01 g en 2009 y 4.56 g en 2010), mientras que las de la variedad *Verdal* fueron las más pequeñas (1.19 g en 2009 y 1.68 g en 2010). Según el estudio llevado a cabo por Del Rio y Caballero (2008), en el que clasificaron 112 variedades de olivas del sur de España de acuerdo a sus características realizando un seguimiento durante 7 años, los frutos de *Negral*, *Verdal*, *Mançanenc* y *Arbre Blanc* serían frutos de peso bajo, mientras que *Grossal* y *Becarut* serían de peso medio. Con respecto al ratio pulpa/hueso, *Mançanenc*, *Grossal* y *Becarut* fueron las variedades con más alto ratio, lo que coincide con los frutos más grandes, comparables a los frutos de *Manzanilla* (7.7), *Hojiblanca* (6.0), *Empeltre* (5.3) o *Picual* (5.2) (Hermoso et al., 2008). Los frutos de *Verdal* fueron los de un ratio menor, similar al de los frutos de *Arbequina* de la zona de Les Garrigues (4.2) (Hermoso et al., 2008). El ratio pulpa/hueso es un parámetro usado para evaluar la idoneidad comercial de los frutos para su uso como olivas de mesa, y también está relacionado con el contenido de aceite del fruto. Su valor, además de estar condicionado por la genética de la variedad, depende de otros factores como la edad del árbol, la cantidad de frutos en el árbol, la pluviometría o el estado de maduración (Rallo, 1995; Tous Martí y Romero Aroca, 1993). Según el contenido en aceite de los frutos, expresado en base seca, la variedad *Becarut* obtuvo el valor más alto (519.32 g/kg) mientras que el más bajo fue *Arbre Blanc* (359.38 g/kg). Así, las olivas de *Becarut* tendrían un buen rendimiento en aceite, superior al de otras variedades cultivadas en Catalunya como *Picual*, *Manzanilla*, *Empeltre*, *Blanqueta*, *Hojiblanca* o *Arbequina*, todas ellas con rendimientos por debajo del 50% en base seca (Hermoso et al., 2008).

**Tabla 27.** Características de los frutos en el momento de cosecha de las campañas 2009/10 y 2010/11.

<i>Parámetro</i>	<i>Año</i>	<i>Negral</i>	<i>Verdal</i>	<i>Manzanenc</i>	<i>Grossal</i>	<i>Arbre Blanc</i>	<i>Becarut</i>
<b>Peso medio</b> ( g por fruto)	<b>2009</b>	1.97 ± 0.01 <sup>c</sup> (A)	1.19 ± 0.05 <sup>d</sup> (B)	2.05 ± 0.14 <sup>c</sup> (B)	4.01 ± 0.02 <sup>a</sup> (B)	2.37 ± 0.01 <sup>b</sup>	-
	<b>2010</b>	1.86 ± 0.03 <sup>d</sup> (B)	1.68 ± 0.02 <sup>e</sup> (A)	2.87 ± 0.11 <sup>c</sup> (A)	4.56 ± 0.01 <sup>a</sup> (A)	-	3.80 ± 0.08 <sup>b</sup>
<b>Humedad</b> (%)	<b>2009</b>	54.56 ± 0.22 <sup>a</sup> (A)	46.53 ± 0.35 <sup>c</sup> (A)	49.24 ± 0.14 <sup>b</sup> (A)	49.17 ± 0.15 <sup>b</sup> (A)	48.38 ± 0.46 <sup>b</sup>	-
	<b>2010</b>	50.60 ± 0.22 <sup>a</sup> (B)	45.13 ± 0.25 <sup>c</sup> (B)	45.44 ± 0.17 <sup>c</sup> (B)	48.11 ± 0.14 <sup>b</sup> (B)	-	42.29 ± 0.23 <sup>c</sup>
<b>Relación pulpa/hueso</b>	<b>2009</b>	5.38 ± 0.07 <sup>c</sup> (A)	3.73 ± 0.01 <sup>d</sup> (B)	6.20 ± 0.01 <sup>b</sup> (A)	7.22 ± 0.07 <sup>a</sup> (A)	5.44 ± 0.03 <sup>c</sup>	-
	<b>2010</b>	4.54 ± 0.09 <sup>c</sup> (B)	4.39 ± 0.07 <sup>c</sup> (A)	6.18 ± 0.31 <sup>a</sup> (A)	5.78 ± 0.16 <sup>ab</sup> (B)	-	5.30 ± 0.12 <sup>b</sup>
<b>Materia grasa</b> (g aceite / kg olivas en base seca)	<b>2009</b>	411 ± 3 <sup>c</sup> (A)	389 ± 5 <sup>d</sup> (B)	459 ± 4 <sup>b</sup> (B)	477 ± 25 <sup>a</sup> (A)	359 ± 28 <sup>e</sup>	-
	<b>2010</b>	412 ± 2 <sup>d</sup> (A)	457 ± 2 <sup>c</sup> (A)	501 ± 2 <sup>b</sup> (A)	463 ± 2 <sup>c</sup> (B)	-	519 ± 22 <sup>a</sup>
<b>Índice de madurez</b>	<b>2009</b>	3.5	3.2	3.2	3.4	2.5	-
	<b>2010</b>	3.9	3.7	4.5	3.9	-	3.9

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre campañas.

Diferentes letras minúsculas diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre variedades

Se ha determinado la humedad de los frutos, que es un indicador del estado hídrico del cultivo. El aporte de agua, bien por aplicación de riego o por pluviometría, se ve reflejado en un incremento en la humedad del fruto. Los resultados, casi todos por debajo del 50%, muestran que se trata de frutos con una humedad típica del cultivo de secano.

Con respecto a la comparación entre campañas oleícolas, no se observan diferencias significativas en estos parámetros relacionados con la morfología del fruto y los rendimientos industriales. La humedad de los frutos fue el único parámetro que ha sido mayor en los frutos de 2009 que en los de 2010, hecho que podría ser debido a las lluvias de la segunda mitad de octubre (datos de la estación meteorológica de La Granadella, presentados en un anejo al final del documento). Sin embargo, no se observa un efecto claro de la campaña en el resto de parámetros, debido a que el comportamiento fue diferente según la variedad. Por ejemplo, en la relación pulpa/hueso, los valores de los frutos de *Negral* y *Grossal* fueron superiores en 2009 que en 2010, mientras que en los frutos de *Verdal* fueron superiores en 2010 que en 2009, y en los de *Mançanenc* no se observaron diferencias.

#### 6.5.2. Parámetros de calidad

De acuerdo con los parámetros de calidad básicos analizados (Tabla 28), todos los aceites de oliva estudiados podrían estar incluidos en la categoría de aceite de oliva virgen extra, debido a que los valores de acidez, índice de peróxidos,  $K_{270}$  y  $K_{232}$  se encuentran por debajo de los límites establecidos por el Reglamento Europeo 2568/91 para el aceite de oliva virgen extra. Los valores tan bajos de acidez y peróxidos denotan un trato esmerado del fruto así como la aplicación de buenas prácticas de elaboración. Así mismo, son un indicador de que el resto de parámetros que se han analizado no se habrán visto afectados por procesos de degradación del aceite.

El perfil de ácidos grasos se muestra en la Tabla 29. Los ácidos grasos mayoritarios en todas los aceites fueron los ácidos oleico, palmítico y linoleico, como es típico en los aceites de oliva (Aparicio y Harwood, 2003). Los porcentajes de los ácidos grasos de todos los aceites de oliva analizados estarían dentro del rango de valores establecido para los aceites de oliva virgen extra según el Reglamento Europeo 2568/91.

El perfil de ácidos grasos tiene una componente varietal importante, aunque también está muy afectado por las condiciones climáticas de la zona de cultivo. Los aceites de las variedades *Verdal*, *Mançanenc*, *Grossal*, *Arbre Blanc* y *Becarut* cultivados en Les Garrigues presentan un perfil de ácidos grasos que podrían ser encuadrado dentro de los perfiles muy saludables del aceite de oliva, caracterizados por un alto contenido en ácido oleico (74.8-80.3%) y bajo contenido en ácido linoleico (4.5-7.4%). La composición en ácidos grasos de estas variedades sería comparable a los aceites de *Picual*, *Cacereña*, *Racimilla*, *Negral de Aragón*, *Hojiblanca*, *Frantoio* o *Leccino* (Aguilera et al., 2005; Benito et al., 2010; Gutiérrez et al., 1999; Sánchez

Casas et al., 2003) y su contenido en ácido oleico sería ligeramente superior al aceite de oliva *Arbequina* de la zona de Les Garrigues, que contiene un porcentaje medio en torno a 70-74% en ácido oleico (Motilva et al., 2001; Tous et al., 1997; Tovar et al., 2001a). La climatología de la zona de Garrigues favorece los perfiles ricos en oleico, tal y como se observa en los estudios publicados sobre aceites de olivas *Arbequina*, en los que es frecuente encontrar aceites con proporciones de oleico mucho más bajas, incluso por debajo del 60% (Romero Aroca, 2011).

La variedad *Negral* es la única variedad que ha presentado un perfil de ácidos grasos menos interesante, con un menor contenido en ácido oleico (64.3-67.6%) y un mayor porcentaje de los ácidos palmítico (15.1-17.1%) y linoleico (10.4-15.1%). La composición en ácidos grasos del aceite de *Negral* sería más similar a los aceites de *Morisca*, *Verdial de Badajoz*, *Bodocal* o *Chetoui* (Benito et al., 2010; Sanchez Casas et al., 2003; Taamalli, et al., 2010).

Con respecto a la campaña, todos los valores de oleico fueron más altos en la campaña 2010 ( $P < 0.05$ ). Algunos autores han atribuido al factor maduración las diferencias en la proporción de los ácidos grasos. Así, Beltrán et al. (2004) observaron que en la variedad *Picual*, los frutos con mayor índice de madurez contenían mayor proporción de ácido oleico. Sin embargo, algunos estudios llevados a cabo por nuestro grupo de investigación han mostrado una escasa influencia de la madurez cuando se están analizando las diferencias entre frutos con índice 3 y 4; no obstante, sí que se ha encontrado diferencias para aceites de la misma variedad e índice de madurez debido a la localización geográfica, atribuible a diferencias agroclimáticas, en particular a las temperaturas en los meses de verano y en la disponibilidad de agua. A mayor disponibilidad de agua y menor temperatura a finales del verano, la síntesis de ácido oleico se ve reducida y eso podría explicar que los frutos de *Mançanenc* y *Negral*, que de una campaña a otra han presentado más de un 4% de diferencia en humedad, presenten también una mayor diferencia en el porcentaje de ácido oleico entre campañas, superior al 3 % para los aceites de *Negral*.

A la hora de seleccionar un aceite sobre la base de su perfil ácido, es interesante comparar las relaciones entre las distintas fracciones (Tabla 30). Es de sobra conocido que los ácidos grasos insaturados, como el linoleico (C18:2) y el linolénico (C18:3), son más sensibles a la autoxidación que los ácidos grasos monoinsaturados (C18:1, ácido oleico), y también es sabido que los ácidos grasos saturados, a pesar de su estabilidad, no son interesantes desde el punto de vista nutricional. En la Tabla 30 se presentan algunas relaciones entre las familias de ácidos para los aceites de oliva virgen, las relaciones MUFA/PUFA y oleico/linoleico. Cuanto más alto es el valor de estos ratios, más estable a la oxidación es el aceite. En el presente estudio, el aceite con una mayor relación MUFA/PUFA y oleico/linoleico es el de la variedad *Becarut*, con valores de 16.4 y de 18.0, respectivamente; mientras que los aceites de *Negral* presentan un índice bajo. No obstante, el valor de estas ratios es sólo uno más de los factores que determinan la estabilidad del aceite, como se explicará más adelante.

**Tabla 28.** Parámetros de calidad de los aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.

Parámetro	Año	Negral	Verdal	Mañanenc	Grossal	Arbre Blanc	Becarut
Acidez libre (% ácido oleico)	2009	0.12 ± 0.02 <sup>c</sup> (A)	0.14 ± 0.01 <sup>c</sup> (A)	0.24 ± 0.01 <sup>a</sup> (A)	0.19 ± 0.02 <sup>b</sup> (A)	0.07 ± 0.01 <sup>d</sup>	-
	2010	0.07 ± 0.01 <sup>b</sup> (B)	0.13 ± 0.03 <sup>a</sup> (A)	0.14 ± 0.02 <sup>a</sup> (B)	0.07 ± 0.01 <sup>b</sup> (B)	-	0.07 ± 0.02 <sup>b</sup>
Índice de Peróxidos (meq O <sub>2</sub> / kg aceite)	2009	8.6 ± 0.1 <sup>c</sup> (A)	5.2 ± 0.2 <sup>e</sup> (A)	6.3 ± 0.2 <sup>d</sup> (A)	9.0 ± 0.1 <sup>b</sup> (A)	11.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	-
	2010	5.1 ± 0.1 <sup>b</sup> (B)	4.4 ± 0.2 <sup>c</sup> (B)	5.7 ± 0.2 <sup>a</sup> (A)	5.1 ± 0.2 <sup>b</sup> (B)	-	5.8 ± 0.2 <sup>a</sup>
K <sub>270</sub>	2009	0.12 ± 0.01 <sup>b</sup> (A)	0.13 ± 0.01 <sup>a</sup> (B)	0.09 ± 0.01 <sup>c</sup> (A)	0.09 ± 0.01 <sup>c</sup> (B)	0.13 ± 0.01 <sup>a</sup>	-
	2010	0.11 ± 0.01 <sup>b</sup> (A)	0.14 ± 0.02 <sup>a</sup> (A)	0.07 ± 0.01 <sup>d</sup> (A)	0.10 ± 0.02 <sup>b</sup> (A)	-	0.08 ± 0.01 <sup>c</sup>
K <sub>232</sub>	2009	1.87 ± 0.04 <sup>a</sup> (A)	1.55 ± 0.01 <sup>e</sup> (B)	1.71 ± 0.03 <sup>c</sup> (A)	1.65 ± 0.04 <sup>d</sup> (A)	1.79 ± 0.02 <sup>b</sup>	-
	2010	1.74 ± 0.02 <sup>a</sup> (B)	1.82 ± 0.02 <sup>a</sup> (A)	1.712 ± 0.04 <sup>a</sup> (A)	1.52 ± 0.06 <sup>b</sup> (A)	-	1.56 ± 0.03 <sup>b</sup>

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre campañas.

Diferentes letras minúsculas diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre variedades

**Tabla 29A.** Perfil de ácidos grasos (expresados en %) determinados mediante cromatografía de gases de los aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.

<i>Parámetro</i>	<i>Año</i>	<i>Negral</i>	<i>Verdal</i>	<i>Mançanenc</i>	<i>Grossal</i>	<i>Arbre Blanc</i>	<i>Becarut</i>	
<b>Palmítico</b>	<b>C16:0</b>	<b>2009</b>	15.1 ± 0.1 <sup>a</sup> (B)	11.6 ± 0.1 <sup>b</sup> (A)	11.6 ± 0.2 <sup>b</sup> (A)	9.7 ± 0.1 <sup>c</sup> (A)	9.0 ± 0.2 <sup>d</sup>	-
		<b>2010</b>	17.1 ± 0.1 <sup>a</sup> (A)	11.3 ± 0.1 <sup>b</sup> (B)	10.2 ± 0.1 <sup>c</sup> (B)	8.7 ± 0.2 <sup>e</sup> (B)	-	9.7 ± 0.3 <sup>d</sup>
<b>Palmitoleico</b>	<b>C16:1</b>	<b>2009</b>	1.1 ± 0.1 <sup>a</sup> (A)	0.5 ± 0.1 <sup>c</sup> (A)	0.7 ± 0.1 <sup>b</sup> (A)	0.3 ± 0.1 <sup>e</sup> (A)	0.4 ± 0.1 <sup>d</sup>	-
		<b>2010</b>	0.7 ± 0.1 <sup>a</sup> (B)	0.4 ± 0.1 <sup>b</sup> (B)	0.6 ± 0.2 <sup>a</sup> (A)	0.2 ± 0.1 <sup>c</sup> (B)	-	0.6 ± 0.1 <sup>a</sup>
<b>Esteárico</b>	<b>C18:0</b>	<b>2009</b>	1.7 ± 0.1 <sup>c</sup> (B)	1.8 ± 0.1 <sup>b</sup> (B)	1.8 ± 0.2 <sup>b</sup> (A)	2.1 ± 0.1 <sup>a</sup> (B)	1.7 ± 0.1 <sup>c</sup>	-
		<b>2010</b>	2.2 ± 0.1 <sup>e</sup> (A)	2.5 ± 0.1 <sup>c</sup> (A)	1.8 ± 0.1 <sup>a</sup> (A)	3.0 ± 0.1 <sup>d</sup> (A)	-	2.9 ± 0.1 <sup>b</sup>
<b>Oleico</b>	<b>C18:1</b>	<b>2009</b>	64.3 ± 0.5 <sup>e</sup> (B)	75.5 ± 0.4 <sup>c</sup> (B)	74.8 ± 0.1 <sup>d</sup> (B)	78.9 ± 0.3 <sup>b</sup> (B)	79.3 ± 0.6 <sup>a</sup>	-
		<b>2010</b>	67.6 ± 0.6 <sup>e</sup> (A)	76.0 ± 0.2 <sup>d</sup> (A)	77.1 ± 0.6 <sup>c</sup> (A)	80.3 ± 0.4 <sup>a</sup> (A)	-	79.6 ± 0.1 <sup>b</sup>
<b>Linoleico</b>	<b>C18:2</b>	<b>2009</b>	15.1 ± 0.1 <sup>a</sup> (A)	7.4 ± 0.1 <sup>b</sup> (A)	7.2 ± 0.1 <sup>b</sup> (A)	5.7 ± 0.2 <sup>d</sup> (A)	6.3 ± 0.2 <sup>c</sup>	-
		<b>2010</b>	10.4 ± 0.2 <sup>a</sup> (B)	7.4 ± 0.1 <sup>b</sup> (A)	7.2 ± 0.2 <sup>c</sup> (A)	5.1 ± 0.1 <sup>d</sup> (B)	-	4.5 ± 0.1 <sup>e</sup>

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre campañas.

Diferentes letras minúsculas diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre variedades

**Tabla 29B.** Perfil de ácidos grasos (expresados en %) determinados mediante cromatografía de gases de los aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.

<i>Parámetro</i>	<i>Año</i>	<i>Negral</i>	<i>Verdal</i>	<i>Mançanenc</i>	<i>Grossal</i>	<i>Arbre Blanc</i>	<i>Becarut</i>
<b>Araquídico</b>	<b>2009</b>	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup> (A)	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup> (A)	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup> (A)	0.4 ± 0.2 <sup>a</sup> (A)	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	-
	<b>2010</b>	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup> (A)	-	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>			
<b>Eicosenoico</b>	<b>2009</b>	0.3 ± 0.1 <sup>b</sup> (A)	0.3 ± 0.1 <sup>b</sup> (A)	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup> (A)	0.3 ± 0.1 <sup>b</sup> (A)	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup>	-
	<b>2010</b>	0.2 ± 0.1 <sup>c</sup> (B)	0.3 ± 0.1 <sup>b</sup> (A)	0.4 ± 0.1 <sup>a</sup> (A)	0.3 ± 0.1 <sup>b</sup> (A)	-	0.3 ± 0.1 <sup>b</sup>
<b>Behénico</b>	<b>2009</b>	0.1 ± 0.02 <sup>a</sup> (A)	0.1 ± 0.05 <sup>a</sup>	-			
	<b>2010</b>	0.1 ± 0.03 <sup>a</sup> (A)	0.1 ± 0.03 <sup>a</sup> (A)	0.1 ± 0.02 <sup>a</sup> (A)	0.1 ± 0.01 <sup>a</sup> (A)	-	0.1 ± 0.06 <sup>a</sup>

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre campañas.

Diferentes letras minúsculas diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre variedades

**Tabla 30.** Características del perfil de ácidos grasos de los aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.

<i>Parámetro</i>	<i>Año</i>	<i>Negral</i>	<i>Verdal</i>	<i>Mançanenc</i>	<i>Grossal</i>	<i>Arbre Blanc</i>	<i>Becarut</i>
<b>SAF</b>	<b>2009</b>	17.4 ± 0.1 <sup>a</sup> (B)	13.9 ± 0.4 <sup>b</sup> (A)	14.0 ± 0.1 <sup>b</sup> (A)	12.3 ± 0.1 <sup>c</sup> (A)	11.2 ± 0.2 <sup>d</sup> (A)	-
	<b>2010</b>	19.8 ± 0.2 <sup>a</sup> (A)	14.4 ± 0.6 <sup>b</sup> (A)	12.5 ± 0.1 <sup>d</sup> (B)	12.2 ± 0.1 <sup>e</sup> (A)	-	13.1 ± 0.1 <sup>c</sup> (A)
<b>PUFA</b>	<b>2009</b>	15.7 ± 0.1 <sup>a</sup> (A)	8.0 ± 0.1 <sup>b</sup> (A)	7.8 ± 0.1 <sup>b</sup> (A)	6.4 ± 0.1 <sup>d</sup> (A)	7.0 ± 0.2 <sup>c</sup> (A)	-
	<b>2010</b>	10.9 ± 0.4 <sup>a</sup> (B)	7.9 ± 0.2 <sup>b</sup> (A)	7.7 ± 0.1 <sup>c</sup> (A)	5.7 ± 0.1 <sup>d</sup> (B)	-	4.9 ± 0.1 <sup>e</sup> (A)
<b>MUFA</b>	<b>2009</b>	65.7 ± 0.1 <sup>d</sup> (B)	76.3 ± 0.1 <sup>c</sup> (B)	75.9 ± 0.2 <sup>e</sup> (B)	79.5 ± 0.1 <sup>b</sup> (B)	80.1 ± 0.1 <sup>a</sup> (A)	-
	<b>2010</b>	68.5 ± 0.1 <sup>e</sup> (A)	76.7 ± 0.1 <sup>d</sup> (A)	78.1 ± 0.6 <sup>c</sup> (A)	80.9 ± 0.1 <sup>a</sup> (A)	-	80.4 ± 0.2 <sup>b</sup> (A)
<b>OLEICO/LINOLEICO</b>	<b>2009</b>	4.3 ± 0.2 <sup>d</sup> (B)	10.3 ± 0.2 <sup>c</sup> (A)	10.4 ± 0.1 <sup>c</sup> (B)	13.9 ± 0.1 <sup>a</sup> (B)	12.9 ± 0.4 <sup>b</sup> (A)	-
	<b>2010</b>	6.5 ± 0.1 <sup>e</sup> (A)	10.3 ± 0.1 <sup>d</sup> (A)	10.7 ± 0.2 <sup>c</sup> (A)	16.0 ± 0.2 <sup>b</sup> (A)	-	18.0 ± 0.1 <sup>a</sup> (A)
<b>MUFA/PUFA</b>	<b>2009</b>	4.2 ± 0.2 <sup>d</sup> (B)	9.6 ± 0.1 <sup>c</sup> (A)	9.8 ± 0.1 <sup>c</sup> (B)	12.5 ± 0.1 <sup>a</sup> (B)	11.6 ± 0.3 <sup>b</sup> (A)	-
	<b>2010</b>	6.3 ± 0.2 <sup>e</sup> (A)	9.7 ± 0.1 <sup>d</sup> (A)	10.2 ± 0.1 <sup>c</sup> (A)	14.4 ± 0.1 <sup>b</sup> (A)	-	16.4 ± 0.1 <sup>a</sup> (A)

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre campañas.

Diferentes letras minúsculas diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre variedades

### 6.5.3. Perfil pigmentario

El color del aceite de oliva, que es uno de los criterios que tiene en cuenta el consumidor en su elección del producto, es determinado por su contenido en clorofilas y carotenoides. En este trabajo, se ha llevado a cabo la caracterización del perfil pigmentario de los aceites de las variedades estudiadas, tal y como se muestra en la Tabla 31.

Observando el contenido total en pigmentos de los aceites (Tabla 31), se comprueba que los aceites más pigmentados fueron los de las variedades *Arbre Blanc* (35.78 mg/kg) y *Verdal* (20.81 mg/kg) en 2009 y *Becarut* (22.10 mg/kg) en 2010. El menos pigmentado en ambas campañas fue el de la variedad *Grossal*, con 4.19 mg/kg en 2009 y 1.69 mg/kg en 2010. Todos los aceites contuvieron una mayor cantidad de pigmentos en 2009 que en 2010 ( $P < 0.05$ ).

De acuerdo al trabajo llevado a cabo por Gandul-Rojas et al. (1996a), en el que determinaron los perfiles pigmentarios de numerosos aceites monovarietales, *Arbre Blanc* podría considerarse un aceite de alta pigmentación, ya que contendría una cantidad similar de pigmentos a los aceites de oliva más pigmentados en dichos estudios, entre ellos un aceite *Picual*, con 37.60 mg/kg. Comparando con el estudio de Cerretani et al. (2008) también quedaría clasificado como aceite de alta pigmentación, al mismo nivel que el aceite de *Ghiacciolo* que contiene 30.40 mg/kg. El contenido pigmentario de los aceites de las variedades *Verdal*, *Arbre Blanc* y *Becarut* sería superior al del aceite de la variedad *Arbequina* de la zona de Les Garrigues, que fue de 3.46-9.77 mg/kg en la campaña 2002/2003 y de 2.27-9.58 mg/kg en la 2003/2004 (Criado et al., 2008), mientras que los aceites de *Negral*, *Mançanenc* y *Grossal* tendrían un contenido similar. Por tanto, los aceites de *Becarut* y *Arbre Blanc* podrían ser aceites candidatos, si el resto de parámetros y atributos sensoriales lo permiten, a formar parte de *coupages* con los de *Arbequina* para reforzarle el color.

Con respecto al contenido clorofílico, todos los aceites contuvieron mayor concentración de pigmentos clorofílicos en 2009 que en 2010 ( $P < 0.05$ ). Según las variedades, los aceites con un mayor contenido en pigmentos clorofílicos fueron los de las variedades *Arbre Blanc* (17.71 mg/kg) y *Verdal* (8.58 mg/kg) en 2009 y *Becarut* (8.52 mg/kg) en 2010. *Grossal* fue la variedad cuyo aceite mostró un menor contenido en pigmentos clorofílicos en ambas campañas, 4.62 mg/kg en 2009 y 0.71 mg/kg en 2010.

En el contenido en pigmentos carotenoides, el efecto de la campaña no siguió una tendencia homogénea para todas las variedades. Los aceites de las variedades *Verdal* y *Grossal* mostraron un mayor contenido en carotenoides en 2009, mientras el aceite de *Mançanenc* mostró un contenido mayor en 2010 y no se encontraron diferencias en el contenido carotenoides entre campañas en el aceite de *Negral*. Comparando entre variedades, el aceite más rico en pigmentos carotenoides fue el de *Arbre Blanc* (18.07 mg/kg) y el de *Verdal* (12.24 mg/kg) en 2009 y el de *Becarut* (13.58 mg/kg) en 2010.

En cuanto al estudio detallado de cada uno de los pigmentos mayoritarios en ambas fracciones han sido identificados los compuestos clorofila-a, feofitina-a, feofórbido-a y clorofila-b en la fracción clorofílica. No se detectaron en ninguno de los aceites ni clorofilidas ni feofitina-b. La fracción carotenoide puede ser dividida en dos grupos, los carotenos y las xantofilas. Ambos grupos son los responsables de los colores amarillo, naranja y rojo de los frutos, encontrándose en todos los tejidos fotosintéticos, como las clorofilas. El caroteno identificado fue  $\beta$ -caroteno, mientras que en el grupo de las xantofilas, se identificaron neoxanteno, violaxanteno, luteoxanteno, anteraxanteno, luteína,  $\beta$ -criptoxanteno y las formas esterificadas de violaxanteno y neoxanteno. El pigmento mutatoxanteno no fue detectado en ninguna de las muestras.

Los pigmentos clorofílicos pueden ser divididos en dos grupos: clorofila-a y sus derivados y clorofila-b y sus derivados. En todas las muestras estudiadas, fue mayor el grupo de clorofila-a, representando entre el 90-98% del total del contenido clorofílico, mientras el grupo de clorofila-b representó sólo entre un 2-10%. En términos generales, las plantas tienen un contenido mayor en clorofila-a que en clorofila-b, con una relación aproximada de 3:1 (Schwartz y Lorenzo, 1990). Sin embargo, si comparamos las proporciones obtenidas en otros estudios en aceites de oliva, el porcentaje de clorofila-a y sus derivados es también mayor (más de un 85%) que el del grupo de clorofila-b y sus derivados, tal y como sucede en nuestros resultados. (Criado et al., 2004; Criado et al., 2008; Cerretani et al., 2008; Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera, 1996; Giuffrida et al., 2007).

En todos los aceites, el pigmento clorofílico más abundante fue la feofitina-a o su precursor, la clorofila-a. El contenido de uno u otro fue diferente dependiendo de la variedad y de la campaña. El aceite de *Verdal* fue el único que presentó una mayor concentración de clorofila-a que de feofitina-a en ambas campañas. Los aceites de *Negral*, *Mançanenc* y *Grossal* contuvieron más feofitina-a que clorofila-a en 2009, y a la inversa en 2010. Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera (1996) determinaron que el pigmento mayoritario fue feofitina-a en todos los aceites estudiados de siete variedades, representando un 44-58% del contenido total pigmentario. Sin embargo, nuestros resultados estarían más de acuerdo con los obtenidos en un estudio posterior del mismo grupo de investigación, en el que Gallardo-Guerrero et al. (2005), además de ratificar que el contenido pigmentario depende en gran medida de la variedad de la oliva, identificaron mayor número de pigmentos, entre ellos clorofilas a y b. Así, observaron que en los aceites de las variedades *Arbequina* y *Hojiblanca*, el contenido en clorofila-a era mayor que el de feofitina-a, mientras que en los aceites de *Cornicabra* y *Picual*, sucedía al contrario.

**Tabla 31A.** Perfil pigmentario (expresado en mg/kg aceite) determinado mediante HPLC-DAD de los aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.

<i>Parámetro</i>	<i>Año</i>	<i>Negral</i>	<i>Verdal</i>	<i>Mançanenc</i>	<i>Grossal</i>	<i>Arbre Blanc</i>	<i>Becarut</i>
Clorofila-a	2009	1.97 ± 0.01 <sup>c</sup> (B)	5.64 ± 0.01 <sup>a</sup> (A)	0.09 ± 0.01 <sup>d</sup> (B)	0.03 ± 0.01 <sup>e</sup> (A)	2.45 ± 0.03 <sup>b</sup>	-
	2010	2.50 ± 0.08 <sup>b</sup> (A)	3.03 ± 0.01 <sup>a</sup> (B)	2.52 ± 0.01 <sup>b</sup> (A)	0.38 ± 0.12 <sup>c</sup> (A)	-	3.00 ± 0.01 <sup>a</sup>
Feofitina-a	2009	3.98 ± 0.02 <sup>b</sup> (A)	2.25 ± 0.06 <sup>c</sup> (A)	4.18 ± 0.04 <sup>b</sup> (A)	1.54 ± 0.01 <sup>d</sup> (A)	13.56 ± 0.13 <sup>a</sup>	-
	2010	0.89 ± 0.01 <sup>b</sup> (B)	0.42 ± 0.02 <sup>d</sup> (B)	0.67 ± 0.02 <sup>c</sup> (B)	0.27 ± 0.04 <sup>e</sup> (B)	-	4.77 ± 0.10 <sup>a</sup>
Feofórbido-a	2009	nd	nd	nd	nd	nd	-
	2010	nd <sup>b</sup>	nd <sup>b</sup>	nd <sup>b</sup>	nd <sup>b</sup>	-	0.15 ± 0.02 <sup>a</sup>
Clorofila -b	2009	0.37 ± 0.01 <sup>c</sup> (A)	0.69 ± 0.02 <sup>b</sup> (A)	0.30 ± 0.02 <sup>d</sup> (A)	0.04 ± 0.01 <sup>e</sup> (B)	1.66 ± 0.01 <sup>a</sup>	-
	2010	0.23 ± 0.01 <sup>b</sup> (B)	0.24 ± 0.02 <sup>b</sup> (B)	0.23 ± 0.01 <sup>b</sup> (B)	0.07 ± 0.01 <sup>c</sup> (A)	-	0.61 ± 0.02 <sup>a</sup>
<b>Clorofilas totales</b>	<b>2009</b>	<b>6.32 ± 0.02<sup>c</sup> (A)</b>	<b>8.58 ± 0.08<sup>b</sup> (A)</b>	<b>4.57 ± 0.04<sup>d</sup> (A)</b>	<b>1.62 ± 0.02<sup>e</sup> (A)</b>	<b>17.71 ± 0.06<sup>a</sup></b>	-
	<b>2010</b>	<b>3.61 ± 0.10<sup>b</sup> (B)</b>	<b>3.69 ± 0.23<sup>b</sup> (B)</b>	<b>3.41 ± 0.05<sup>b</sup> (B)</b>	<b>0.71 ± 0.17<sup>c</sup> (B)</b>	-	<b>8.52 ± 0.06<sup>a</sup></b>
Neoxanteno	2009	0.12 ± 0.01 <sup>d</sup> (A)	0.23 ± 0.01 <sup>b</sup> (A)	0.14 ± 0.01 <sup>c</sup> (A)	0.01 ± 0.00 <sup>e</sup> (B)	0.39 ± 0.03 <sup>a</sup>	-
	2010	0.09 ± 0.01 <sup>bc</sup> (B)	0.19 ± 0.03 <sup>b</sup> (A)	0.17 ± 0.01 <sup>b</sup> (A)	0.04 ± 0.01 <sup>c</sup> (A)	-	0.55 ± 0.06 <sup>a</sup>

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre campañas.

Diferentes letras minúsculas diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre variedades

**Tabla 31B.** Perfil pigmentario (expresado en mg/kg aceite) determinado mediante HPLC-DAD de los aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.

<i>Parámetro</i>	<i>Año</i>	<i>Negral</i>	<i>Verdal</i>	<i>Mançanenc</i>	<i>Grossal</i>	<i>Arbre Blanc</i>	<i>Becarut</i>
Violaxanteno	2009	0.70 ± 0.01 <sup>c</sup> (A)	1.70 ± 0.01 <sup>b</sup> (A)	0.85 ± 0.01 <sup>c</sup> (A)	0.12 ± 0.01 <sup>d</sup> (A)	2.69 ± 0.16 <sup>a</sup>	-
	2010	0.52 ± 0.02 <sup>a</sup> (B)	0.40 ± 0.02 <sup>c</sup> (B)	0.51 ± 0.01 <sup>e</sup> (B)	0.04 ± 0.01 <sup>d</sup> (B)	-	0.96 ± 0.03 <sup>b</sup>
Luteoxanteno	2009	0.03 ± 0.01 <sup>c</sup> (A)	0.07 ± 0.01 <sup>b</sup> (A)	0.05 ± 0.01 <sup>b</sup> (A)	nd <sup>d</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>a</sup>	-
	2010	nd <sup>c</sup> (B)	0.01 ± 0.00 <sup>b</sup> (B)	nd <sup>c</sup> (B)	nd <sup>c</sup>	-	0.03 ± 0.01 <sup>a</sup>
Anteraxanteno	2009	0.15 ± 0.02 <sup>c</sup> (B)	0.25 ± 0.02 <sup>b</sup> (B)	0.09 ± 0.01 <sup>d</sup> (B)	nd <sup>e</sup> (B)	0.32 ± 0.01 <sup>a</sup>	-
	2010	0.50 ± 0.02 <sup>b</sup> (A)	0.39 ± 0.03 <sup>d</sup> (A)	0.43 ± 0.01 <sup>c</sup> (A)	0.06 ± 0.01 <sup>e</sup> (A)	-	0.85 ± 0.02 <sup>a</sup>
Luteína	2009	3.36 ± 0.01 <sup>b</sup> (A)	3.58 ± 0.03 <sup>b</sup> (A)	2.75 ± 0.01 <sup>c</sup> (B)	2.05 ± 0.02 <sup>d</sup> (A)	10.96 ± 0.16 <sup>a</sup>	-
	2010	2.91 ± 0.12 <sup>c</sup> (A)	3.22 ± 0.16 <sup>bc</sup> (A)	3.41 ± 0.01 <sup>b</sup> (A)	0.48 ± 0.03 <sup>d</sup> (B)	-	10.18 ± 0.03 <sup>a</sup>
β-criptoxanteno	2009	0.07 ± 0.01 <sup>c</sup> (A)	0.15 ± 0.01 <sup>b</sup> (A)	0.01 ± 0.00 <sup>e</sup> (B)	0.03 ± 0.01 <sup>d</sup> (A)	0.17 ± 0.02 <sup>a</sup>	-
	2010	0.07 ± 0.01 <sup>c</sup> (A)	0.05 ± 0.01 <sup>b</sup> (B)	0.09 ± 0.01 <sup>a</sup> (A)	nd <sup>d</sup> (B)	-	0.10 ± 0.02 <sup>a</sup>

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre campañas.

Diferentes letras minúsculas diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre variedades

**Tabla 31C.** Perfil pigmentario (expresado en mg/kg aceite) determinado mediante HPLC-DAD de los aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11

<i>Parámetro</i>	<i>Año</i>	<i>Negral</i>	<i>Verdal</i>	<i>Mançanenc</i>	<i>Grossal</i>	<i>Arbre Blanc</i>	<i>Becarut</i>
Violaxanteno monoesterificado	2009	0.04 ± 0.01 <sup>c</sup> (A)	0.64 ± 0.04 <sup>a</sup> (A)	0.04 ± 0.01 <sup>c</sup> (B)	nd <sup>c</sup>	0.11 ± 0.01 <sup>b</sup>	-
	2010	0.05 ± 0.01 <sup>b</sup> (A)	0.28 ± 0.01 <sup>a</sup> (B)	0.05 ± 0.01 <sup>b</sup> (A)	nd <sup>c</sup>	-	0.03 ± 0.01 <sup>b</sup>
Neoxanteno esterificado	2009	0.05 ± 0.01 <sup>cd</sup> (B)	0.56 ± 0.04 <sup>a</sup> (A)	0.07 ± 0.00 <sup>c</sup> (A)	nd <sup>d</sup>	0.18 ± 0.01 <sup>b</sup>	-
	2010	0.10 ± 0.01 <sup>b</sup> (A)	0.47 ± 0.02 <sup>a</sup> (A)	0.06 ± 0.00 <sup>b</sup> (B)	nd <sup>c</sup>	-	0.10 ± 0.05 <sup>b</sup>
β-caroteno	2009	1.26 ± 0.03 <sup>c</sup> (B)	5.03 ± 0.09 <sup>a</sup> (A)	0.85 ± 0.01 <sup>d</sup> (A)	0.34 ± 0.01 <sup>e</sup> (A)	3.13 ± 0.01 <sup>b</sup>	-
	2010	1.36 ± 0.04 <sup>b</sup> (A)	4.80 ± 0.19 <sup>a</sup> (B)	0.32 ± 0.02 <sup>e</sup> (B)	0.37 ± 0.03 <sup>d</sup> (A)	-	0.82 ± 0.01 <sup>c</sup>
<b>Carotenoides totales</b>	<b>2009</b>	<b>5.77 ± 0.02<sup>c</sup> (A)</b>	<b>12.24 ± 0.11<sup>b</sup> (A)</b>	<b>4.84 ± 0.01<sup>d</sup> (B)</b>	<b>2.58 ± 0.01<sup>e</sup> (A)</b>	<b>18.07 ± 0.06<sup>a</sup></b>	-
	<b>2010</b>	<b>5.58 ± 0.15<sup>c</sup> (A)</b>	<b>9.80 ± 0.16<sup>b</sup> (B)</b>	<b>5.05 ± 0.01<sup>d</sup> (A)</b>	<b>0.97 ± 0.02<sup>e</sup> (B)</b>	-	<b>13.58 ± 0.09<sup>a</sup></b>
<b>Pigmentos totales</b>	<b>2009</b>	<b>12.08 ± 0.04<sup>c</sup> (A)</b>	<b>20.81 ± 0.18<sup>b</sup> (A)</b>	<b>9.41 ± 0.05<sup>d</sup> (A)</b>	<b>4.19 ± 0.03<sup>e</sup> (A)</b>	<b>35.78 ± 0.12<sup>a</sup></b>	-
	<b>2010</b>	<b>9.19 ± 0.24<sup>c</sup> (B)</b>	<b>13.48 ± 0.38<sup>b</sup> (B)</b>	<b>8.46 ± 0.01<sup>c</sup> (B)</b>	<b>1.69 ± 0.19<sup>d</sup> (B)</b>	-	<b>22.10 ± 0.04<sup>a</sup></b>

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre campañas.

Diferentes letras minúsculas diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre variedades

El pigmento feofórbido-a se origina por actividad clorofilasa y fue propuesto como marcador varietal debido a que sólo había sido detectado en aceites de algunas variedades concretas. En primer lugar, fue detectado en aceite de la variedad *Arbequina* (Criado, 2005; Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera, 1996a). Posteriormente se ha detectado en las dos variedades italianas *Ghiaccio* and *Sant'Agatese* (Cerretani et al., 2008) y en la variedad *Sikitita*, derivada del cruce entre las variedades *Picual* y *Arbequina* (Roca et al., 2011). En nuestro estudio se confirma que se trata de un pigmento poco frecuente en aceites de oliva ya que solamente ha sido detectado en el aceite de *Becarut* con una concentración de 0.15 mg/kg.

La presencia de las formas esterificadas de violaxanteno y neoxanteno está relacionado con la carotenogénesis, que es la síntesis *de novo* de pigmentos carotenoides en el fruto en el momento en que se está produciendo la degradación de tanto los pigmentos clorofílicos como carotenoides. Se identificaron xantofilas esterificadas en los aceites de todas las variedades, excepto en el aceite de *Grossal*. La presencia de xantofilas esterificadas se ha relacionado con altos contenidos de sus precursores, violaxanteno y neoxanteno (Gandul-Rojas et al., 1999). En el presente estudio, cabe destacar la concentración de xantofilas esterificadas comparado con sus precursores en el aceite de la variedad *Verdal*, ya que en ambas campañas, el contenido en neoxanteno esterificado fue 2.5 veces el contenido en neoxanteno. La forma esterificada de violaxanteno solo se ha detectado hasta el momento en los aceites de las variedades *Arbequina* y *Sikitita* en España (Criado et al., 2004; Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera, 1996a; Roca et al., 2011). El neoxanteno esterificado fue identificado por primera vez por Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera (1996) en aceite de *Arbequina* y posteriormente se ha cuantificado en los aceites de las variedades italianas *Cerasuola*, *Nocellara del Beloce* y *Biancolilla* (Giuffrida et al., 2007). Para la confirmación de la carotenogénesis en los frutos de las variedades *Negral*, *Verdal*, *Arbre Blanc*, *Mançanenc* y *Becarut*, tal y como indica la presencia de las xantofilas esterificadas en estas variedades, se debería hacer un trabajo de seguimiento del contenido pigmentario durante la maduración del fruto. Esta esterificación de carotenoides con ácidos grasos juega un papel importante en su estabilidad (Gross, 1991) y mejora su biodisponibilidad cuando estos son ingeridos (Parker et al., 1999).

Las relaciones entre diferentes parámetros de la fracción pigmentaria se han propuesto como diferenciadores varietales. Así, en la bibliografía son frecuentes las relaciones clorofilas/carotenoides, % de luteína y % de  $\beta$ -caroteno (Tabla 32).

**Tabla 32.** Parámetros relacionados con la fracción pigmentaria y coordenadas de color CIELAB en aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.

<i>Parámetro</i>	<i>Año</i>	<i>Negral</i>	<i>Verdal</i>	<i>Mançanenc</i>	<i>Grossal</i>	<i>Arbre Blanc</i>	<i>Becarut</i>
<b>Relación clorofilas /carotenoides</b>	<b>2009</b>	1.10 ± 0.03 <sup>a</sup> (A)	0.70 ± 0.03 <sup>d</sup> (A)	0.95 ± 0.01 <sup>c</sup> (A)	0.63 ± 0.01 <sup>e</sup> (B)	0.98 ± 0.02 <sup>b</sup>	-
	<b>2010</b>	0.65 ± 0.01 <sup>c</sup> (B)	0.38 ± 0.01 <sup>d</sup> (B)	0.68 ± 0.06 <sup>b</sup> (B)	0.73 ± 0.02 <sup>a</sup> (A)	-	0.63 ± 0.01 <sup>c</sup>
<b>% β-caroteno</b>	<b>2009</b>	27.81 ± 0.06 <sup>b</sup> (B)	41.12 ± 0.36 <sup>a</sup> (B)	17.42 ± 0.11 <sup>c</sup> (A)	13.25 ± 0.17 <sup>d</sup> (B)	17.34 ± 0.00 <sup>c</sup>	-
	<b>2010</b>	24.44 ± 0.12 <sup>c</sup> (A)	49.01 ± 0.39 <sup>a</sup> (A)	6.53 ± 0.01 <sup>d</sup> (B)	37.28 ± 0.69 <sup>b</sup> (A)	-	6.11 ± 0.04 <sup>d</sup>
<b>% luteína</b>	<b>2009</b>	58.20 ± 0.10 <sup>c</sup> (A)	29.30 ± 0.20 <sup>e</sup> (B)	56.85 ± 0.15 <sup>d</sup> (B)	79.45 ± 0.35 <sup>a</sup> (A)	60.70 ± 0.70 <sup>b</sup>	-
	<b>2010</b>	52.15 ± 0.05 <sup>c</sup> (B)	32.85 ± 0.05 <sup>e</sup> (A)	67.55 ± 0.25 <sup>b</sup> (A)	49.65 ± 0.55 <sup>d</sup> (B)	-	74.95 ± 0.35 <sup>a</sup>
<b>L*</b>	<b>2009</b>	86.71 ± 0.01 <sup>b</sup> (A)	84.34 ± 0.24 <sup>b</sup> (A)	87.33 ± 2.27 <sup>b</sup> (A)	91.296 ± 0.154 <sup>a</sup> (B)	78.82 ± 0.31 <sup>c</sup>	-
	<b>2010</b>	84.52 ± 0.05 <sup>c</sup> (B)	84.99 ± 0.03 <sup>c</sup> (A)	92.04 ± 0.06 <sup>b</sup> (A)	93.12 ± 0.05 <sup>a</sup> (A)	-	78.97 ± 0.43 <sup>d</sup>
<b>a*</b>	<b>2009</b>	-1.53 ± 0.01 <sup>b</sup> (B)	1.76 ± 0.05 <sup>a</sup> (B)	-3.23 ± 0.46 <sup>c</sup> (A)	-3.42 ± 0.02 <sup>c</sup> (A)	1.25 ± 0.03 <sup>a</sup>	-
	<b>2010</b>	-1.22 ± 0.04 <sup>b</sup> (A)	2.69 ± 0.08 <sup>a</sup> (A)	-5.47 ± 0.03 <sup>d</sup> (B)	-4.43 ± 0.03 <sup>c</sup> (B)	-	-1.33 ± 0.01 <sup>b</sup>
<b>b*</b>	<b>2009</b>	96.47 ± 0.08 <sup>c</sup> (B)	127.52 ± 0.27 <sup>a</sup> (A)	82.33 ± 1.34 <sup>d</sup> (A)	63.90 ± 0.02 <sup>e</sup> (A)	121.20 ± 0.40 <sup>b</sup>	-
	<b>2010</b>	109.27 ± 0.09 <sup>b</sup> (A)	124.62 ± 0.13 <sup>a</sup> (B)	60.64 ± 0.09 <sup>d</sup> (B)	60.65 ± 0.01 <sup>d</sup> (B)	-	93.39 ± 0.49 <sup>c</sup>

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre campañas.

Diferentes letras minúsculas diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre variedades

La ratio clorofilas/carotenoides se utiliza como parámetro para evaluar la autenticidad de los aceites de oliva vírgenes independientemente de la variedad y del estado de madurez (Gandul-Rojas et al., 2000). Todos los aceites del presente estudio estarían dentro del valor propuesto por estos autores para la relación, entre 0.53 y 1.40, excepto el aceite de la variedad *Verdal* en 2010, en que la relación fue inferior (0.38). Sin embargo, algunos autores han determinado valores diferentes para esta relación a los propuestos por Gandul-Rojas et al. (2000), como en el estudio de Criado et al. (2008), en que el valor de la relación para aceites de oliva de la variedad *Arbequina* de Les Garrigues fue más bajo, de 0.33 a 0.96. En aceites no españoles, se han determinado valores superiores a 1.40 en aceites de *Coratina*, *Koroneiki* y *Biancolilla*, e inferiores a 0.53 en aceites de *Ghiacciolo* (Aparicio-Ruiz et al., 2009; Cerretani et al., 2008).

También se ha determinado el porcentaje de  $\beta$ -caroteno respecto al contenido en carotenoides totales. En aceites españoles, este porcentaje se sitúa entre el 5 y el 20%, mientras que en aceite de *Arbequina*, este porcentaje es superior, del 16 al 30% (Criado et al., 2007a; Gandul-Rojas et al., 2000). En nuestro estudio, el aceite de *Verdal* mostró porcentajes más altos de  $\beta$ -caroteno (41% en 2009 y 49% en 2010) y también *Grossal* en 2010 (37%). Estos valores tan altos son más similares a aceites de oliva no españoles de las variedades *Biancolilla*, *Nocellara del Beloce*, *Coratina* and *Koroneiki*, que mostraron valores superiores al 37% (Aparicio-Ruiz et al., 2009; Cerretani et al., 2008).

Según el porcentaje de luteína respecto al contenido en carotenoides totales, todos los aceites estarían dentro del rango propuesto por Gandul Rojas et al. (2000) (51-87%), excepto el aceite de *Verdal*, cuyos valores fueron más bajos (29% en 2009 y 33% en 2010), y el aceite de *Grossal* en 2010 (50%), debido a su alto contenido en  $\beta$ -caroteno, como se ha explicado anteriormente. Valores más bajos han sido determinados también en los aceites de *Coratina* (39%), *Koroneiki* (37%), *Ghiacciolo* (40-69%), *Giarraffa* (40%), *Sant'Agatese* (41%), *Biancolilla* (27-35%) y *Nocellara del Beloce* (30-33%) (Aparicio-Ruiz et al., 2009; Cerretani et al., 2008).

Con respecto al color, se determinaron las coordenadas  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  de los aceites, tal y como se muestra en la Tabla 32. La coordenada  $L^*$  mostró valores entre 79 y 93, correspondiendo valores de  $L^*$  más bajos con los aceites más pigmentados (Criado et al., 2004). Estos valores son similares a los obtenidos en aceites de otras variedades (Mínguez-Mosquera et al., 1991). Por otra parte, los aceites de las variedades *Verdal* y *Arbre Blanc* mostraron valores positivos muy bajos del parámetro  $a^*$  y muy altos en el parámetro  $b^*$ . Los valores bajos de  $a^*$  son habituales, aunque más frecuentes en el cuadrante positivo; sin embargo, los valores altos de  $b^*$  no son tan frecuentes en la bibliografía. Los aceites del presente estudio muestran valores de  $b^*$  para los aceites de *Negral*, *Verdal*, *Arbre Blanc* y *Becarut* son incluso superiores a 100, en particular los de *Arbre Blanc* y *Verdal*, próximos a 120. Se ha verificado si se cumplen las correlaciones que previamente han sido encontradas en otros trabajos con aceites de diversos orígenes, y efectivamente, tal y como se detalla en la Tabla 33, la coordenada  $b^*$  muestra una

buena correlación significativa ( $P < 0.01$ ) con los pigmentos carotenoides, así como con la coordenada  $a^*$ .

**Tabla 33.** Matriz de correlación entre las coordenadas de color y los pigmentos totales

	L*	a*	b*	Pig clorofílicos	Pig carotenoides
L*	1	-0.5949 (0.0911)	-0.2554 (0.5072)	-0.5773 (0.1036)	-0.5631 (0.1144)
a*		1	<b>0.8829</b> (0.0016)	0.6528 (0.0566)	<b>0.9101</b> (0.0007)
b*			1	0.5274 (0.1445)	<b>0.8421</b> (0.0044)
Pigmentos clorofílicos				1	0.6446 (0.0609)
Pigmentos carotenoides					1

Números entre paréntesis se refieren al nivel de significación de la correlación

#### 6.5.4. Perfil fenólico

El contenido en fenoles totales determinado mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu es un método muy utilizado debido a su simplicidad y rapidez. Los resultados del contenido total fenólico, expresado en mg de ácido cafeico/kg de aceite, se muestran en la Tabla 34. El aceite de la variedad *Verdal* fue el que mostró un mayor contenido en fenoles en ambas campañas, 434 mg/kg y 516 mg/kg en 2009 y 2010, respectivamente.

Sin embargo, la principal limitación que tiene la cuantificación mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu es su baja selectividad, debido a que algunos compuestos como azúcares, aminas aromáticas, dióxido de azufre, ácido ascórbico y otros enedíoles, reductonas y ácidos orgánicos interfieren en la reacción (Prior et al., 2005). Por tanto, para conseguir una caracterización más detallada de la fracción fenólica de los aceites monovarietales, se realizó la determinación del perfil fenólico por HPLC-DAD. Las concentraciones obtenidas de los compuestos fenólicos, expresadas en mg/kg de aceite, durante las dos campañas de estudio, se muestran en la Tabla 35.

**Tabla 34.** Estabilidad oxidativa y contenido total de algunos compuestos antioxidantes de los aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.

<i>Parámetro</i>	<i>Año</i>	<i>Negral</i>	<i>Verdal</i>	<i>Mançanenc</i>	<i>Grossal</i>	<i>Arbre Blanc</i>	<i>Becarut</i>
<b>Estabilidad oxidativa</b> (h)	<b>2009</b>	10.9 ± 0.1 <sup>d</sup> (B)	17.4 ± 0.4 <sup>a</sup> (B)	14.2 ± 0.1 <sup>b</sup> (A)	12.4 ± 0.1 <sup>c</sup> (B)	11.0 ± 0.1 <sup>d</sup>	-
	<b>2010</b>	13.8 ± 0.1 <sup>d</sup> (A)	22.4 ± 0.3 <sup>a</sup> (A)	12.9 ± 0.1 <sup>d</sup> (B)	18.5 ± 0.7 <sup>b</sup> (A)	-	16.3 ± 0.2 <sup>c</sup>
<b>α-tocoferol</b> (mg/kg aceite)	<b>2009</b>	130.5 ± 1.5 <sup>c</sup> (A)	192.0 ± 4.0 <sup>b</sup> (A)	121.0 ± 4.0 <sup>c</sup> (A)	186.0 ± 0.0 <sup>b</sup> (B)	223.5 ± 1.5 <sup>a</sup>	-
	<b>2010</b>	128.5 ± 1.5 <sup>e</sup> (A)	185.0 ± 0.0 <sup>b</sup> (A)	138.0 ± 3.0 <sup>d</sup> (A)	216.5 ± 1.5 <sup>a</sup> (A)	-	158.5 ± 0.5 <sup>c</sup>
<b>Fenoles totales</b> (mg ácido cafeico/kg aceite)	<b>2009</b>	360.5 ± 8.5 <sup>b</sup> (A)	433.5 ± 4.5 <sup>a</sup> (B)	271.5 ± 0.5 <sup>c</sup> (A)	237 ± 1.0 <sup>d</sup> (B)	174.0 ± 1.50 <sup>e</sup>	-
	<b>2010</b>	200.0 ± 4.0 <sup>c</sup> (B)	515.5 ± 11.5 <sup>a</sup> (A)	166.5 ± 4.5 <sup>d</sup> (B)	290.5 ± 3.5 <sup>b</sup> (A)	-	220.0 ± 3.0 <sup>c</sup>

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre campañas.

Diferentes letras minúsculas diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre variedad

**Tabla 35A.** Perfil fenólico (expresado en mg/kg de aceite) determinado mediante HPLC-DAD de aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.

<i>Parámetro</i>	<i>Año</i>	<i>Negral</i>		<i>Verdal</i>		<i>Mançanenc</i>		<i>Grossal</i>		<i>Arbre Blanc</i>	<i>Becarut</i>
Hidroxitirosol	2009	1.47 ± 0.04 <sup>b</sup>	(A)	1.15 ± 0.03 <sup>c</sup>	(A)	0.36 ± 0.04 <sup>d</sup>	(A)	1.70 ± 0.03 <sup>a</sup>	(A)	1.41 ± 0.04 <sup>b</sup>	-
	2010	0.29 ± 0.05 <sup>c</sup>	(B)	0.55 ± 0.03 <sup>b</sup>	(B)	0.19 ± 0.04 <sup>d</sup>	(A)	0.61 ± 0.01 <sup>a</sup>	(B)	-	0.15 ± 0.02 <sup>d</sup>
Tirosol	2009	3.94 ± 0.07 <sup>a</sup>	(A)	1.87 ± 0.05 <sup>c</sup>	(A)	0.48 ± 0.02 <sup>d</sup>	(B)	4.08 ± 0.08 <sup>a</sup>	(A)	2.49 ± 0.02 <sup>b</sup>	-
	2010	2.52 ± 0.07 <sup>b</sup>	(B)	1.89 ± 0.05 <sup>c</sup>	(A)	0.71 ± 0.04 <sup>e</sup>	(A)	3.56 ± 0.03 <sup>a</sup>	(B)	-	1.44 ± 0.05 <sup>d</sup>
<b>Alcoholes fenólicos</b>	<b>2009</b>	<b>5.41 ± 0.11<sup>b</sup></b>	<b>(A)</b>	<b>3.02 ± 0.08<sup>d</sup></b>	<b>(A)</b>	<b>0.85 ± 0.06<sup>e</sup></b>	<b>(A)</b>	<b>5.78 ± 0.11<sup>a</sup></b>	<b>(A)</b>	<b>3.90 ± 0.03<sup>c</sup></b>	-
	<b>2010</b>	<b>2.82 ± 0.08<sup>b</sup></b>	<b>(B)</b>	<b>2.44 ± 0.07<sup>b</sup></b>	<b>(B)</b>	<b>0.89 ± 0.03<sup>e</sup></b>	<b>(A)</b>	<b>4.17 ± 0.04<sup>a</sup></b>	<b>(B)</b>	-	<b>1.59 ± 0.03<sup>d</sup></b>
Ácido vainílico	2009	0.51 ± 0.02 <sup>c</sup>	(A)	0.95 ± 0.02 <sup>a</sup>	(A)	0.39 ± 0.02 <sup>d</sup>	(A)	0.35 ± 0.01 <sup>d</sup>	(B)	0.58 ± 0.01 <sup>b</sup>	-
	2010	0.25 ± 0.02 <sup>c</sup>	(B)	0.45 ± 0.01 <sup>b</sup>	(B)	0.12 ± 0.01 <sup>d</sup>	(B)	0.57 ± 0.04 <sup>a</sup>	(A)	-	0.15 ± 0.01 <sup>d</sup>
Vainillina	2009	0.24 ± 0.02 <sup>d</sup>	(A)	0.63 ± 0.01 <sup>a</sup>	(A)	0.47 ± 0.01 <sup>b</sup>	(B)	0.23 ± 0.02 <sup>d</sup>	(B)	0.29 ± 0.01 <sup>c</sup>	-
	2010	0.41 ± 0.06 <sup>b</sup>	(A)	0.39 ± 0.01 <sup>b</sup>	(B)	0.64 ± 0.02 <sup>a</sup>	(A)	0.39 ± 0.01 <sup>b</sup>	(A)	-	0.36 ± 0.01 <sup>b</sup>
Ácido <i>p</i> -cumárico	2009	nd <sup>d</sup>	(B)	0.30 ± 0.02 <sup>b</sup>	(A)	0.11 ± 0.01 <sup>c</sup>	(A)	0.65 ± 0.00 <sup>a</sup>	(B)	0.63 ± 0.03 <sup>a</sup>	-
	2010	0.25 ± 0.02 <sup>c</sup>	(A)	0.17 ± 0.01 <sup>d</sup>	(B)	0.17 ± 0.02 <sup>d</sup>	(A)	1.75 ± 0.01 <sup>a</sup>	(A)	-	0.89 ± 0.02 <sup>b</sup>
<b>Ácidos fenólicos</b>	2009	0.74 ± 0.03 <sup>e</sup>	(A)	1.86 ± 0.04 <sup>a</sup>	(A)	0.97 ± 0.01 <sup>d</sup>	(A)	1.23 ± 0.03 <sup>c</sup>	(B)	1.49 ± 0.02 <sup>b</sup>	-
	2010	0.91 ± 0.10 <sup>c</sup>	(A)	0.99 ± 0.02 <sup>c</sup>	(B)	0.93 ± 0.05 <sup>c</sup>	(A)	2.71 ± 0.09 <sup>a</sup>	(A)	-	1.38 ± 0.02 <sup>b</sup>

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre campañas.

Diferentes letras minúsculas diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre variedades

**Tabla 35B.** Perfil fenólico (expresado en mg/kg de aceite) determinado mediante HPLC-DAD de aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.

Parámetro	Año	Negral		Verdal		Mançanenc		Grossal		Arbre Blanc		Becarut
3,4-DHPEA-AC	2009	60.93 ± 0.58 <sup>a</sup>	(A)	31.60 ± 4.79 <sup>b</sup>	(A)	67.81 ± 0.20 <sup>a</sup>	(B)	nd <sup>d</sup>	(A)	10.11 ± 0.58 <sup>c</sup>		
	2010	52.31 ± 0.29 <sup>b</sup>	(B)	14.79 ± 0.28 <sup>c</sup>	(A)	101.80 ± 1.59 <sup>a</sup>	(A)	nd <sup>e</sup>	(A)	-		3.60 ± 0.15 <sup>d</sup>
3,4-DHPEA-EDA	2009	866.74 ± 24.66 <sup>b</sup>	(A)	1200.92 ± 34.19 <sup>a</sup>	(B)	529.85 ± 1.52 <sup>c</sup>	(A)	225.85 ± 5.36 <sup>d</sup>	(B)	235.18 ± 0.04 <sup>d</sup>		-
	2010	614.42 ± 25.32 <sup>b</sup>	(B)	1376.71 ± 10.26 <sup>a</sup>	(A)	435.84 ± 9.87 <sup>c</sup>	(B)	608.39 ± 4.77 <sup>b</sup>	(A)	-		490.97 ± 17.04 <sup>c</sup>
3,4-DHPEA-EA	2009	168.65 ± 5.12 <sup>c</sup>	(A)	544.59 ± 15.83 <sup>a</sup>	(B)	107.21 ± 8.24 <sup>d</sup>	(A)	288.69 ± 16.99 <sup>b</sup>	(A)	198.49 ± 3.30 <sup>c</sup>		-
	2010	94.86 ± 7.67 <sup>c</sup>	(B)	640.79 ± 1.83 <sup>a</sup>	(A)	87.74 ± 0.90 <sup>c</sup>	(A)	316.86 ± 16.02 <sup>b</sup>	(A)	-		93.80 ± 0.17 <sup>c</sup>
<i>p</i> -HPEA-EDA	2009	80.89 ± 0.94 <sup>d</sup>	(A)	232.75 ± 4.55 <sup>a</sup>	(A)	101.85 ± 0.46 <sup>c</sup>	(A)	127.13 ± 2.54 <sup>b</sup>	(B)	77.59 ± 0.03 <sup>d</sup>		-
	2010	98.30 ± 6.30 <sup>d</sup>	(A)	245.85 ± 2.55 <sup>a</sup>	(A)	65.75 ± 1.05 <sup>e</sup>	(B)	190.50 ± 1.60 <sup>b</sup>	(A)	-		138.35 ± 4.65 <sup>c</sup>
<i>p</i> -HPEA-EA	2009	95.38 ± 2.03 <sup>a</sup>	(A)	83.41 ± 2.37 <sup>b</sup>	(B)	8.16 ± 0.12 <sup>e</sup>	(A)	28.21 ± 0.95 <sup>c</sup>	(B)	16.48 ± 0.38 <sup>d</sup>		-
	2010	20.48 ± 3.02 <sup>d</sup>	(B)	121.63 ± 0.27 <sup>a</sup>	(A)	6.08 ± 0.79 <sup>e</sup>	(A)	92.44 ± 2.93 <sup>b</sup>	(A)	-		33.25 ± 0.66 <sup>c</sup>
Derivados secoiridoides	2009	1272.57 ± 33.32 <sup>b</sup>	(A)	2093.26 ± 61.72 <sup>a</sup>	(B)	814.87 ± 6.19 <sup>c</sup>	(A)	669.87 ± 23.93 <sup>d</sup>	(B)	537.85 ± 4.26 <sup>e</sup>		-
	2010	880.38 ± 42.02 <sup>c</sup>	(B)	2399.77 ± 14.09 <sup>a</sup>	(A)	697.18 ± 10.82 <sup>d</sup>	(B)	1208.18 ± 25.31 <sup>b</sup>	(A)	-		759.96 ± 20.72 <sup>d</sup>

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre campañas.

Diferentes letras minúsculas diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre variedades

**Tabla 35C.** Perfil fenólico (expresado en mg/kg de aceite) determinado mediante HPLC-DAD de aceites de oliva monovarietales de las campañas 2009/10 y 2010/11.

<i>Parámetro</i>	<i>Año</i>	<i>Negral</i>		<i>Verdal</i>		<i>Mançanenc</i>		<i>Grossal</i>		<i>Arbre Blanc</i>	<i>Becarat</i>
<b>Lignanos</b>	<b>2009</b>	<b>13.39 ± 0.31<sup>c</sup></b>	<b>(B)</b>	<b>34.63 ± 0.95<sup>a</sup></b>	<b>(A)</b>	<b>14.61 ± 0.08<sup>c</sup></b>	<b>(A)</b>	<b>22.16 ± 0.40<sup>b</sup></b>	<b>(B)</b>	<b>11.62 ± 0.06<sup>d</sup></b>	-
	<b>2010</b>	<b>17.35 ± 0.75<sup>c</sup></b>	<b>(A)</b>	<b>34.15 ± 0.05<sup>a</sup></b>	<b>(A)</b>	<b>10.70 ± 0.50<sup>d</sup></b>	<b>(B)</b>	<b>33.10 ± 0.10<sup>a</sup></b>	<b>(A)</b>	-	<b>19.60 ± 0.10<sup>b</sup></b>
Luteolina	2009	2.27 ± 0.05 <sup>c</sup>	(B)	3.46 ± 0.06 <sup>b</sup>	(A)	1.48 ± 0.03 <sup>d</sup>	(A)	3.58 ± 0.03 <sup>a</sup>	(A)	2.18 ± 0.01 <sup>c</sup>	-
	2010	2.63 ± 0.04 <sup>a</sup>	(A)	1.98 ± 0.01 <sup>bc</sup>	(B)	1.17 ± 0.07 <sup>d</sup>	(B)	2.15 ± 0.13 <sup>b</sup>	(B)	-	1.86 ± 0.09 <sup>c</sup>
Apigenina	2009	0.82 ± 0.02 <sup>d</sup>	(B)	0.95 ± 0.04 <sup>c</sup>	(A)	0.61 ± 0.03 <sup>e</sup>	(A)	2.11 ± 0.01 <sup>a</sup>	(A)	1.80 ± 0.01 <sup>b</sup>	-
	2010	1.34 ± 0.03 <sup>a</sup>	(A)	0.51 ± 0.04 <sup>d</sup>	(B)	0.51 ± 0.01 <sup>d</sup>	(A)	1.00 ± 0.03 <sup>b</sup>	(B)	-	0.82 ± 0.02 <sup>c</sup>
<b>Flavonoides</b>	<b>2009</b>	<b>3.10 ± 0.07<sup>d</sup></b>	<b>(B)</b>	<b>4.41 ± 0.04<sup>b</sup></b>	<b>(A)</b>	<b>2.08 ± 0.05<sup>e</sup></b>	<b>(A)</b>	<b>5.69 ± 0.02<sup>a</sup></b>	<b>(A)</b>	<b>3.98 ± 0.12<sup>c</sup></b>	-
	<b>2010</b>	<b>3.97 ± 0.07<sup>a</sup></b>	<b>(A)</b>	<b>2.49 ± 0.01<sup>c</sup></b>	<b>(B)</b>	<b>1.68 ± 0.08<sup>d</sup></b>	<b>(B)</b>	<b>3.15 ± 0.16<sup>b</sup></b>	<b>(B)</b>	-	<b>2.68 ± 0.10<sup>c</sup></b>
<b>Suma fenoles (HPLC)</b>	<b>2009</b>	<b>1295.20 ± 33.21<sup>b</sup></b>	<b>(A)</b>	<b>2137.18 ± 62.75<sup>a</sup></b>	<b>(B)</b>	<b>833.36 ± 6.26<sup>c</sup></b>	<b>(A)</b>	<b>704.72 ± 24.26<sup>d</sup></b>	<b>(B)</b>	<b>558.83 ± 4.27<sup>e</sup></b>	-
	<b>2010</b>	<b>905.41 ± 43.01<sup>c</sup></b>	<b>(B)</b>	<b>2439.84 ± 14.24<sup>a</sup></b>	<b>(A)</b>	<b>711.36 ± 11.47<sup>d</sup></b>	<b>(B)</b>	<b>1251.30 ± 25.22<sup>b</sup></b>	<b>(A)</b>	-	<b>785.20 ± 20.71<sup>d</sup></b>

Diferentes letras mayúsculas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre campañas.

Diferentes letras minúsculas diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre variedades

En primer lugar, desde el punto de vista cualitativo, todos los aceites tuvieron un perfil fenólico similar. Los compuestos identificados y cuantificados fueron los mismos en todas las muestras, excepto en los aceites de *Grossal* y *Becarut*, en las que no se detectó el compuesto 3,4-DHPEA-AC.

Sin embargo, sí se observan importantes diferencias en la cuantificación de los compuestos fenólicos, tanto entre variedades como en campañas. Los compuestos cuantificados en las muestras se han clasificado en cinco grupos: secoiridoides y derivados, alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos, lignanos y flavonoides. Los compuestos secoiridoides y derivados fue el grupo mayoritario en todos los aceites analizados, representando el 95-98% del contenido fenólico total.

Los derivados secoiridoides, aunque están presentes en el fruto, se forman mayoritariamente durante el proceso de extracción del aceite a partir de oleuropeína y ligustrósido de la oliva. Los derivados secoiridoides cuantificados fueron 3,4-DHPEA-EA, 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EA, *p*-HPEA-EDA y 3,4-DHPEA-AC. En todos los aceites, el compuesto secoiridoide mayoritario fue el 3,4-DHPEA-EDA, excepto en el aceite de *Grossal* de 2009, en el que el mayoritario fue 3,4-DHPEA-EA. El aceite de *Verdal* fue el más rico en estos dos compuestos en ambas campañas, con 1201 y 1377 mg 3,4-DHPEA-EDA/kg y con 545 y 641 mg 3,4-DHPEA-EA/kg en 2009 y 2010, respectivamente. En todos los aceites, más del 75% del contenido en derivados secoiridoides estuvo formado por 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA y 3,4-DHPEA-AC, en cuya molécula se encuentra el hidroxitirosol. Se trata de un compuesto en cuya estructura hay dos grupos hidroxilo unidos al anillo aromático, posee una mayor actividad antioxidante que los compuestos que contienen tirosol, que solo poseen un grupo hidroxilo unido al anillo aromático (Baldioli et al., 1996; Carrasco-Pancorbo et al., 2005; Gennaro et al., 1998; Suárez et al., 2009). Por tanto, cuánto más ricos son los aceites en este tipo de compuestos, más capacidad antioxidante muestran. Además, algunos estudios *in vitro* apuntan que los compuestos 3,4-DHPEA-EDA y 3,4-DHPEA-EA protegen los glóbulos rojos de la hemólisis oxidativa (Paiva-Martins, 2009, 2010) y los compuestos 3,4-DHPEA-EA e hidroxitirosol han sido asociados con la inhibición neurodegenerativa, y a consecuencia, con la reducción del riesgo de sufrir Alzheimer o demencias relacionadas (Daccache et al., 2011). No obstante, aunque los compuestos derivados de tirosol tienen una menor capacidad antioxidante, también tienen un efecto positivo sobre la salud humana. En este sentido, el aceite de *Verdal* sería interesante por su alto contenido en *p*-HPEA-EDA o también llamado oleocantal, al que se le ha atribuido capacidad antiinflamatoria similar a la del ibuprofeno (Beauchamp et al., 2005). Los aceites de *Negral* en 2009 y de *Grossal* en 2010 también mostraron altos contenidos en este compuesto.

Es difícil comparar los resultados de nuestros resultados con los de aceites de otros orígenes y variedades, dado que las formas en que suelen estar expresados en la bibliografía es muy heterogénea. No obstante, comparando con los aceites de *Arbequina* de les Garrigues que nuestro grupo de investigación ha caracterizado durante muchas campañas se puede afirmar

que el aceite de la variedad *Verdal* contiene muchos más fenoles que cualquier aceite de *Arbequina* de la zona, incluso que los aceites de frutos de secano de principio de campaña, que son los más ricos en estos compuestos. El resto de aceites presentan un contenido fenólico similar o menor.

#### 6.5.5. Estabilidad oxidativa

La estabilidad oxidativa determinada mediante el método Rancimat (Tabla 34), a pesar de que no es un método oficial y recibe muchas críticas, se utiliza mucho para la estimación de la vida útil potencial de los aceite y goza de un excelente reconocimiento a nivel industrial. En el presente trabajo, la estabilidad ha presentado diferencias entre los aceites de las diferentes variedades. Como era de esperar, los aceites de *Verdal* fueron los más estables en ambas campañas, con 17.4 horas en 2009 y 22.6 horas en 2010. Morelló et al. (2004) determinaron la estabilidad oxidativa de aceites de oliva de la variedad *Arbequina* de les Garrigues por el método Rancimat en unos aceite extraídos en planta piloto y para frutos con un índice de maduración fue 4, la estabilidad Rancimat del aceite fue de 21.7 horas; sin embargo, en aceites comerciales analizados en los Servicios Científico-Técnicos de la Universitat de Lleida, la estabilidad de los aceites de *Arbequina* es algo inferior a la de los aceites de planta piloto, siendo frecuentes los valores en un rango entre 10 y 16 horas (datos internos). La estabilidad del aceite de *Verdal* es por tanto más elevada del valor que habitualmente tienen otros aceites de la zona de otras variedades.

La estabilidad de los aceites está altamente afectada por el contenido en fenoles. En estos aceites el coeficiente de correlación ha sido 0.7442 ( $P=0.0215$ ), menor que en otros estudios centrados en aceites con un perfil de ácidos grasos más homogéneo o con similitud en el contenido de otros antioxidantes. Aún así, el coeficiente es suficientemente alto como para validar el peso de los fenoles sobre la resistencia al enranciamiento en los aceites.

#### 6.5.6. Tocoferol

El contenido en tocoferoles contribuye a la estabilidad del aceite (Ruiz-Lopez et al., 1995). En el presente estudio, se determinó la concentración de  $\alpha$ -tocoferol (Tabla 34) en los aceites. Los aceites con una mayor cantidad de tocoferol fueron los de las variedades *Arbre Blanc*, *Grossal* y *Verdal*, con valores entre 185 y 224 mg/kg.

En un estudio de García et al. (2003) determinaron los valores medios en  $\alpha$ -tocoferol de otros aceites monovarietales españoles, como *Picual* (223.4 mg/kg), *Arbequina* (174.1 mg/kg), *Hojiblanca* (252.1 mg/kg) y *Cornicabra* (191.2 mg/kg). Morelló et al. (2004) estudiaron el contenido en  $\alpha$ -tocoferol en aceites de tres variedades diferentes cultivadas en Catalunya, realizando un seguimiento durante la maduración. El contenido en  $\alpha$ -tocoferol descendió a medida que las olivas maduraban, y sus valores fueron 123-144 mg/kg en aceites de la

variedad *Arbequina*, 135-190 mg/kg en los de la variedad *Farga* y 154-246 mg/kg en los de la variedad *Morrut*.

Como se ha comentado anteriormente, hay varios parámetros que determinan la estabilidad oxidativa de un aceite, lo que está relacionado con la capacidad antioxidante que tendrá ese aceite. Aparicio et al. (1999) demostraron que en los aceites de las variedades *Hojiblanca* y *Picual*, los compuestos fenólicos contribuyeron un 51% a la estabilidad del aceite, la composición en ácidos grasos un 24% y en menor porcentaje contribuyó el contenido en  $\alpha$ -tocoferol, los carotenoides y las clorofilas. En la misma línea, Ceci y Carelli (2010), después de haber estudiado la composición de 58 aceites de oliva virgen de diferentes variedades y zonas de cultivo argentinas durante cuatro años, sugirieron que era la composición en ácidos grasos y el contenido fenólico los principales factores que determinaban la estabilidad de los aceites. También Morelló et al. (2006) ajustaron la estabilidad del aceite a los parámetros de concentración en 3,4-DHPEA-EDA,  $\alpha$ -tocoferol, peróxidos y ácido linoleico. En nuestro estudio, la correlación entre tocoferol y estabilidad oxidativa es menor que la presentada con los fenoles, siendo  $r=0.588$ , aunque con una significación de 0.09.

El aceite de la variedad *Negral*, en 2009 fue el que mostró una menor estabilidad (10.9 horas), y sin embargo, contenía doble concentración de compuestos fenólicos que el aceite de *Arbre Blanc* en 2009, que fue igual de estable (11.0 horas). En este caso, *Arbre Blanc* era más rico en el contenido en  $\alpha$ -tocoferol (224 frente a 130 mg/kg), en el contenido en  $\beta$ -caroteno (3.13 frente a 1.18 mg/kg) y mostraba un mayor ratio oleico/linoleico (12.6 frente a 4.3). Por tanto, estos parámetros pudieron ser los responsables de la alta estabilidad del aceite de *Arbre Blanc*.

#### **6.5.7. Perfil sensorial**

De acuerdo con la evaluación sensorial de los aceites que se expone a continuación, alguno de estos aceites presenta unas notas aromáticas muy interesantes y podrían llegar a ser envasados como aceites de oliva virgen extra monovarietales; sin embargo, otros son excesivamente desequilibrados. No obstante, sería necesaria una estrategia de presentación en el mercado que debería estar apoyada por un estudio plurianual para verificar que las características responden a un tipo particular de aceite y que éste se podría ofrecer cada año. No obstante, sí que estos aceites pueden ser utilizados en *coupages* con otros aceites para mejorar sus características sensoriales. Todos ellos muestran diferentes características que el productor podría utilizar para promover o atenuar los atributos de sus aceites. Además, en el caso de aceites extraídos de olivas muy maduras recolectadas al final de campaña, que se caracterizan por ser aceites muy planos, la adición de estos aceites podría mejorar su carácter verde o su amargor y ayudar a producir un aceite de mayor calidad durante toda la campaña.

La excepción es el aceite de *Verdal*, que no debería ser envasado como monovarietal debido a su alto amargor. Este amargor es consecuencia de su alto contenido en compuestos fenólicos,

principalmente 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA y *p*-HPEA-EDA y *p*-HPEA-EA (García et al., 2001, Gutiérrez-Rosales et al., 2003; Kiritsakis et al., 1998a). Además, en cata el atributo picante ha sido considerado muy intenso, lo que se explica por la riqueza en el denominado oleocantal (*p*-HPEA-EDA). Sin embargo, este alto contenido fenólico podría mejorar los atributos y la estabilidad en el *coupage* con otros aceites, prolongando su vida útil.

A continuación se presenta la evaluación sensorial realizada para los aceites.

1. Aceite de *Arbre Blanc* (2009/10):

Frutado verde de intensidad medio-alto. Amargo medio-alto. Picante medio. El aceite es muy aromático, detectándose claramente los anisados, hinojo, menta y albahaca, en general rico en matices aromáticos que recuerdan las plantas aromáticas; en boca es almendrado y es suave y equilibrado. El aceite obtenido en esta experiencia reproduce muy bien la fase olfativa, pero en boca tiene un punto de alcachofa y de nuez verde que lo hace más vegetal.

2. Aceite de *Becarut* (2010/11):

Frutado verde de intensidad medio-alto. Amargo medio-bajo. Picante medio-alto. Aceite intensamente herbáceo con almendra verde, muy complejo y persistente.

3. Aceite de *Verdal* (2010/11):

Frutado verde Intenso. Amargor muy alto. Picante alto. Aceite extremadamente amargo y desequilibrado, sensaciones de hoja y de madera verde.

4. Aceite de *Negral* (2010/11):

Frutado verde medio-alto. Amargo medio. Picante bajo. Aceite muy equilibrado con notas claras de hinojo y regaliz, muy elegante.

5. Aceite de *Grossal* (2010/11):

Frutado maduro de intensidad media. Amargo medio-bajo. Picante muy bajo. Sensaciones de fruta madura en nariz que se confirman en boca. Sabores de nuez y dulce de membrillo.

6. Aceite de *Mançanenc* (2010/11):

Frutado medio de oliva casi madura. Amargo medio. Picante muy bajo. Notas de higuera con un perfil andaluz.

### 6.5.8. Conclusión

Los aceites de oliva monovarietales estudiados, aunque por el valor de los parámetros de calidad podrían ser considerados todos aceites de oliva virgen extra, presentan determinadas particularidades que los hacen idóneos para ser considerados en la preparación de aceites de *coupages* con aceites de *Arbequina*. Teniendo en cuenta que la zona de producción de Les Garrigues tiene como referencia comercial un tipo particular de aceite de oliva virgen de la variedad *Arbequina* que en determinados años puede tener carencias de pigmentos, de compuestos fenólicos o un exceso de polinsaturados, se recomiendan como variedades mejorantes la variedad *Verdal* por su riqueza en fenoles y pigmentos, así como por su frutado verde y la variedad *Arbre Blanc*, con un perfil de ácidos grasos más rico en oleico que los aceites clásicos de *Arbequina*, rica en pigmentos y con delicadez aromática. No obstante, se trata de variedades poco estudiadas y sería adecuado hacer un seguimiento completo a lo largo de un mayor número de cosechas que permita conocer la respuesta de estas variedades a los cambios climáticos.



## 7. CONCLUSIONES

## 7. CONCLUSIONES

### Estudios en frutos

- Se ha desarrollado la metodología para la determinación de fenoles en fruto por HPLC-MS/MS, en particular, se ha optimizado las condiciones para la identificación de los compuestos de la ruta biosintética de los compuestos secoiridoides.
- Se confirma que la biosíntesis de la oleuropeína en la oliva sigue la ruta propuesta por Damtoft (1993, 1995a) en los frutos de las variedades *Arbequina* y *Hojiblanca*, siendo sus compuestos precursores la 7-cetologanina, oleósido-11-metil-éster, tirosol y ligustrósido.
- La enzima  $\beta$ -glucosidasa actúa sobre los compuestos fenólicos glucosilados, modulando sus concentraciones y las de sus formas agliconas durante la maduración de la oliva. Los principales compuestos resultantes de la acción de la enzima son el ácido elenólico y las formas agliconas de oleuropeína y ligustrósido.
- La actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa es mayor en los frutos de la variedad *Arbequina* que en los frutos de la variedad *Hojiblanca*.
- El metabolismo de la oleuropeína presenta diferencias según la variedad. En las olivas de la variedad *Arbequina*, las rutas biosintéticas son activas durante un tiempo más largo que en las de la variedad *Hojiblanca*, resultando frutos con mayor contenido fenólico a lo largo de todo el ciclo de maduración.
- No se han observado diferencias significativas en el contenido en secoiridoides y derivados, flavonoides y lignanos a lo largo de la maduración entre las olivas de la variedad *Arbequina* entre frutos de cultivo ecológico y de cultivo convencional en Lleida.
- La ruta de biosíntesis de oleuropeína está muy activa en el momento de desarrollo del fruto, por lo que hay un aumento en la concentración de oleuropeína. Posteriormente, esta capacidad de biosíntesis disminuye a la vez que aumenta la actividad de la enzima  $\beta$ -glucosidasa, por lo que el contenido en oleuropeína disminuye en el fruto.
- La localización del cultivo influye en el contenido en secoiridoides y derivados en la oliva, siendo mayor el contenido en el cultivo de *Arbequina* en Lleida que en Sevilla. Esto sugiere que las olivas de *Arbequina* cultivada en Lleida tienen una mayor capacidad de biosíntesis de fenoles.

- Los lignanos presentan un máximo de concentración antes del endurecimiento del hueso, momento a partir del cual su concentración disminuye. Se ha observado un segundo máximo en estadios intermedios del ciclo de maduración.
- La síntesis de flavonoides no se inicia hasta que el hueso está formado, lo que podría relacionarla con la síntesis de lignanos.
- El estudio de dos campañas sucesivas muestra que las diferentes condiciones agroclimáticas de cada campaña oleícola han influido en el contenido fenólico de olivas de la variedad *Arbequina* de una manera más determinante que el tipo de cultivo ecológico o convencional.
- Se ha localizado la enzima  $\beta$ -glucosidasa en diferentes partes de las células de la oliva según su estado de desarrollo. Se ha comprobado que cuando se está formando el hueso, la enzima se encuentra mayoritariamente localizada en la zona central del fruto, lo que indicaría que participa en el transporte de los monolignoles que se transforman en lignina para formar el hueso. Cuando el hueso ya se ha endurecido, también se localiza enzima en las células de la pulpa de la oliva, estando distribuida en la pulpa por lo que podrá activarse en los mecanismos de defensa contra agentes externos.

#### **Estudios en aceites**

- Los aceites ecológicos comerciales de la variedad *Arbequina* comercializados por empresas de la provincia de Lleida durante dos campañas sucesivas han presentado una composición comparable a sus homólogos de agricultura convencional.
- No hay un tipo de aceite ecológico de Lleida. Las condiciones microclimáticas y agronómicas de la plantación, así como la tecnología y las condiciones utilizadas en las diferentes almazaras, son factores determinantes en la calidad de los aceites obtenidos, detectándose grandes diferencias entre los orígenes de los aceites.
- Las diferencias entre campañas en los aceites de *Arbequina* de producción ecológica no son tan grandes como cabría esperar según los resultados de los estudios en fruto, en que los contenidos fenólicos en dos campañas sucesivas fueron muy diferentes. Esto podría ser debido a que las almazaras tipifican sus aceites para presentarlos con unas características propias de su marca.
- Se han caracterizado los aceites de producción ecológica de 6 variedades en retroceso durante dos campañas oleícolas.
- De entre los aceites de producción ecológica estudiados, se recomendarían los de la variedad *Verdal* para utilizarlos en *coupage* con los de la variedad *Arbequina* por su

---

riqueza en fenoles y pigmentos, y los de la variedad *Arbre Blanc* por su riqueza en ácido oleico, pigmentos y su delicadez aromática.

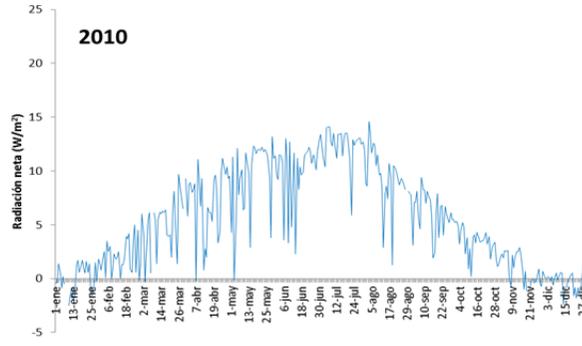
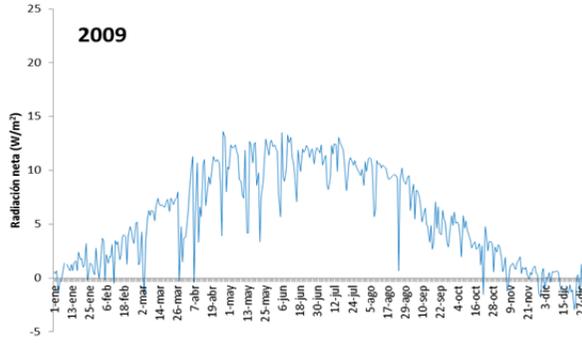
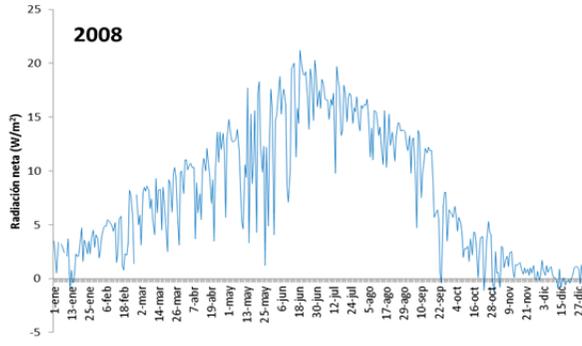
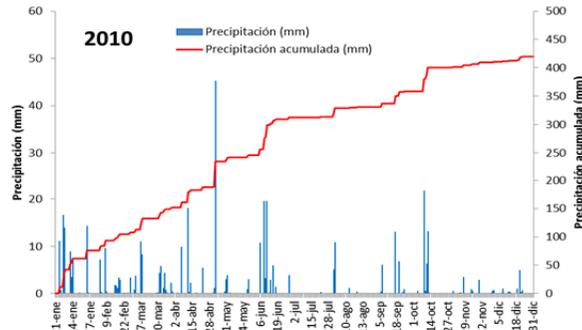
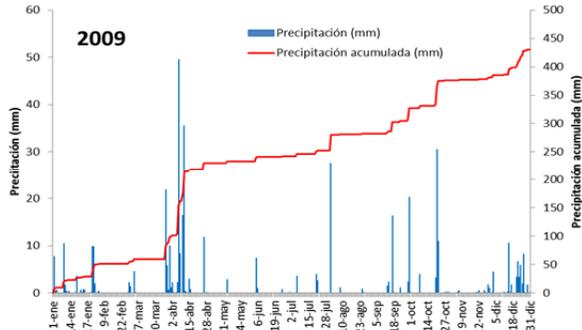
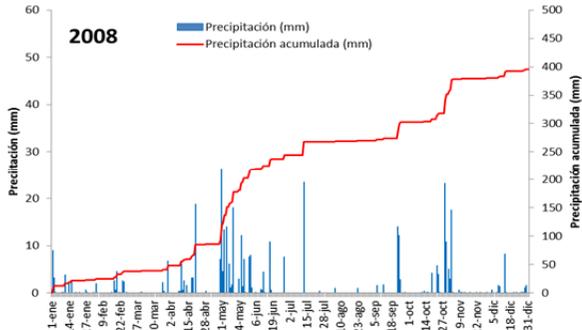
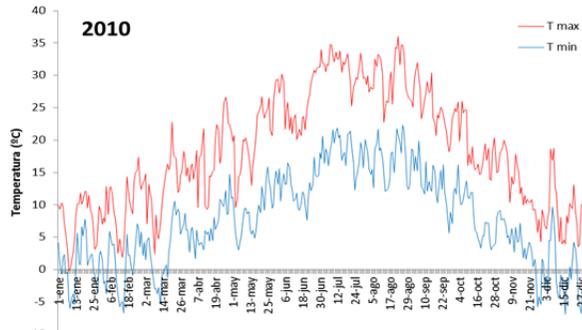
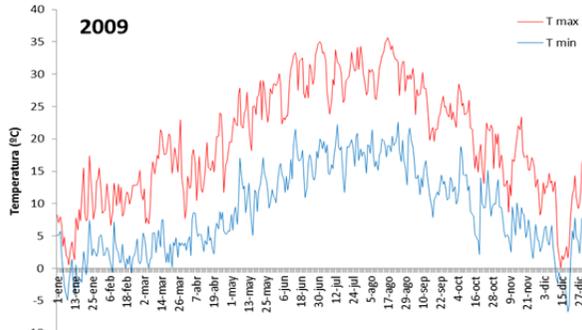
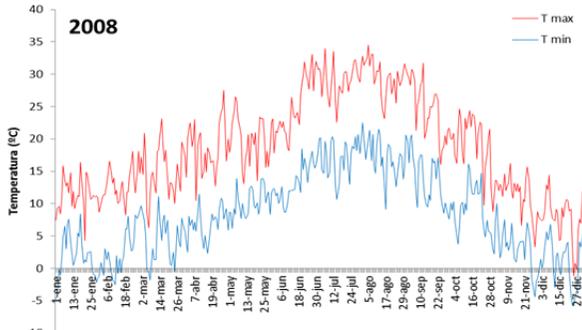
- Se confirma la gran influencia que la variedad de olivas ejerce sobre el perfil de ácidos grasos, siendo éste un parámetro a tener en cuenta a la hora de seleccionar variedades para recuperar.
- La interacción campaña\*perfil de ácidos grasos no ha resultado significativa en un estudio de 2 campañas y 10 variedades, por lo que las variedades más productoras de ácido oleico, lo han sido en las dos campañas.
- Es difícil encontrar la variedad que proporcione el aceite ideal. Del estudio de 19 aceites de variedades en retroceso, sólo ha habido dos variedades en las que los resultados de los parámetros físico-químicos y la evaluación sensorial presentaban valores muy recomendables.
- De 19 variedades estudiadas en el estudio para la recuperación de variedades, 7 presentaron un perfil de ácidos grasos poco adecuado, con una baja relación PUFA/MUFA, por lo que al ser este perfil un parámetro intrínseco a la variedad y la zona de cultivo, si en un estudio plurianual se confirmase esta tendencia, se consideraría poco recomendable su recuperación.
- Únicamente se ha podido seleccionar dos variedades en la campaña 2011/12 de las que sus aceites han presentado excelente calidad, tanto fisicoquímica como sensorial.





## 8. ANEJO

Tabla aneja. Datos meteorológicos de la estación de La Granadella de los años 2008, 2009 y 2010.







## 9. BIBLIOGRAFÍA

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Estatal de Meteorología (2012). Agencia Estatal de Meteorología, AEMET (en línea). Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Gobierno de España. (Consultado: 13 febrero 2012). Disponible en: [www.aemet.es](http://www.aemet.es).
- Aguilera, M. P., Beltrán, G., Ortega, D., Fernández, A., Jiménez, A., Uceda, M. (2005). Characterisation of virgin olive oil of Italian olive cultivars: 'Frantoio' and 'Leccino', grown in Andalusia. *Food Chemistry*, 89 (3), 387-391.
- Alba Mendoza, J., Hidalgo Casado, F., Ruiz Gómez, M.A., Martínez Roman, F., Moyano Pérez, M.J., Cert Ventulá, A., Pérez Camino, M.C., Y Ruiz Méndez, M.V. (1996). Characteristics of the olive oil obtained with the first and second centrifugation. *Grasas y Aceites*, 47 (3), 163-181.
- Allalout, A., Krichene, D., Methemi, K., Taamalli, A., Oueslati, I., Daoud, D., Zarrouk, M. (2009). Characterization of virgin olive oil from Super Intensive Spanish and Greek varieties grown in northern Tunisia. *Scientia Horticulturae*, 120 (1), 77-83.
- Amiot, M., Fleuriet, A., Macheix, J. (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 34 (5), 823-826.
- Amiot, M., Fleuriet, A., Macheix, J. (1989). Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, 28 (1), 67-69.
- Amirante, R., Cini, E., Montel, G.L., Pasqualone, A. (2001). Influencia del batido y de los parámetros de extracción en la calidad del aceite de oliva virgen. *Grasas y Aceites*, 52 (3-4), 198-201.
- Anastasopoulos, E., Kalogeropoulos, N., Kaliora, A. C., Kountouri, A., Andrikopoulos, N. K. (2011). The influence of ripening and crop year on quality indices, polyphenols, terpenic acids, squalene, fatty acid profile, and sterols in virgin olive oil (Koroneiki cv.) produced by organic versus non-organic cultivation method. *International Journal of Food Science and Technology*, 46 (1), 170-178.
- Andersen, O.M., Markham, K.R. (2006). *Flavonoids. Chemistry, biochemistry and applications*. O.M. Andersen y K.R. Markham (Eds.). New York, USA: CRC Press.
- Andjelkovic, M., Van Camp, J., Pedra, M., Renders, K., Socaciu, C., Verhé, R. (2008). Correlations of the phenolic compounds and the phenolic content in some Spanish and French olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (13), 5181-5187.

- Angerosa, F., Giacinto, L., Solinas, M. (1992). Influence of *Dacus oleae* infestation on flavor of oils, extracted from attacked olive fruits, by HPLC and HRGC analyses of volatile compounds. *Grasas y Aceites*, 43 (3), 134-142.
- Angerosa, F., Di Giovacchino, L. (1996). Natural antioxidants of virgin olive oil obtained by two and tri-phase centrifugal decanters. *Grasas y Aceites*, 47 (4), 247-254.
- Anniva, C., Grigoriadou, D., Psomiadou, E., Tsimidou, M. Z. (2006). Pheophytin  $\alpha$  degradation products as useful indices in the quality control of virgin olive oil. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83 (4), 371-375.
- Aparicio, R., Harwood, J. (2003). *Manual del aceite de oliva*. Madrid, España: Editorial Mundi-Prensa.
- Aparicio, R., Luna, G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104 (9-10), 614-627.
- Aparicio, R., Morales, M. T. (1998). Characterization of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (3), 1116-1122.
- Aparicio, R., Roda, L., Albi, M. A., Gutiérrez, F. (1999). Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (10), 4150-4155.
- Aparicio-Ruiz, R., Gandul-Rojas, B., Roca, M. (2009). Pigment profile in non-Spanish olive varieties (*Olea europaea* L. var. Coratina, Frantoio, and Koroneiki). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (22), 10831-10836.
- Aranda, F., Gómez-Alonso, S., Rivera Del Álamo, R.M., Salvador, M.D., Fregapane, G. (2004). Triglyceride, total and 2-position fatty acid composition of Cornicabra virgin olive oil: Comparison with other Spanish cultivars. *Food Chemistry*, 86 (4), 485-492.
- Aranda Palomo, F. (2003). *Composición química y calidad del aceite de oliva virgen Cornicabra*. M.D. Salvador Moya y G. Fregapane Quadri (tut.). Tesis doctoral. Universidad de Castilla-La Mancha, Facultad de Ciencia Químicas.
- Artajo, L.S. (2006). Phenolic Compounds: Their Role During Olive Oil Extraction and in Flaxseed - Transfer and Antioxidant Function. M.J. Motilva Casado y M.P. Romero Fabregat (tut.). Tesis doctoral. Universitat de Lleida, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària.

- Artajo, L.S., Romero, M.P., Morelló, J.R., Motilva, M.J. (2006). Enrichment of refined olive oil with phenolic compounds: evaluation of their antioxidant activity and their effect on the bitter index. ). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (16), 6079-6088.
- Asami, D. K., Hong, Y., Barrett, D. M., Mitchell, A. E. (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (5), 1237-1241.
- Baccouri, O., Guerfel, M., Baccouri, B., Cerretani, L., Bendini, A., Lercker, G., Zarrouk, M., Daoud Ben Miled, D. (2008). Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry*, 109 (4), 743-754.
- Baccouri, B., Temime, S. B., Taamalli, W., Daoud, D., M'Sallem, M., Zarrouk, M. (2007). Analytical characteristics of virgin olive oils from two new varieties obtained by controlled crossing on Meski variety. *Journal of Food Lipids*, 14 (1), 19-34.
- Baiano, A., Gambacorta, G., Terracone, C., Previtali, M.A., La Notte, E. (2009). Characteristics of drupes, phenolic content and antioxidant capacity of Italian olive fruits. *Journal of Food Lipids*, 16 (2), 209-226.
- Baldioli, M., Servili, M., Perretti, G., Montedoro, G.F. (1996). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73 (11), 1589-1593.
- Barranco, D. (2004). Variedades y patrones. En: D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (Eds.) *El cultivo del olivo* (5ª rev y ampl ed.), Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Barrett, D. M., Weakley, C., Diaz, J. V., Watnik, M. (2007). Qualitative and nutritional differences in processing tomatoes grown under commercial organic and conventional production systems. *Journal of Food Science*, 72 (9), C441-C451.
- Beauchamp, G. K., Keast, R. S. J., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Lee, C. H., Smith, A. B., Breslin, P. A. S. (2005). Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*, 437 (7055), 45-46.
- Belitz, H. D., Grosch, W. (1988). *Química de los alimentos*. Zaragoza, España: Acribia.
- Beltrán, G., Aguilera, M. P., Del Rio, C., Sánchez, S., Martínez, L. (2003). Influencia del proceso de maduración del fruto de diferentes variedades de olivo sobre el contenido de antioxidantes naturales del aceite de oliva virgen. En: C. Merodio y M. I. Escribano (Eds.)

- Maduración y post-recolección de frutos y hortalizas* (1ª ed., pp. 99-104). Madrid, España: CSIC Biblioteca de Ciencias.
- Beltrán, G., Aguilera, M.P., Del Rio, C., Sánchez, S., Martínez, L. (2005), Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chemistry*, 89 (2), 207-215.
- Beltrán, G., Del Rio, C., Sánchez, S., Martínez, L. (2004). Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from cv. Picual. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (11), 3434-3440.
- Beltrán, G., Jiménez, A., del Rio, C., Sánchez, S., Martínez, L., Uceda, M., Aguilera, M.P. (2010). Variability of vitamin E in virgin olive oil by agronomical and genetic factors. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23 (6), 633-639.
- Bendini, A., Cerretani, L., Poerio, A., Bonoli-Carbognin, M., Gallina Toschi, T., Lercker, G. (2006). Oxidative stability of virgin olive oils, produced by organic, integrated or conventional agricultural methods. *Progress in Nutrition*, 8 (2), 104-115.
- Ben-Gal, A., Yermiyahu, U., Zipori, I., Presnov, E., Agam, N., Dag, A., Kerem Z., Basheer, L., Hanoch, L. (2011). Determining irrigation levels for a modern Israeli olive orchard: Towards maximum yields of high quality oil. *Acta Horticulturae*, 888, 47-52.
- Benito, M., Lasa, J. M., Gracia, P., Oria, R., Abenoza, M., Sánchez-Gimeno, A. C. (2012). Evolution of phenols and pigments in extra virgin olive oil from irrigated super-intensive orchard. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114 (5), 558-567.
- Benito, M., Oria, R., Sánchez-Gimeno, A.C. (2010). Characterization of the olive oil from three potentially interesting varieties from Aragon (Spain). *Food Science and Technology International*, 16 (6), 523-530.
- Berenguer, M. J., Vossen, P. M., Grattan, S. R., Connell, J. H., Polito, V. S. (2006). Tree irrigation levels for optimum chemical and sensory properties of olive oil. *HortScience*, 41 (2), 427-432.
- Bergqvist, J., Dokoozlian, N., Ebisuda, N. (2001). Sunlight exposure and temperature effects on berry growth and composition of Cabernet Sauvignon and Grenache in the central San Joaquin Valley of California. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52, 1-7
- Bianchi, G., Murelli, C., Vlahov, G. (1992). Surface waxes from olive fruits. *Phytochemistry*, 31 (10), 3503-3506.

- Bianco, A., Coccioli, F., Guiso, M., Marra, C. (2002). The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: Hydroxy-isochromans. *Food Chemistry*, 77 (4), 405-411.
- Bianco, A. D., Muzzalupo, I., Piperno, A., Romeo, G., Uccella, N. (1999). Bioactive derivatives of oleuropein from olive fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (9), 3531-3534.
- Bianco, A., Scalzo, R. L., Scarpati, M. L. (1993). Isolation of cornoside from *Olea europaea* and its transformation into halleridone. *Phytochemistry*, 32 (2), 455-457.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review in Plant Biology*, 54, 519-546.
- Bohm, B.A. (1998). *Introduction to Flavonoids. Chemistry and Biochemistry of Organic Natural Products*. B. Ravindranath (Ed.). Amsterdam, Holanda: Harwood Academic Press.
- Bonoli, M., Bendini, A., Cerretani, L., Lercker, G., Toschi, T.G. (2004). Qualitative and semiquantitative analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oils as a function of the ripening degree of olive fruits by different analytical techniques. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (23), 7026-7032.
- Borguini, R. G. (2006). *Antioxidant potential and physical-chemical characteristics of organic tomato (*Lycopersicon esculentum*) in comparison with conventional tomato*. Tesis doctoral. Universidade de Sao Paulo, Brasil.
- Boskou, D. (1996). Olive oil composition. En: D. Boskou (Ed.), *Olive Oil Chemistry and Technology*. Champaign, USA: AOCS Press.
- Bottino, A., Capannelli, G., Mattei, A., Rovellini, P., Zunin, P. (2008). Effect of membrane filtration on the flavor of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110 (12), 1109-1115.
- Bouaziz, M., Jemai, H., Khabou, W., Sayadi, S. (2010). Oil content, phenolic profiling and antioxidant potential of Tunisian olive drupes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90 (10), 1750-1758.
- Brandt, K., Mølgaard, J.P. (2001). Organic agriculture: Does it enhance or reduce the nutritional value of plant foods?. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81 (9), 924-931.
- Brenes, M., García, A., García, P., Garrido, A. (2001). Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11), 5609-5614.

- Brenes, M., García, A., García, P., Rios, J. J., Garrido, A. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (9), 3535-3540.
- Brenes, M., García, A., García, P., Rios, J. J., Garrido, A. (2002). Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils. *International Journal of Food Science and Technology*, 37 (6), 615-625.
- Brenes, M., Hidalgo, F. J., García, A., Rios, J. J., García, P., Zamora, R., Garrido, A. (2000). Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77 (7), 715-720.
- Briante, R., Patumi, M., Limongelli, S., Febbraio, F., Vaccaro, C., Di Salle, A., La Cara, F., Nucci, R. (2002). Changes in phenolic and enzymatic activities content during fruit ripening in two Italian cultivars of *Olea europaea* L. *Plant Science*, 162 (5), 791-798.
- Bucelli, P., Costantini, E. A. C., Barbetti, R., Franchini, E. (2011). Soil water availability in rainfed cultivation affects more than cultivar some nutraceutical components and the sensory profile of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (15), 8304-8313.
- Capasso, R., Evidente, A., Visca, C., Gianfreda, L., Maremonti, M., Greco Jr., G. (1996). Production of glucose and bioactive aglycone by chemical and enzymatic hydrolysis of purified oleuropein from *Olea europea*. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 61 (3), 365-377.
- Caponio, F., Alloggio, V., Gomes, T. (1999). Phenolic compounds of virgin olive oil: Influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, 64 (2), 203-209.
- Caponio, F., Gomes, T., Summo, C., Pasqualone, A. (2003). Influence of the type of olive-crusher used on the quality of extra virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105 (5), 201-206.
- Capozzi, F., Piperno, A., Uccella, N. (2000). Oleuropein site selective hydrolysis by technomimetic nuclear magnetic resonance experiments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (5), 1623-1629.
- Carbonaro, M., Mattera, M., Nicoli, S., Bergamo, P., Cappelloni, M. (2002). Modulation of antioxidant compounds in organic vs conventional fruit (peach, *Prunus persica* L., and pear, *Pyrus communis* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (19), 5458-5462.
- Cardoso, S.M., Guyot, S., Marnet, N., Lopes-da-Silva, J.A., Renard, C.M.G.C., Coimbra, M.A. (2005) Characterisation of phenolic extracts from olive pulp and olive pomace by electrospray mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 85 (1), 21-32.

- Caris-Veyrat, C., Amiot, M. J., Tyssandier, V., Grasselly, D., Buret, M., Mikolajczak, M., Guillard, J. C., Bouteloup-Demange, C., Borel, P. (2004). Influence of organic versus conventional agricultural practice on the antioxidant microconstituent content of tomatoes and derived purees; consequences on antioxidant plasma status in humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (21), 6503-6509.
- Carletti, P., Masi, A., Wonisch, A., Grill, D., Tausz, M., Ferretti, M. (2003). Changes in antioxidant and pigment pool dimensions in UV-B irradiated maize seedlings. *Environmental and Experimental Botany*, 50 (2), 149-157.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina-Toschi, T., Fernández-Gutiérrez, A. (2005). Analytical determination of polyphenols in olive oils. *Journal of Separation Science*, 28 (9-10), 837-858.
- Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Rapid quantification of the phenolic fraction of Spanish virgin olive oils by capillary electrophoresis with UV detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (21), 7984-7991.
- Carvalho, A. M., Junqueira, A. M. R., Vieira, J. V., Botelho, R. (2005). Análise sensorial de genótipos de cenoura cultivados em sistema orgânico e convencional. *Horticultura Brasileira*, 23 (3), 805-809.
- Castellanos, I., Espinosa-García, F. J. (1997). Plant secondary metabolite diversity as a resistance trait against insects: A test with *Sitophilus granarius* (coleoptera: Curculionidae) and seed secondary metabolites. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25 (7), 591-602.
- Cecchi, T., Passamonti, P., Alfei, B., Cecchi, P. (2011). Monovarietal extra virgin olive oils from the Marche region, Italy: Analytical and sensory characterization. *International Journal of Food Properties*, 14 (3), 483-495.
- Ceci, L.N., Carelli, A.A. (2010) Relation between oxidative stability and composition in Argentinian olive oils. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87 (10), 1189-1197.
- Cerretani, L., Motilva, M. J., Romero, M. P., Bendini, A., Lercker, G. (2008). Pigment profile and chromatic parameters of monovarietal virgin olive oils from different Italian cultivars. *European Food Research and Technology*, 226 (6), 1251-1258.
- Cert, A., Lanzón, A., Carelli, A. A., Albi, T., Amelotti, G. (1994). Formation of stigmasta-3,5-diene in vegetable oils.

- Chassy, A. W., Bui, L., Renaud, E. N. C., Van Horn, M., Mitchell, A. E. (2006). Three-year comparison of the content of antioxidant microconstituents and several quality characteristics in organic and conventionally managed tomatoes and bell peppers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (21), 8244-8252.
- Chen, B.H., Huang, J.H. (1998). Degradation and isomerization of chlorophyll a and  $\beta$ -carotene as affected by various heating and illumination treatments. *Food Chemistry*, 62 (3), 299-307.
- Chesson, A., Russell, W.R., Provan, G.J. (1997). Metabolites of the phenylpropanoid pathway – common origin, common properties? Polyphenol in Foods. *Proceedings of a European COST concerted action scientific workshop*. Aberdeen, Scotland, 17-23.
- Cicerale, S., Lucas, L., Keast, R. (2010). Biological activities of phenolic compounds present in virgin olive oil. *International Journal of Molecular Sciences*, 11 (2), 458-479.
- Cichelli, A., Pertesana, G. P. (2004). High-performance liquid chromatographic analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils: Chemometric approach to variety classification. *Journal of Chromatography A*, 1046 (1–2), 141-146.
- Cimato, A., Modi, G., Mattei, A., Niccolai, M., Alessandri, S. (1991). La caratterizzazione de'll olio tipico Toscano. Il anno di ricerca. *CROEVOTT*, 1-156.
- C.O.I., Consejo Oleícola Internacional (2009). *Determinación de los biofenoles de los aceites de oliva mediante HPLC*. Método COI/ T.20 / Documento 29.
- Covas, M. I. (2007). Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacological Research*, 55 (3), 175-186.
- Covas, M. I., Nyssönen, K., Poulsen, H. E., Kaikkonen, J., Zunft, H. J. F., Kiesewetter, H., . Kiesewetter, H., Gaddi, A., De La Torre, R., Mursu, J., Bäumlér, H., Nascetti, S., Salonen, J.T., Fitó, M., Virtanen, J., Marrugat, J. (2006). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: A randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 145 (5), 333-341.
- Criado, M. N. (2005). *Caracterización del perfil pigmentario (clorofilas y carotenoides) del fruto (Olea europaea L.) y del aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina y su variación en función de algunos factores agronómicos y tecnológicos*. M.J. Motilva Casado y M.P. Romero Fabregat (tut.). Tesis doctoral. Universitat de Lleida, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària.

- Criado, M. N., Morelló, J. R., Motilva, M. J., Romero, M. P. (2004). Effect of growing area on pigment and phenolic fractions of virgin olive oils of the Arbequina variety in Spain. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81 (7), 633-640.
- Criado, M. N., Motilva, M. J., Goñi, M., Romero, M. P. (2007a). Comparative study of the effect of the maturation process of the olive fruit on the chlorophyll and carotenoid fractions of drupes and virgin oils from Arbequina and Farga cultivars. *Food Chemistry*, 100 (2), 748-755.
- Criado, M. N., Romero, M. P., Casanovas, M., Motilva, M. J. (2008). Pigment profile and colour of monovarietal virgin olive oils from Arbequina cultivar obtained during two consecutive crop seasons. *Food Chemistry*, 110 (4), 873-880.
- Criado, M. N., Romero, M. P., Motilva, M. J. (2007b). Effect of the technological and agronomical factors on pigment transfer during olive oil extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (14), 5681-5688.
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: Chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26 (8), 1001-1043.
- Dabbou, S., Rjiba, I., Echbili, A., Gazzah, N., Mechri, B., Hammami, M. (2010). Effect of controlled crossing on the triglyceride and fatty acid composition of virgin olive oils. *Chemistry and Biodiversity*, 7 (7), 1801-1813.
- Daccache, A., Lion, C., Sibille, N., Gerard, M., Slomianny, C., Lippens, G., Cotelle, P. (2011). Oleuropein and derivatives from olives as Tau aggregation inhibitor. *Neurochemistry International*, 58 (6), 700-707.
- Damtoft, S., Franzyk, H., Jensen, S. R. (1993). Biosynthesis of secoiridoid glucosides in Oleaceae. *Phytochemistry*, 34 (5), 1291-1299.
- Damtoft, S., Franzyk, H., Jensen, S. R. (1995a). Biosynthesis of iridoids in *Syringa* and *Fraxinus*: Secoiridoid precursors. *Phytochemistry*, 40 (3), 773-784.
- Damtoft, S., Franzyk, H., Jensen, S. R. (1995b). Biosynthesis of iridoids in *Syringa* and *Fraxinus*: Carbocyclic iridoid precursors. *Phytochemistry*, 40, 785-792.
- Dardick, C.D., Callahan, A.M., Chiozzotto, R., Schaffer, R.J., Piagnani, M.C., Scorza, R. (2010). Stone formation in peach fruit exhibits spatial coordination of the lignin and flavonoid pathways and similarity to Arabidopsis dehiscence. *BMC Biology*, 8, art. no. 13
- Davies, B. H. (1976). *Carotenoids*. En: T. W. Goodwin (Ed.), *Chemistry and biochemistry of plant pigments* (vol. 2 ed., pp. 38). Londres, Nueva York y San Francisco: Academy Press.

- Del Amor, F. M., Serrano-Martínez, A., Fortea, I., Núñez-Delicado, E. (2008). Differential effect of organic cultivation on the levels of phenolics, peroxidase and capsidiol in sweet peppers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88 (5), 770-777.
- Del Caro, A., Vacca, V., Poiana, M., Fenu, P., Piga, A. (2006). Influence of technology, storage and exposure on components of extra virgin olive oil (Bosana cv) from whole and de-stoned fruits. *Food Chemistry*, 98 (2), 311-316.
- Del Río, C., Caballero, J.M.. (1994). Preliminary agronomical characterization of 131 cultivars introduced in the olive germplasm bank of Cordoba. *Acta Horticulturae*, 356 (1), 110-115.
- Del Río, C., Caballero, J.M. (2008). Variability and Classification of Olive Cultivars by Fruit Weight, Flesh/Stone Ratio and Oil Percentage. *Acta Horticulturae*, 791, 39-44.
- De Nino, A., Di Donna, L., Mazzotti, F., Muzzalupo, E., Perri, E., Sindona, G., Tagarelli, A. (2005). Absolute method for the assay of oleuropein in olive oils by atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 77 (18), 5961-5964.
- De Stefano, G., Piacquadio, P., Servili, M., Di Giovacchino, L., Sciancalepore, V. (1999). Effect of extraction systems on the phenolic composition of virgin olive oils. *Lipid / Fett*, 101 (9), 328-332.
- Dharmawardhana, D.P., Ellis, B.E., Carlson, J.E. (1995). A beta-glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiology*, 107 (2), 331-339
- Di Giovacchino, L., Solinas, M., Miccoli, M. (1994). Effect of extraction systems on the quality of virgin olive oil. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71 (11), 1189-1194.
- Dinda, B., Debnath, S., Harigaya, Y. (2007). Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. A review. part 2. *Chemical and Pharmaceutical Bulletins*, 55, 689-728.
- Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S. S., Wang, L. (2002). The phenylpropanoid pathway and plant defence: A genomics perspective. *Molecular Plant Pathology*, 3 (5), 371-390.
- Dolgun, O., Ozkan, G., Erbay, B. (2010). Comparison of olive oils derived from certified organic and conventional agricultural methods. *Asian Journal of Chemistry*, 22 (3), 2339-2348.
- Elrich, P. R., Raven, P. H. (1964). Butterflies and plants: A study in coevolution. *Evolution*, 18, 586-608.

- Escamilla-Treviño, L.L., Chen, W., Card, M.L., Shih, M.-C., Cheng, C.-L., Poulton, J.E. (2006). *Arabidopsis thaliana*  $\beta$ -Glucosidases BGLU45 and BGLU46 hydrolyse monoglucosides. *Phytochemistry*, 67 (15), 1651-1660
- Esti, M., Cinquanta, L., La Notte, E. (1998). Phenolic compounds in different olive varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (1), 32-35.
- Evers, A. M. (1989). The role of fertilization practices in the yield and quality of carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of Agricultural Science in Finland*, 61, 329-360.
- FAO, Food and Agriculture Organization. (2002). *Organic agriculture, environment and food security*. Environment and Natural Resources Series No. 4. Roma, Italia: FAO.
- FAO, Food and Agriculture Organization. (2003). *World agriculture: Towards 2015-2030 - an FAO perspective*. Londres, Inglaterra: Earthscan Publications Ltd.
- FAO, Food and Agriculture Organization. (2004). The scope of organic agriculture, sustainable forest management and ecoforestry in protected area management. Environment and Natural Resources Series No. 18. Roma, Italia: FAO.
- Fedeli, E. (1977). Lipids of olives. *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*, 15 (1), 57-74.
- Feippe, A., Ibáñez, F., Altier, G.P. (2010). Fruit ripening stage effect on the fatty acid profile of 'Arbequina' and 'Picual' olives in Uruguay. *Acta Horticulturae*, 877, 1495-1500.
- Fernández-Bolaños, J., Rodríguez, R., Guillén, R., Jiménez, A., Heredia, A. (1995). Activity of cell wall-associated enzyme in ripening olive fruit. *Physiologia Plantarum*, 93 (4), 651-658.
- Fiorino, P., Alessandri, S., Cert, A., Dikmen, I., Rahmani, M. (1996). Técnicas agronómicas y características del aceite de oliva. En: COI Plaza & Janés (Ed.), *Enciclopedia mundial del olivo* (pp. 195-222). Barcelona, España: Consejo Oleícola Internacional.
- Foppen, F. H. (1971). Tables for the identification of carotenoid pigments. *Chromatographic Reviews*, 14 (3), 133-298.
- Fregapane, G., Lavelli, V., León, S., Kapuralin, J., Salvador, M. D. (2006). Effect of filtration on virgin olive oil stability during storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108 (2), 134-142.
- Gallardo-Guerrero, L., Gandul-Rojas, B., Roca, M., Mínguez-Mosquera, M. I. (2005). Effect of storage on the original pigment profile of Spanish virgin olive oil. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82 (1), 33-39.

- Gambacorta, G., Faccia, M., Previtali, M.A., Pati, S., Notte, E.L., Baiano, A. (2010). Effects of olive maturation and stoning on quality indices and antioxidant content of extra virgin oils (cv. Coratina) during storage. *Journal of Food Science*, 75 (3), C229-C235
- Gandul-Rojas, B., Cepero, M. R., Mínguez-Mosquera, M. I. (1999). Chlorophyll and carotenoid patterns in olive fruits, *Olea europaea* cv. Arbequina. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (6), 2207-2212.
- Gandul-Rojas, B., Cepero, M. R., Mínguez-Mosquera, M. I. (2000). Use of chlorophyll and carotenoid pigment composition to determine authenticity of virgin olive oil. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77 (8), 853-858.
- Gandul-Rojas, B., Mínguez-Mosquera, M. I. (1996a). Chlorophyll and carotenoid composition in virgin olive oils from various Spanish olive varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72 (1), 31-39.
- Gandul-Rojas, B., Mínguez-Mosquera, M. I. (1996b). Chlorophyllase activity in olive fruits and its relationship with the loss of chlorophyll pigments in the fruits and oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72 (3), 291-294.
- García, A., Brenes, M., García, P., Romero, C., Garrido, A. (2003). Phenolic content of commercial olive oils. *European Food Research and Technology*, 216 (6), 520-525.
- García, A., Brenes, M., Martínez, F., Alba, J., García, P., Garrido, A. (2001). High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in virgin olive oil during extraction at laboratory and industrial scale. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78 (6), 625-629.
- García, A., Brenes, M., Romero, C., García, P., Garrido, A. (2002). Study of phenolic compounds in virgin olive oils of the Picual variety. *European Food Research and Technology*, 215 (5), 407-412.
- García-Rodríguez, R., Romero-Segura, C., Sanz, C., Sánchez-Ortiz, A., Pérez, A. G. (2011). Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Research International*, 44 (2), 629-635.
- Gariboldi, P., Jommi, G., Verotta, L. (1986). Secoiridoids from *Olea europaea*. *Phytochemistry*, 25 (4), 865-869.
- Gennaro, L., Piccioli Bocca, A., Modesti, D., Masella, R., Coni, E. (1998). Effect of Biophenols on Olive Oil Stability Evaluated by Thermogravimetric Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (11), 4465-4469

- Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., De la Torre, M. C., López-Sabater, M. C. (2002). The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics,  $\alpha$ -tocopherol, and  $\beta$ -carotene) in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 78 (2), 207-211.
- Giuffrè, A.M., Piscopo, A., Sicari, V., Poiana, M. (2010). The effects of harvesting on phenolic compounds and fatty acids content in virgin olive oil (cv Roggianella). *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 87 (1), 14-23.
- Giuffrida, D., Salvo, F., Salvo, A., Cossignani, L., Dugo, G. (2011). Pigments profile in monovarietal virgin olive oils from various Italian olive varieties. *Food Chemistry*, 124 (3), 1119-1123.
- Giuffrida, D., Salvo, F., Salvo, A., Pera, L.L., Dugo, G. (2007). Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties. *Food Chemistry*, 101 (2), 833-837
- Gómez-Alonso, S., Salvador, M. D., Fregapane, G. (2002). Phenolic compounds profile of Cornicabra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (23), 6812-6817.
- Gómez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Del Carlo, M., Compagnone, D., Cichelli, A. (2008). Effects of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the phenolic profile and selected chemical parameters of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (12), 4577-4583.
- Gómez-González, S., Ruiz-Jiménez, J., De Castro, M.D.L. (2011). Oil content and fatty acid profile of Spanish cultivars during olive fruit ripening. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88 (11), 1737-1745.
- Gómez-Rico, A., Fregapane, G., Salvador, M. D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, 41 (4), 433-440.
- Gómez-Rico, A., Inarejos-García, A. M., Salvador, M. D., Fregapane, G. (2009b). Effect of malaxation conditions on phenol and volatile profiles in olive paste and the corresponding virgin olive oils (*Olea europaea* L. cv. Cornicabra). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (9), 3587-3595.
- Gómez-Rico, A., Salvador, M. D., Fregapane, G. (2009a). Virgin olive oil and olive fruit minor constituents as affected by irrigation management based on SWP and TDF as compared to ETc in medium-density young olive orchards (*Olea europaea* L. cv. Cornicabra and Morisca). *Food Research International*, 42 (8), 1067-1076.

- Gómez-Rico, A., Salvador, M. D., La Greca, M., Fregapane, G. (2006). Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L. cv. Cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *54* (19), 7130-7136.
- Gómez-Rico, A., Salvador, M. D., Moriana, A., Pérez, D., Olmedilla, N., Ribas, F., Fregapane, G. (2007). Influence of different irrigation strategies in a traditional Cornicabra cv. olive orchard on virgin olive oil composition and quality. *Food Chemistry*, *100* (2), 568-578.
- González-Pombo, P., Pérez, G., Carrau, F., Guisán, J. M., Batista-Viera, F., Brena, B. M. (2008). One-step purification and characterization of an intracellular  $\beta$ -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnology Letters*, *30* (8), 1469-1475.
- Graciani, E., Vázquez-Roncero, A. (1981). Estudio de los componentes polares del aceite de oliva por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). III Aplicación a diversos tipos de aceites vírgenes. *Grasas y Aceites*, *32*, 365-371.
- Gross, J. (1991) *Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids*. Nueva York, USA: Ed. Van Nostrand Reinhold.
- Guerfel, M., Zaghdoud, C., Jebahi, K., Boujnah, D., Zarrouk, M. (2010). Effects of the planting density on virgin olive oil quality of "Chemlali" olive trees (*Olea europaea* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58* (23), 12469-12472.
- Günata, Z. (2003). Flavor enhancement in fruit juices and derived beverages by exogenous glycosidases and consequences of the use of enzyme preparations. En: J. Whitaker, A. Voragen y D. Wong (Eds.), *Handbook of food enzymology* (pp. 303-329). Nueva York, USA: CRC Press.
- Gutiérrez, F., Arnaud, T., Albi, M. A. (1999). Influence of ecological cultivation on virgin olive oil quality. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, *76* (5), 617-621.
- Gutiérrez-Rosales, F., Ríos, J.J., Gómez-Rey, Ma.L. (2003). Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51* (20), 6021-6025.
- Gutiérrez-Rosales, F., Romero, M.P., Casanovas, M., Motilva, M.J., Mínguez-Mosquera, M.I. (2012).  $\beta$ -glucosidase involvement in the formation and transformation of oleuropeína during the growth and development of olive fruits (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under different farming practices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60* (17), 4348-4358.

- Haglund, Å., Johansson, L., Berglund, L., Dahlstedt, L. (1998). Sensory evaluation of carrots from ecological and conventional growing systems. *Food Quality and Preference*, 10 (1), 23-29.
- Häkkinen, S. H., Törrönen, A. R. (2000). Content of flavonols and selected phenolic acids in strawberries and vaccinium species: Influence of cultivar, cultivation site and technique. *Food Research International*, 33 (6), 517-524.
- Han, X., Shen, T., Lou, H. (2007). Dietary polyphenols and their biological significance. *International Journal of Molecular Sciences*, 8 (9), 950-988.
- Harborne, J. B. (1989). *Plant phenolics*. Londres, Inglaterra: Academic Press.
- Hättenschwiler, S., Vitousek, P. M. (2000). The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in Ecology and Evolution*, 15 (6), 238-242.
- Heinonen, S., Nurmi, T., Liukkonen, K., Poutanen, K., Wähälä, K., Deyama, T., Nishibe, S., Adlercreutz, H. (2001). In vitro metabolism of plant lignans: New precursors of mammalian lignans enterolactone and enterodiol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (7), 3178-3186.
- Heredia-Moreno, A., Guillén-Bejarano, R., Fernández-Bolaños, J., Rivas-Moreno, M. (1987). Olive stones as a source of fermentable sugars. *Biomass*, 14 (2), 143-148.
- Hermoso, M., Uceda, M., Frías, M. L., Beltrán, G. (2001). Maduración. En: D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (Eds.), *El cultivo del olivo* (4ª ed., pp. 153-169). Madrid, España: Mundi-Prensa.
- Hermoso, M., Uceda, M., García, A., Morales, B., Frías, M. L., Fernández, A. (1991). En: Serie Apuntes 5/92 (Ed.), *Elaboración de aceite de calidad*. Sevilla, España: Consejería de Agricultura y Pesca.
- Hermoso, J.F., Plana, J., Romero, A., Tous, J. (2008). Performance of six olive oil cultivars in the south of Catalonia (Spain). *Acta Horticulturae*, 791, 333-337
- Hoogenboom, L. A. P., Bokhorst, J. G., Northolt, M. D., van de Vijver, L. P. L., Broex, N. J. G., Mevius, D. J. (2008). Contaminants and microorganisms in Dutch organic food products: A comparison with conventional products. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 25 (10), 1195-1207.
- Hösel, W., Surholt, E., Borgmann, E. (1978). Characterization of  $\beta$ -Glucosidase Isoenzymes Possibly Involved in Lignification from Chick Pea (*Cicer arietinum* L.) Cell Suspension Cultures. *European Journal of Biochemistry*, 84 (2), 487-492.

- Hu, H., Liu, Y., Shi, G.L., Liu, Y.P., Wu, R.J., Yang, A.Z., Wang, Y.M., Hua, B. G., Wang, Y. N. (2011). Proteomic analysis of peach endocarp and mesocarp during early fruit development. *Physiologia Plantarum*, 142 (4), 390-406
- Iconomou, D., Arapoglou, D., Israilides, C. (2010). Improvement of phenolic antioxidants and quality characteristics of virgin olive oil with the addition of enzymes and nitrogen during olive paste processing. *Grasas y Aceites*, 61 (3), 303-311.
- Inouye, H., Ueda, S., Inoue, K., Takeda, I. (1971). Biosynthesis of oleuropein-type secoiridoid glucosides by *Oleaceae*. *Tetrahedron Letters*, 43, 4073-4076.
- Inouye, H., Ueda, S., Inoue, K., Takeda, I. (1974). Studies on monoterpene glucosides and related natural products. XXIII. Biosynthesis of the secoiridoids glucosides, gentiopicroside, morroniside, oleuropein and jasminin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletins*, 22, 676-686.
- Isler, O., Gutmann, H., Solms, U. (1971). *Carotenoids*. Basilea, Suiza: Birkhäuser.
- Ismail, A., Fun, C. S. (2003). Determination of vitamin C,  $\beta$ -carotene and riboflavin contents in five green vegetables organically and conventionally grown. *Malaysian Journal of Nutrition*, 9, 31-39.
- Issaoui, M., Flamini, G., Brahmi, F., Dabbou, S., Hassine, K. B., Taamali, A., Chehab, H., Ellouz, M., Zarrouk, M., Hammami, M. (2010). Effect of the growing area conditions on differentiation between Chemlali and Chétoui olive oils. *Food Chemistry*, 119 (1), 220-225.
- Jacoboni, A., Pinnola Ida, M., Baltadori, A. (1999). The production of *Olea europaea* L. in Viterbo in relation to the climatological factors. *Acta Horticulturae*, 474, 229-232.
- Jemai, H., Bouaziz, M., Sayadi, S. (2009). Phenolic composition, sugar contents and antioxidant activity of Tunisian sweet olive cultivars with regard to fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (7), 2961-2968.
- Jerman, T., Trebse, P., Mozetic Vodopivec, B. (2010). Ultrasound-assisted solid liquid extraction (USLE) of olive fruit (*Olea europaea*) phenolic compounds. *Food Chemistry* 123 (1), 175-182.
- Jia, H.J., Araki, A., Okamoto, G. (2005). Influence of fruit bagging on aroma volatiles and skin coloration of "Hakuho" peach (*Prunus persica* Batsch). *Postharvest Biology and Technology*, 35, 61-68.
- Juroszek, P., Lumpkin, H. M., Yang, R.Y., Ledesma, D. R., Ma, C. H. (2009). Fruit quality and bioactive compounds with antioxidant activity of tomatoes grown on-farm: Comparison

- of organic and conventional management systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (4), 1188-1194.
- Keceli, T., Gordon, M. H. (2002). Ferric ions reduce the antioxidant activity of the phenolic fraction of virgin olive oil. *Journal of Food Science*, 67 (3), 943-947.
- Kiritsakis, A. K., Lenart, E. B., Willet, W. C., Hernandez, R. J. (1998a). *Olive oil: From the tree to the table* (2 ed.). Malden, USA: Food and Nutrition Press.
- Kiritsakis, A., Nanos, G. D., Polymenopoulos, Z., Thomai, T., Sfakiotakis, E. M. (1998b). Effect of fruit storage conditions on olive oil quality. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75 (6), 721-724.
- King, J. R. (1938). Morphological development of the fruit of the olive. *Hilgardia*, 11, 437-458.
- Konno, K., Hirayama, C., Yasui, H., Nakamura, M. (1999). Enzymatic activation of oleuropein: A protein crosslinker used as a chemical defense in the privet tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96 (16), 9159-9164.
- Krichene, D., Taamalli, W., Daoud, D., Salvador, M.D., Fregapane, G., Zarrouk, M. (2007). Phenolic compounds, tocopherols and other minor components in virgin olive oils of some Tunisian varieties. *Journal of Food Biochemistry*, 31 (2), 179-194.
- Kumarasamy, Y., Nahar, L., Cox, P. J., Jaspars, M., Sarker, S. D. (2003). Bioactivity of secoiridoid glycosides from *Centaurium erythraea*. *Phytomedicine*, 10 (4), 344-347.
- La Camera, S., Gouzerh, G., Dhondt, S., Hoffmann, L., Fritig, B., Legrand, M., Heitz, T. (2004). Metabolic reprogramming in plant innate immunity: The contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological Reviews*, 198 (1), 267-284.
- Läubli, M. W., Bruttel, P. A. (1986). Determination of the oxidative stability of fats and oils: Comparison between the active oxygen method (AOCS cd 12-57) and the Rancimat method. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 63 (6), 792-795.
- Lavelli, V., Bondesan, L. (2005). Secoiridoids, tocopherols, and antioxidant activity of monovarietal extra virgin olive oils extracted from destoned fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (4), 1102-1107.
- Lavelli, V., Fregapane, G., Desamparados Salvador, M. (2006). Effect of storage on secoiridoid and tocopherol contents and antioxidant activity of monovarietal extra virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (8), 3002-3007.

- Lewis, N. G., Davin, L. B., Sarkanen, S. (1998). Lignin and lignan biosynthesis: Distinctions and reconciliations. En: N.G. Lewis & S. Sarkanen (Eds.), *ACS Symposium Series* (pp. 1-27). Washington DC, USA: American Chemical Society.
- Limiroli, R., Consonni, R., Ottolina, G., Marsilio, V., Bianchi, G., Zetta, L. (1995). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR characterization of new oleuropein aglycones. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, (12), 1519-1523.
- Loizzo, M. R., Di Lecce, G., Boselli, E., Menichini, F., Frega, N. G. (2011). Radical scavenging, total antioxidant capacity and antiproliferative activity of phenolic extracts from extra virgin olive oil by cultivar "Frantoio". *International Journal of Food Properties*, doi:10.1080/10942912.2010.522291
- Lombardi-Boccia, G., Lucarini, M., Lanzi, S., Aguzzi, A., Cappelloni, M. (2004). Nutrients and antioxidant molecules in yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: A comparative study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (1), 90-94.
- Lorenc-Kukula, K., Amarowicz, R., Oszmianski, J., Doermann, P., Starzycki, M., Skala, J., Zuk, M., Kulma, A., Szopa, J. (2005). Pleiotropic effect of phenolic compounds content increases in transgenic flax plant. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (9), 3685-3692.
- Luna, G., Morales, M. T., Aparicio, R. (2006). Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chemistry*, 98 (2), 243-252.
- Luthria, D., Singh, A. P., Wilson, T., Vorsa, N., Banuelos, G. S., Vinyard, B. T. (2010). Influence of conventional and organic agricultural practices on the phenolic content in eggplant pulp: Plant-to-plant variation. *Food Chemistry*, 121 (2), 406-411.
- Maestro-Durán, R., León Cabello, R., Ruíz-Gutiérrez, V., Fiestas, P., Vázquez-Roncero, A. (1994). Glucósidos fenólicos amargos de las semillas del olivo (*Olea europea*). *Grasas y Aceites*, 45 (5), 332-335.
- Mailer, R. J., Ayton, J. (2004). Comparison of olive oil (*Olea europaea*) quality extracted by stonemill and hammermill. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 32 (3), 325-330.
- Mailer, R., Ayton, J. (2011). Effect of irrigation and water stress on olive oil quality and yield based on a four year study. *Acta Horticulturae*, 888, 63-72.
- Mailer, R.J., Ayton, J., Graham, K. (2010). The influence of growing region, cultivar and harvest timing on the diversity of Australian olive oil. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87 (8), 877-884.

- Malik, N. S. A., Bradford, J. M. (2006). Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. *Scientia Horticulturae*, 110 (3), 274-278.
- Malmauret, L., Parent-Massin, D., Hardy, J. L., Verger, P. (2002). Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France. *Food Additives and Contaminants*, 19 (6), 524-532.
- Marjamaa, K., Kukkola, E. M., Fagersted, K. V. (2007). Lignification in development. *International Journal of Plant Biology*, 1, 160-169.
- Mateos, R., Espartero, J. L., Trujillo, M., Ríos, J. J., León-Camacho, M., Alcudia, F., Cert, A. (2001). Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (5), 2185-2192.
- Mateos, R., Trujillo, M., Carmen Pérez-Camino, M., Moreda, W., Cert, A. (2005). Relationships between oxidative stability, triacylglycerol composition, and antioxidant content in olive oil matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (14), 5766-5771
- Mazucca, S., Spadafora, A., Innocenti, A. M. (2006). Cell and tissue localization of  $\beta$ -glucosidase during the ripening of olive fruit (*Olea europaea*) by in situ activity assay. *Plant Science*, 171 (6), 726-733.
- Merzlyak, M. N., Chivkunova, O. B. (2000). Light-stress-induced pigments changes and evidence for anthocyanin photoprotection in apples. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 55, 155– 163
- Miao, Y. C., Liu, C. J. (2010). ATP-binding cassette-like transporters are involved in the transport of lignin precursors across plasma and vacuolar membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (52), 22728-22733.
- Mieszczak, M., Klahre, U., Levy, J.H., Godall, G.J., Filipowicz, W. (1992). Multiple plant RNA binding proteins identified by PCR: Expression of cDNAs encoding RNA binding proteins targeted to chloroplasts in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Molecular and General Genetics*, 234 (3), 390-400.
- Mínguez Mosquera, M. I. (1997). *Clorofilas y carotenoides en tecnología de alimentos*. Sevilla, España: Universidad de Sevilla.
- Mínguez-Mosquera, I., Gallardo-Guerrero, L. (1995). Disappearance of chlorophylls and carotenoids during the ripening of the olive. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 69 (1), 1-6.

- Mínguez-Mosquera, M. I., Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, L. (1992). Rapid method of quantification of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oil by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40 (1), 60-63.
- Mínguez-Mosquera, M. I., Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, L. (1994). Measurement of chlorophyllase activity in olive fruit (*Olea europaea*). *Journal of Biochemistry*, 116 (2), 263-268.
- Mínguez-Mosquera, M. I., Gandul-Rojas, B., Garrido-Fernandez, J., Gallardo-Guerrero, L. (1990). Pigments present in virgin olive oil. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67 (3), 192-196.
- Mínguez-Mosquera, M. I., Garrido-Fernández, J. (1989). Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37 (1), 1-7.
- 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*, 68 (5), 332-336.
- Mitchell, A. E., Hong, Y. J., Koh, E., Barrett, D. M., Bryant, D. E., Denison, R. F., Kaffka, S. (2007). Ten-year comparison of the influence of organic and conventional crop management practices on the content of flavonoids in tomatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (15), 6154-6159.
- Montedoro G., Servili, M. (1991). Chimica e qualità dell'olio di oliva: i fattori che la condizionano. Convegno "L'olio di oliva ed il suo futuro". Spoleto, 6-7 dicembre, 33-55.
- Montedoro, G. F., Servili, M., Baldioli, M., Magnarini, C., Cossignani, L., Damiani, P. (1993b). I potenziali modelli che definiscono la tipicità degli oli extra vergini di oliva. *Industrie Alimentari*, 32, 618-631.
- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E., Macchioni, A. (1993a). Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41 (11), 2228-2234.
- Montedoro, G. F., Taticchi, A., Esposto, S., Selvaggini, R., Urbani, S., Servili, M. (2007). Antioxidants in virgin olive oil. *Olea*, 26, 5-13.
- Morant, A. V., Jørgensen, K., Jørgensen, C., Paquette, S. M., Sánchez-Pérez, R., Møller, B. L., Bak, S. (2008).  $\beta$ -Glucosidases as detonators of plant chemical defense. *Phytochemistry*, 69 (9), 1795-1813.

- Morelló, J. R., Motilva, M. J., Ramo, T., Romero, M. P. (2003). Effect of freeze injuries in olive fruit on virgin olive oil composition. *Food Chemistry*, 81 (4), 547-553.
- Morelló, J. R., Romero, M. P., Motilva, M. J. (2004). Effect of the maturation of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga, and Morrut cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (19), 6002-6009.
- Morelló, J.R., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2006). Influence of seasonal conditions on the composition and quality parameters of monovarietal virgin olive oils. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83 (8), 683-690.
- Morelló, J. R., Romero, M. P., Ramo, T., Motilva, M. J. (2005a). Evaluation of L-phenylalanine ammonia-lyase activity and phenolic profile in olive drupe (*Olea europaea* L.) from fruit setting period to harvesting time. *Plant Science*, 168 (1), 65-72.
- Morelló, J.R., Vuorela, S., Romero, M.P., Motilva, M.J., Heinonen, M. (2005b). Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the Arbequina cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6), 2002-2008.
- Motilva, M. J., Jaria, I., Bellart, I., Romero, M. P. (1998). Estudio de la calidad del aceite de oliva de la Denominación de Origen «Les Garrigues» (Lleida) durante la campaña 1995/96. *Grasas y Aceites*, 49 (5-6), 425-433.
- Motilva, M.J., Ramo, T., Romero, M.P. (2001). Caracterización geográfica de los aceites de oliva vírgenes de la denominación de origen protegida 'Les Garrigues' por su perfil de ácidos grasos. *Grasas y Aceites*, 52 (1), 26-32.
- Motilva, M. J., Tovar, M. J., Romero, M. P. , Alegre, S., Girona, J. (2000). Influence of regulated deficit irrigation strategies applied to olive trees (Arbequina cultivar) on oil yield and oil composition during the fruit ripening period. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (14), 2037-2043.
- Mousa, Y. M., Gerasopoulos, D., Metzidakis, I., Kiritsakis, A. (1996). Effect of altitude on fruit and oil quality characteristics of 'Mastoides' olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71 (3), 345-350.
- Mraicha, F., Ksantini, M., Zouch, O., Ayadi, M., Sayadi, S., Bouaziz, M. (2010). Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from Chemlali cultivar during ripening. *Food and Chemical Toxicology*, 48 (11), 3235-3241.
- Mulinacci, N., Giaccherini, C., Innocenti, M., Romani, A., Vincieri, F. F., Marotta, F., Mattei, A. (2005). Analysis of extra virgin olive oils from stoned olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85 (4), 662-670.

- Nicholson, R. L., Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual Review of Phytopathology*, 30, 369-389.
- Ninfali, P., Bacchiocca, M., Biagiotti, E., Esposto, S., Servili, M., Rosati, A., Montedoro, G. (2008). A 3-year study on quality, nutritional and organoleptic evaluation of organic and conventional extra-virgin olive oils. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85 (2), 151-158.
- Noel, J. P., Austin, M. B., Bomati, E. K. (2005). Structure–function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology*, 8 (3), 249-253.
- Obied, H. K., Bedgood Jr., D. R., Prenzler, P. D., Robards, K. (2007). Chemical screening of olive biophenol extracts by hyphenated liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 603 (2), 176-189.
- Obied, H. K., Prenzler, P. D., Ryan, D., Servili, M., Taticchi, A., Esposto, S., Robards, K. (2008). Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Natural Product Reports*, 25 (6), 1167-1179.
- Olías, J. M., Pérez, A. G., Ríos, J. J., Sanz, L. C. (1993). Aroma of virgin olive oil: Biogenesis of the “green” odor notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41 (12), 2368-2373.
- Oliveras-López, M. J., Innocenti, M., Giaccherini, C., Ieri, F., Romani, A., Mulinacci, N. (2007). Study of the phenolic composition of Spanish and Italian monocultivar extra virgin olive oils: Distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. *Talanta*, 73 (4), 726-732.
- Oliveras-López, M.J., Innocenti, M., Ieri, F., Giaccherini, C., Romani, A., Mulinacci, N. (2008) HPLC/DAD/ESI/MS detection of lignans from Spanish and Italian *Olea europaea* L. fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21 (1), 62-70.
- Ortega-García, F., Peragón, J. (2009). Phenylalanine ammonia-lyase, polyphenol oxidase, and phenol concentration in fruits of *Olea europaea* L. cv. Picual, Verdial, Arbequina, and Frantoio during ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (21), 10331-10340.
- Ortega-García, F., Peragón, J. (2010). HPLC analysis of oleuropein, hydroxytyrosol, and tyrosol in stems and roots of *Olea europaea* L. cv. Picual during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90 (13), 2295-2300.
- Osman, M., Metzidakis, I., Gerasopoulos, D., Kiritsakis, A. (1994). Qualitative changes of olive oil from fruits collected from trees grown at two altitudes. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 71, 187-190.

- Paiva-Martins, F., Fernandes, J., Rocha, S., Nascimento, H., Vitorino, R., Amado, F., Borges, F., Belo, L., Santos-Silva, A. (2009). Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53 (5), 609-616.
- Paiva-Martins, F., Fernandes, J., Santos, V., Silva, L., Borges, F., Rocha, S., Belo, L., Santos-Silva, A. (2010). Powerful protective role of 3,4-dihydroxyphenylethanol-elenolic acid dialdehyde against erythrocyte oxidative-induced hemolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (1), 135-140.
- Palese, A. M., Nuzzo, V., Favati, F., Pietrafesa, A., Celano, G., Xiloyannis, C. (2010). Effects of water deficit on the vegetative response, yield and oil quality of olive trees (*Olea europaea* L., cv Coratina) grown under intensive cultivation. *Scientia Horticulturae*, 125 (3), 222-229.
- Parker, R.S., Swanson, J.E., You, C.-S., Edwards, A.J., Huang, T. (1999). Bioavailability of carotenoids in human subjects. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58 (1), 155-162.
- Parr, A. J., Bolwell, G. P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (7), 985-1012.
- Pereira, J. A., Alves, M. R., Casal, S., Oliveira, M. B. P. P. (2004). Effect of olive fruit fly infestation on the quality of olive oil from cultivars Cobrançosa, Madural and Verdeal transmontana. *Italian Journal of Food Science*, 16 (3), 355-365.
- Pérez-Camino, M. C., Moreda, W., Mateos, R., Cert, A. (2003). Simultaneous determination of long-chain aliphatic aldehydes and waxes in olive oils. *Journal of Chromatography A*, 983 (1-2), 283-288.
- Pérez-Jiménez, F., López-Miranda, J., Mata, P. (2002). Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: Beyond cholesterol. *Atherosclerosis*, 163 (2), 385-398.
- Pérez-López, A. J., López-Nicolas, J. M., Núñez-Delicado, E., Del Amor, F. M., Carbonell-Barrachina, Á. A. (2007). Effects of agricultural practices on color, carotenoids composition, and minerals contents of sweet peppers, cv. Almuden. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (20), 8158-8164.
- Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Vincieri, F. F., Cimato, A., Romani, A. (2003). Minor polar compound and fatty acid analyses in monocultivar virgin olive oils from Tuscany. *Food Chemistry*, 80 (3), 331-336.

- Prior, R.L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R. (2003). Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (11), 3273-3279.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2003). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (10), 4290-4302.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M. (1998). Simultaneous HPLC determination of tocopherols, carotenoids, and chlorophylls for monitoring their effect on virgin olive oil oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46 (12), 5132-5138.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M. (2001). Pigments in Greek virgin olive oils: Occurrence and levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81 (7), 640-647.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M. (2002). Stability of virgin olive oil. 1. Autoxidation studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (4), 716-721.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M., Boskou, D. (2000).  $\alpha$ -Tocopherol content of Greek virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (5), 1770-1775.
- Ragazzi, E., Veronese, G., Guiotto, A. (1973). Demethyloleuropein, a new glucoside isolated from ripe olives. *Annali Di Chimica*, 63 (1-2), 13-20.
- Raigón, M. D., Rodríguez-Burruezo, A., Prohens, J. (2010). Effects of organic and conventional cultivation methods on composition of eggplant fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 (11), 6833-6840.
- Rallo, L. (1995). Selección y mejora genética del olivo en España. *Olivae*, 59, 46-53.
- Ranalli, A., Contento, S. (2010). Analytical assessment of destoned and organic-destoned extra-virgin olive oil. *European Food Research and Technology*, 230 (6), 965-971.
- Ranalli, A., Contento, S., Di Simone, G. (2011). Levels of lipochromes and other bioactives in virgin olive oil from new olive germplasm. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24 (6), 845-850.
- Ranalli, A., Lucera, L., Contento, S., Pannelli, G., Alfei, B. (2008). Evaluation of functional analytical fractions in extra-virgin olive oils from four new genotypes. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 791, 705-712.

- Ranalli, A., Marchegiani, D., Contento, S., Girardi, F., Nicolosi, M. P., Brullo, M. D. (2009a). Variations of iridoid oleuropein in Italian olive varieties during growth and maturation. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111 (7), 678-687.
- Ranalli, A., Marchegiani, D., Pardi, D., Contento, S., Pardi, D., Girardi, F., Kotti, F. (2009b). Evaluation of functional phytochemicals in destoned virgin olive oil. *Food and Bioprocess Technology*, 2 (3), 322-327.
- Ranalli, A., Pollastri, L., Contento, S., Iannucci, E., Lucera, L. (2003). Effect of olive paste kneading process time on the overall quality of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105 (2), 57-67.
- Ren, H., Endo, H., Hayashi, T. (2001). Antioxidative and antimutagenic activities and polyphenol content of pesticide-free and organically cultivated green vegetables using water-soluble chitosan as a soil modifier and leaf surface spray. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81 (15), 1426-1432.
- Ríos, J. J., Gutiérrez-Rosales, F. (2010). Comparison of methods extracting phenolic compounds from lyophilised and fresh olive pulp. *LWT - Food Science and Technology*, 43 (8), 1285-1288.
- Ripa, V., De Rose, F., Caravita, M. A., Parise, M. R., Perri, E., Rosati, A., Pandolfi, S., Paoletti, A., Pannelli, G., Padula, G., Giordani, E., Bellini, E., Buccoliero, A., Mennone, C. (2008). Qualitative evaluation of olive oils from new olive selections and effects of genotype and environment on oil quality. *Advances in Horticultural Science*, 22 (2), 95-103.
- Roca, M., Gandul-Rojas, B., Mínguez-Mosquera, M. I. (2007). Varietal differences in catabolic intermediates of chlorophylls in *Olea europaea* (L.) fruit cvs. Arbequina and Blanqueta. *Postharvest Biology and Technology*, 44 (2), 150-156.
- Roca, M., León, L., De La Rosa, R. (2011). Pigment metabolism of 'Sikitita' olive (*Olea europaea* L.): A new cultivar obtained by cross-breeding. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (5), 2049-2055.
- Roca, M., Mínguez-Mosquera, M. I. (2001a). Unusual carotenogenesis in fruits with pronounced anthocyanic ripening (*Olea europaea* var. Arbequina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (9), 4414-4419.
- Roca, M., Mínguez-Mosquera, M. I. (2001b). Changes in chloroplast pigments of olive varieties during fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (2), 832-839.

- Roca, M., Mínguez-Mosquera, M. I. (2003a). Involvement of chlorophyllase in chlorophyll metabolism in olive varieties with high and low chlorophyll content. *Physiologia Plantarum*, 117 (4), 459-466.
- Roca, M., Mínguez-Mosquera, M. I. (2003b). Carotenoid levels during the period of growth and ripening in fruits of different olive varieties (Hojiblanca, Picual and Arbequina). *Journal of Plant Physiology*, 160 (5), 451-459.
- Rodis, P. S., Karathanos, V. T., Mantzavinou, A. (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (3), 596-601.
- Rodríguez, S., Wolfender, J. L., Hakizamungu, E., Hostettmann, K. (1995). An antifungal naphthoquinone, xanthonones and secoiridoids from *Swertia calycina*. *Planta Medica*, 61 (4), 362-364.
- Rodríguez, S., Wolfender, J. L., Hostettmann, K., Stoeckli-Evans, H., Gupta, M. P. (1998). Monoterpene dimers from *Lisianthus seemanii*. *Helvetica Chimica Acta*, 81 (8), 1393-1403.
- Romani, A., Mulinacci, N., Pinelli, P., Vincieri, F. F., Cimato, A. (1999). Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (3), 964-967.
- Romero Aroca, A. J. (2011). Caracterización y diferenciación de los aceites vírgenes de oliva de la comarca del Priorat (Tarragona), dentro del mercado global de aceites de la variedad "Arbequina". J. Graell y J. Tous (tut.). Tesis doctoral. Universitat de Lleida, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària. Centre IRTA. Olivicultura, Elaiotècnia i Fruita Seca.
- Romero-Aroca, A., Díaz, I., Tous, J. (2002). Optimal harvesting period for Arbequina olive cultivar in Catalonia (Spain). *Acta Horticulturae*, 586 (1), 393-396.
- Romero, M. P., Motilva, M. J. (2010). Effect of Climatic Conditions on Quality of Virgin Olive Oil. En: *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 43-50). Londres, Inglaterra: Academic Press.
- Romero, A., Tous, J., Díaz, I. (2008). Virgin oil characteristics for selected clones from 'Arbequina' variety. *Acta Horticulturae (ISHS)*, 791, 713-717.
- Romero, M. P., Tovar, M. J., Girona, J., Motilva, M. J. (2002). Changes in the HPLC phenolic profile of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under different deficit irrigation strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (19), 5349-5354.

- Romero, M. P., Tovar, M. J., Ramo, T., Motilva, M. J. (2003). Effect of crop season on the composition of virgin olive oil with protected designation of origin "Les Garrigues". *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80 (5), 423-430.
- Romero-Segura, C., Sanz, C., Perez, A. G. (2009). Purification and characterization of an olive fruit  $\beta$ -glucosidase involved in the biosynthesis of virgin olive oil phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (17), 7983-7988.
- Rondanini, D.P., Castro, D.N., Searles, P.S., Rousseaux, M.C. (2011). Fatty acid profiles of varietal virgin olive oils (*Olea europaea* L.) from mature orchards in warm arid valleys of Northwestern Argentina (La Rioja). *Grasas y Aceites*, 62 (4), 399-409.
- Rossi, F., Godani, F., Bertuzzi, T., Trevisan, M., Ferrari, F., Gatti, S. (2008). Health-promoting substances and heavy metal content in tomatoes grown with different farming techniques. *European Journal of Nutrition*, 47 (5), 266-272.
- Roussos, P. A., Gasparatos, D. (2009). Apple tree growth and overall fruit quality under organic and conventional orchard management. *Scientia Horticulturae*, 123 (2), 247-252.
- Rubió, L., Macià, A., Valls, R.M., Pedret, A., Romero, M.P., Solà, R., Motilva, M.J. (2012). A new hydroxytyrosol metabolite identified in human plasma: Hydroxytyrosol acetate sulphate. *Food Chemistry*, 134 (2), 1132-1136.
- Ruiz-Lopez, M.D., Artacho, R., Fernandez Pineda, M.A., Lopez Garcia de la Serrana, H., Lopez Martinez, M.C. (1995). Stability of  $\alpha$ -tocopherol in virgin olive oil during microwave heating. *LWT - Food Science and Technology*, 28 (6), 644-646.
- Ryan, D., Antolovich, M., Herlt, T., Prenzler, P. D., Lavee, S., Robards, K. (2002a). Identification of phenolic compounds in tissues of the novel olive cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 (23), 6716-6724.
- Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Lavee, S. (2002b). Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92 (2), 147-176.
- Ryan, D., Prenzler, P. D., Lavee, S., Antolovich, M., Robards, K. (2003). Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's Mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (9), 2532-2538.
- Ryan, D., Robards, J. (1998). Phenolic compounds in olives. *Analyst* 123, 31R-44R.
- Ryan, D., Robards, K., Lavee, S. (1999a). Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, 34 (3), 265-274.

- Ryan, D., Robards, K., Prenzler, P., Jardine, D., Herlt, T., Antolovich, M. (1999b). Liquid chromatography with electrospray ionisation mass spectrometric detection of phenolic compounds from *Olea europaea*. *Journal of Chromatography A*, 855 (2), 529-537.
- Sacchi, R., Savarese, M., Del Regno, A., Paduano, A., Terminiello, R., Ambrosino, M. L. (2008). Shelf life of vegetable oils bottled in different scavenging polyethyleneterephthalate (PET) containers. *Packaging Technology and Science*, 21 (5), 269-277.
- Saija, A., Uccella, N. (2001). Olive biophenols: functional effects on human wellbeing. *TIFS*, 328-339.
- Salas, J. J., Sánchez, J. (1999). The decrease of virgin olive oil flavor produced by high malaxation temperature is due to inactivation of hydroperoxide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (3), 809-812.
- Salvador, M. D., Aranda, F., Fregapane, G. (1998). Chemical composition of commercial Cornicabra virgin olive oil from 1995/96 and 1996/97 crops. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75 (10), 1305-1311.
- Salvador, M. D., Aranda, F., Gómez-Alonso, S., Fregapane, G. (2003). Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: A study of five crop seasons. *Food Chemistry*, 80 (3), 359-366.
- Samman, S., Chow, J. W. Y., Foster, M. J., Ahmad, Z. I., Phuyal, J. L., Petocz, P. (2008). Fatty acid composition of edible oils derived from certified organic and conventional agricultural methods. *Food Chemistry*, 109 (3), 670-674.
- Sánchez Casas, J.J., Bueno, E.O., García, A.M.M., Cano, M.M. (2003). Estudio del contenido en ácidos grasos de aceites monovarietales elaborados a partir de aceitunas producidas en la región extremeña. *Grasas y Aceites*, 54 (4), 371-377
- Sánchez-Casas, J. J., De Miguel-Gordillo, C., Marín-Expósito, J. (1999). La calidad del aceite de oliva procedente de variedades cultivadas en Extremadura en relación con la composición y maduración de la aceituna. *Olivae*, 75, 31-36.
- Savarese, M., De Marco, E., Sacchi, R. (2007). Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. Pisciotana) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 105 (2), 761-770.
- Sciancalepore, V. (1985). Enzymatic browning in five olive varieties. *Journal of Food Science*, 50 (4), 1194-1195.

- Segovia-Bravo, K. A., Jarén-Galán, M., García-García, P., Garrido-Fernández, A. (2009). Browning reactions in olives: Mechanism and polyphenols involved. *Food Chemistry*, 114 (4), 1380-1385.
- Serani, A., Piacenti, D. (1992). Kinetics of pheophytin-A photodecomposition in extra virgin olive oil. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 69 (5), 469-470.
- Servei Meteorològic de Catalunya (2012). Servei Meteorològic de Catalunya (en línea). Generalitat de Catalunya. (Consultado: 13 febrero 2012). Disponible en Internet: [www.meteo.cat](http://www.meteo.cat).
- Servili, M., Baldioli, M., Begliomini, A., Selvaggini, R., Montedoro, G. F. (2000). The phenolic and volatile compounds of virgin olive oil: relationships with the endogenous oxidoreductases during the mechanical oil extraction process. En: V. Lanzotti, y O. Taglialatela-Scafati (Eds.), *Flavour and fragrance chemistry* (pp. 163-173). Dordrecht, Holanda: Kluwer Academic Publishers.
- Servili, M., Baldioli, M., Mariotti, F., Montedoro, G. F. (1996). Secoiridoids of virgin olive oil: Modification during the olive oil mechanical extraction process. *Proceedings of the World Conference and Exhibition on Oil Seed and Edible Oils Processing*, Istanbul, Turquía.
- Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Macchioni, A., Montedoro, G. (1999). Phenolic compounds of olive fruit: One- and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of nuzhenide and its distribution in the constitutive parts of fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (1), 12-18.
- Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Mariotti, F., Federici, E., Montedoro, G. F. (1998). Effect of malaxation under N<sub>2</sub> flush on phenolic and volatile compounds of virgin olive oil. En: J. Sánchez, E. Cerdá-Olmedo y E. Martínez-Force (Eds.), *Advances in plant lipid research: The proceedings of the 13<sup>th</sup> international symposium on plant lipids* (pp. 307- 310). Sevilla, España: Universidad de Sevilla.
- Servili, M., Esposito, S., Lodolini, E., Selvaggini, R., Taticchi, A., Urbani, S., Montedoro, G., Serravalle, M., Gucci, R. (2007b). Irrigation effects on quality, phenolic composition, and selected volatiles of virgin olive oils cv. Leccino. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (16), 6609-6618.
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposito, S., Taticchi, A., Montedoro, G., Morozzi, G. (2004). 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*, 1054 (1-2), 113-127.

- Servili, M., Taticchi, A., Esposito, S., Urbani, S., Selvaggini, R., Montedoro, G. (2007a). Effect of olive stoning on the volatile and phenolic composition of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (17), 7028-7035.
- Servili, M., Taticchi, A., Esposito, S., Urbani, S., Selvaggini, R., Montedoro, G. (2008). Influence of the decrease in oxygen during malaxation of olive paste on the composition of volatiles and phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (21), 10048-10055.
- Shahidi, F., Naczk, M. (2004). *Phenolics in food and nutraceuticals*. Nueva York, USA: CRC Press.
- Sicari, V., Giuffrè, A. M., Louadj, L., Poiana, M. (2010). Evolution of phenolic compounds of virgin olive oil during 12 months storage. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 87 (2), 109-115.
- Silva, S., Gomes, L., Leitão, F., Bronze, M., Coelho, A. V., Boas, L. V. (2010). Secoiridoids in olive seed: Characterization of nüzhenide and 11-methyl oleosides by liquid chromatography with diode array and mass spectrometry. *Grasas y Aceites*, 61 (2), 157-164.
- Simpson, K. L. (1983). Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. *Proceedings of the Nutrition Society*, 42 (1), 7-17.
- Singh, A. P., Luthria, D., Wilson, T., Vorsa, N., Singh, V., Banuelos, G. S., Pasakdee, S. (2009). Polyphenols content and antioxidant capacity of eggplant pulp. *Food Chemistry*, 114 (3), 955-961.
- Sivakumar, G., Briccoli Bati, C., Uccella, N. (2005). HPLC-MS screening of the antioxidant profile of Italian olive cultivars. *Chemistry of Natural Compounds*, 41 (5), 588-591.
- Smil, V. (2000). *Feeding the world*. Cambridge, USA: MIT Press.
- Soler Cantero, A. (2009) *Estudio de la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Primeras etapas en el desarrollo de un aceite de oliva funcional*. M.P. Romero Fabregat y M.J. Motilva Casado (tut.). Tesis doctoral. Universitat de Lleida, Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària.
- Soler-Rivas, C., Espín, J. C., Wichers, H. J. (2000). Oleuropein and related compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80 (7), 1013-1023.
- Spadafora, A., Mazzuca, S., Chiappetta, F. F., Parise, A., Perri, E., Innocenti, A. M. (2008). Oleuropein-specific- $\beta$ -glucosidase activity marks the early response of olive fruits (*Olea europaea*) to mimed insect attack. *Agricultural Sciences in China*, 7 (6), 703-712.

- Spayd, S.E., Tarara, J.M., Mee, D.L., Ferguson, J.C. (2002). Separation of sunlight and temperature effects on the composition of *Vitis Vinifera* cv. Merlot berries. *American Journal of Enology and Viticulture*, 53, 171–182.
- Stefanouadaki, E., Williams, M., Chartzoulakis, K., Harwood, J. (2009). Effect of irrigation on quality attributes of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (15), 7048-7055.
- Suárez, M., Romero, M.P., Ramo, T., Macià, A., Motilva, M.J. (2009). Methods for preparing phenolic extracts from olive cake for potential application as food antioxidants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (4), 1463-1472.
- Schwartz, S. J., Lorenzo, T. V. (1991). Chlorophyll Stability During Continuous Aseptic Processing and Storage. *Journal of Food Science*, 56 (4), 1059-1062.
- Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A.M., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Determination of apolar and minor polar compounds and other chemical parameters for the discrimination of six different varieties of Tunisian extra-virgin olive oil cultivated in their traditional growing area. *European Food Research and Technology*, 231 (6), 965-975
- Tamendjari, A., Angerosa, F., Mettouchi, S., Bellal, M. M. (2009). The effect of fly attack (*Bactrocera oleae*) on the quality and phenolic content of Chemlal olive oil. *Grasas y Aceites*, 60 (5), 507-513.
- Thorsteinson, A. J. (1960). Host selection in phytophagous insects. *Annual Review of Entomology*, 5, 193-218.
- Torres, M. M., Maestri, D. M. (2006). Chemical composition of Arbequina virgin olive oil in relation to extraction and storage conditions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86 (14), 2311-2317.
- Tous, J., Romero, A. (1993). *Variedades del Olivo Especial referencia a Cataluña*. Barcelona, España: Fundación “La Caixa”, AEDOS.
- Tous, J., Romero, A. (1994). Aceites catalanes: Denominaciones de origen. En: *Olivicultura*. Barcelona, España: Fundación “La Caixa” Agrolatino, S.L.
- Tous, J., Romero, A., Plana, J., Guerrero, L., Díaz, I., Hermoso, J.F. (1997). Características químico-sensoriales de los aceites de oliva «Arbequina» obtenidos en distintas zonas de España. *Grasas y Aceites*, 48 (6), 415-424

- Tovar, M. J., Motilva, M. J., Luna, M., Girona, J., Romero, M. P. (2001a). Analytical characteristics of virgin olive oil from young trees (Arbequina cultivar) growing under linear irrigation strategies. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78 (8), 843-849.
- Tovar, M. J., Motilva, M. J., Romero, M. P. (2001b). Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under linear irrigation strategies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (11), 5502-5508.
- Tovar, M. J., Romero, M. P., Alegre, S., Girona, J., Motilva, M. J. (2002). Composition and organoleptic characteristics of oil from Arbequina olive (*Olea europaea* L) trees under deficit irrigation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82 (15), 1755-1763.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: Structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18 (1), 98-112.
- Tsimidou, M. Z., Georgiou, A., Koidis, A., Boskou, D. (2005). Loss of stability of "veiled" (cloudy) virgin olive oils in storage. *Food Chemistry*, 93 (3), 377-383.
- Tsiplakou, E., Kotrotsios, V., Hadjigeorgiou, I., Zervas, G. (2010). Differences in sheep and goats milk fatty acid profile between conventional and organic farming systems. *Journal of Dairy Research*, 77 (3), 343-349.
- Tura, D., Failla, O., Pedò, S., Gigliotti, C., Bassi, D., Serraiocco, A. (2008). Effects of seasonal weather variability on olive oil composition in northern Italy. *Acta Horticulturae*, 791, 769-776.
- Uceda, M., Beltrán, G., Jiménez, A. (2005). Composición del aceite (Banco de Germoplasma de Córdoba). En: L. Rallo, D. Barranco, J.M. Caballero, C. Del Río, A. Martín, J. Tous, M.I. Trujillo (Eds.), *Varietades del Olivo en España (Libro II: Variabilidad y selección)*. Madrid, España: Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa.
- Uceda, M., Hermoso, M., Frías, L. (1994). Factores que influyen en la calidad del aceite de oliva. *I. Simposio Científico-Técnico. Expo-Oliva 89*, Jaén.
- Uceda, M., Aguilera, M.P., Jiménez, A., Beltrán, G. (2010). Varietades de olivo y aceituna. Tipos de aceites. En: A. Fernández-Gutiérrez, A. Segura- Carretero (Eds.), *El aceite de oliva virgen: Tesoro de Andalucía* (pp. 109-137). Sevilla, España: Fundación Unicaja.
- Uceda, M. (2004). La calidad del aceite de oliva. En: D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo (Eds.), *El cultivo del olivo* (5ª ed, pp. 684-800). Madrid, España: Mundi-Prensa.

- U.E. (1991). Reglamento (CE) Nº 2568/1991 de la Comisión de 11 de julio de 1991, relativo a las características de los aceites de oliva de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. Diario Oficial de la Unión Europea L248 de 05/09/1991, pp. 1-114.
- Valavanidis, A., Vlachogianni, T., Psomas, A., Zovoili, A., Siatis, V. (2009). Polyphenolic profile and antioxidant activity of five apple cultivars grown under organic and conventional agricultural practices. *International Journal of Food Science and Technology*, 44 (6), 1167-1175.
- Vallverdú-Queralt, A., Medina-Remón, A., Casals-Ribes, I., Amat, M., Lamuela-Raventós, R. M. (2011). A metabolomic approach differentiates between conventional and organic ketchups. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (21), 11703-11710.
- Vázquez-Roncero, A., Janer del Valle, C., Janer del Valle, L. (1973). Determinación de los polifenoles totales. *Grasas y Aceites*, 24, 350-357.
- Vega-Zamora, M., Parras-Rosa, M., Torres-Ruiz, F. J., Murgado-Armenteros, E.M. (2011). Los factores impulsores e inhibidores del consumo de alimentos ecológicos en España. El caso del aceite de oliva. *Interciencia*, 36 (3), 178-184.
- Vierhuis, E., Servili, M., Baldioli, M., Schols, H. A., Voragen, A. G. J., Montedoro, G. (2001). Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds and polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (3), 1218-1223.
- Vinha, A. F., Ferreres, F., Silva, B. M., Valentão, P., Gonçalves, A., Pereira, J. A., Oliveira, M. B., Seabra, R. M., Andrade, P. B. (2005). Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, 89 (4), 561-568.
- Vishwakarma, S. L., Bagul, M. S., Ranjani, M., Goyal, R. K. (2004). A sensitive HPTLC method for estimation of swertiamarin in *Ebicostemma littorale* Blume, *Swertia chirata* (Wall) Clarke, and in formulations containing *E. littorale*. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 17 (2), 128-131.
- Visioli, F., Galli, C. (1994). Oleuropein protects low density lipoprotein from oxidation. *Life Sciences*, 55 (24), 1965-1971.
- Vlahov, G. (1992). Flavonoids in three olive (*Olea europaea*) fruit varieties during maturation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58 (1), 157-159.

- Wang, S. Y., Chen, C. T., Sciarappa, W., Wang, C. Y., & Camp, M. J. (2008). Fruit quality, antioxidant capacity, and flavonoid content of organically and conventionally grown blueberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (14), 5788-5794.
- Warman, P. R., Havard, K. A. (1998). Yield, vitamin and mineral contents of organically and conventionally grown potatoes and sweet corn. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 68 (3), 207-216.
- Weibel, F. P., Bickel, R., Leuthold, S., Alföldi, T., Niggli, U. (1999). Are organically grown apples tastier and healthier? A comparative field study using conventional and alternative methods to measure fruit quality. *Acta Horticulturae*, 517, 417-426.
- Whetten, R., Sederoff, R. (1995). Lignin biosynthesis. *The Plant Cell*, 7 (7), 1001-1013.
- Willer, H. (2010a). *Organic agriculture world-wide: Current statistics*. Frick Bonn, Alemania: FiBL-IFOAM.
- Willer, H. (2010b). Organic farming in Europe. An overview. En *The world of organic agriculture. statistics & emerging trends 2010*. (pp. 135-150). Frick Bonn, Alemania: FiBL-IFOAM.
- Winkel-Shirley, B. (2002). Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 5 (3), 218-223.
- Woese, K., Lange, D., Boess, C., Bögl, K. W. (1997). A comparison of organically and conventionally grown foods-results of a review of the relevant literature. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74 (3), 281-293.
- Worthington, V. (2001). Nutritional quality of organic versus conventional fruits, vegetables, and grains. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 7 (2), 161-173.
- Wunderlich, S. M., Feldman, C., Kane, S., Hazhin, T. (2008). Nutritional quality of organic, conventional, and seasonally grown broccoli using vitamin C as a marker. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 59 (1), 34-45.
- Yorulmaz, A., Tekin, A., Turan, S. (2011). Improving olive oil quality with double protection: Destoning and malaxation in nitrogen atmosphere. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113 (5), 637-643.
- Young, J. E., Zhao, X., Carey, E. E., Welte, R., Yang, S. S., Wang, W. (2005). Phytochemical phenolics in organically grown vegetables. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49 (12), 1136-1142.

Yousfi, K., Cayuela, J. A., García, J. M. (2009). Effect of temperature, modified atmosphere and ethylene during olive storage on quality and bitterness level of the oil. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86 (3), 291-296.

Zagobelny, M., Bak, S., Rasmussen, A. V., Jørgensen, B., Naumann, C. M., Møller, B. L. (2004). Cyanogenic glucosides and plant-insect interactions. *Phytochemistry*, 65 (3), 293-306.

