

UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS

Departamento de Química



**INFLUENCIA DEL ENTORNO AGROCLIMÁTICO
SOBRE LA CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA.
NUEVAS ESTRATEGIAS PARA SU
CONSERVACIÓN Y PARA EL
APROVECHAMIENTO DE LOS SUBPRODUCTOS
DE LA INDUSTRIA OLEÍCOLA**

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Simón Adrover Obrador

Dirigida por:

Dr. D. Antoni Femenia Marroig

Dra. Dña. Carme Garau Taberner

Palma de Mallorca, 2014



Universitat de les Illes Balears
Departamento de Química

DR. ANTONI FEMENIA MARROIG, CATEDRÁTICO DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSITAT DE LES ILLES BALEARS Y, DRA. M^a CARME GARAU TABERNER, JEFA DE LA SECCIÓN DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y FORMACIÓN AGRARIA Y PESQUERA DE LAS ISLAS BALEARES.

CERTIFICAN: que la memoria titulada ‘Influencia del entorno agroclimático sobre la calidad del aceite de oliva. Nuevas estrategias para su conservación y para el aprovechamiento de los subproductos de la industria oleícola’, ha sido desarrollada por Simón Adrover Obrador, bajo nuestra dirección en el grupo de investigación de Ingeniería Agroalimentaria para optar al grado de Doctor en Ciencia y Tecnología Química por la Universitat de les Illes Balears con mención europea.

Palma de Mallorca, a 6 de marzo de 2014.

Fdo. Dr. Antoni Femenia Marroig

Fdo. Dra. M^a Carme Garau Taberner

*Als meus pares i germans,
per confiar sempre en jo.*

*A na Marga i en Pau,
per existir.*

Amb aquestes paraules vull donar les gràcies a totes i cadascuna de les persones que, d'una manera o altra, m'han ajudat a fer possible que aquesta tesi sigui una realitat.

En primer lloc, als meus directors de tesi, per dipositar la seva confiança en mi. Al Dr. Antoni Femenia, per la seva dedicació, valuosa ajuda i contínua col·laboració durant aquesta investigació. A la Dra. Carme Garau, per tot el seu esforç, consells i recolzament.

A les Dra. Carmen Rosselló i Dra. Susana Simal, pel seu interès, ajut i estímul en qualsevol moment, bons i dolents.

Al Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentación (INIA), por la beca predoctoral FPI-INIA concedida para la realización de esta tesis.

Al Ministerio de Economía y Competitividad, por el apoyo económico recibido mediante los proyectos AGL2012-34627 y DPI2012-34766-C3-C2.

A la meva companya de laboratori, Reyes... per tots i cadascun dels moments viscuts durant aquests anys. Ara ja puc dir, encara que no t'ho pensis, que tot aquest projecte no hauria estat possible sense la teva ajuda.

A na Valeria, n'Àfrica, n'Oscar i en Rafa, per compartir experiències des d'un principi, pels consells i bons moments que hem viscut junts. A n'Esperança, na Xesca, i na Xisca, per donar un aire fresc al laboratori.

Al personal del Servei de l'Institut de Recerca i Formació Agrària i Pesquera del Govern de les Illes Balears (IRFAP), per ajudar-me i acollir-me com a un membre més del grup i per fer tot el possible per a què això tingui una continuïtat i no quedi com un simple llibre de prestatgeria.

A la Dra. Alessandra Bendini, por darme la oportunidad de realizar una estancia pre-doctoral en el grupo de Investigación del 'Dipartimento di Science Degli Alimenti' de la Universidad de Bolonia. Y en especial a Giuseppe, por ayudarme y aconsejarme durante la estancia en Cesena.

A mon pare Guillem i a ma mare Maria, pels seus esforços per fer de jo el que som i donar-me l'oportunitat d'arribar fins aquí, sense ells això no seria possible. Als meus germans Joan Toni i Margalida per recolzar-me en tot moment.

En especial a tú, Marga, per estimar-me i confiar en jo. I ara ja ho puc dir... a tú, Pau, per donar-me l'empenta necessària per acabar aquest projecte.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABLAS	XVI
RESUMEN.....	1
RESUM.....	9
ABSTRACT	17
1. INTRODUCCIÓN	27
1.1. Cultivo, producción y variedades de aceitunas en Mallorca.....	29
1.1.1. Variedades de aceitunas incluidas en la DO “Oli de Mallorca”	30
1.2. Elaboración del aceite de oliva	33
1.2.1. Operaciones preliminares: recolección, transporte, almacenamiento y lavado del fruto	33
1.2.2. Preparación de la pasta: molturación y batido.....	36
1.2.3. Extracción del aceite de oliva.....	39
1.2.4. Almacenamiento.....	42
1.3. Composición química del aceite de oliva	42
1.3.1. Fracción saponificable	42
1.3.2. Fracción insaponificable	44
1.4. Calidad del aceite de oliva	60
1.4.1. Parámetros físico-químicos de calidad	60
1.4.2. Análisis sensorial del aceite de oliva	61
1.5. Conservación del aceite de oliva	64
1.5.1. Factores físicos a tener en cuenta durante el almacenamiento del aceite de oliva.....	66
1.5.2. Factores químicos a tener en cuenta durante el almacenamiento del aceite de oliva	68
1.6. Subproductos de la industria agroalimentaria	72
1.6.1. Los subproductos de almazara	72

1.6.2. Alternativas para la gestión de los residuos	74
1.6.3. Técnicas de obtención de extractos fenólicos	77
1.6.3.1. Técnicas tradicionales de extracción y análisis	77
1.6.3.2. Nuevas tendencias en las técnicas de extracción	79
1.7. Utilización de los ultrasonidos de potencia en la industria alimentaria.....	82
1.7.1. Ultrasonidos de potencia.....	82
1.7.1.1. Equipos	86
1.7.2. Aplicaciones de los US de potencia en la industria alimentaria.....	87
1.7.3. Extracción sólido-líquido de compuestos bioactivos: uso de US de potencia	89
1.7.3.1. Proceso de extracción sólido-líquido asistido acústicamente.....	90
1.8. Optimización de procesos: metodología de superficie de respuesta	91
2. OBJETIVOS.....	95
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	99
3.1. Materia prima.....	99
3.1.1. Suelo	99
3.1.2. Aceitunas	99
3.1.3. Aceite de oliva.....	100
3.1.4. Orujo de almazara.....	101
3.2. Metodología.....	101
3.2.1. Sistemas de muestreo.....	101
3.2.1.1. Muestreo del suelo	101
3.2.1.2. Muestreo y recogida de aceituna.	102
3.2.2. Elaboración del aceite de oliva. Sistema Abencor.....	103
3.3. Diseño experimental.....	104
3.3.1. Influencia de la variedad, el grado de maduración y la procedencia geográfica sobre las características físico-químicas y sensoriales de aceites de oliva virgen extra.	105
3.3.1.1. Efecto de la variedad y del grado de maduración de las aceitunas sobre la calidad del aceite de oliva.....	105

3.3.1.2. Efecto de la procedencia geográfica y del estado de maduración de las aceitunas sobre la calidad del aceite de oliva	106
3.3.2. Evaluación de diferentes metodologías de conservación del aceite de oliva virgen extra	106
3.3.3. Extracción sólido-líquido de compuestos bioactivos asistida mediante ultrasonidos de potencia	108
3.3.3.1. Equipo extractor: sonda de ultrasonidos de potencia	108
3.3.3.2. Determinación de la potencia de ultrasonidos. Estudio calorimétrico.	109
3.3.3.3. Estudio del efecto de la potencia de ultrasonidos y relación disolvente/soluto sobre el proceso de extracción	110
3.4. Análisis químicos	113
3.4.1. Parámetros agronómicos: Índice de madurez	113
3.4.2. Parámetros de calidad	114
3.4.2.1. Grado de acidez	114
3.4.2.2. Índice de Peróxidos	115
3.4.2.3. Prueba espectrofotométrica en el ultravioleta	115
3.4.2.4. Análisis sensorial	116
3.4.3. Determinación de los ácidos grasos	117
3.4.4. Determinación de las coordenadas de color (CIELab)	119
3.4.5. Estabilidad oxidativa. Método Rancimat	120
3.4.6. Caracterización de la fracción fenólica y de la capacidad antioxidante	122
3.4.6.1. Extracción de la fracción fenólica	122
3.4.6.2. Fenólicos totales	123
3.4.6.3. Perfil fenólico. HPLC	124
3.4.6.4. Capacidad Antioxidante	125
3.4.8. Análisis de textura y fertilidad de los suelos	128
3.4.8.1. Textura	128
3.4.8.2. Fertilidad	129
3.5. Tratamiento estadístico	130

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	135
4.1. Influencia de la variedad, el grado de madurez y la procedencia geográfica de las aceitunas sobre la calidad del aceite de oliva producido.....	135
4.1.1. Influencia de la variedad y grado de madurez (RI)	135
4.1.1.1. Parámetros de calidad	136
4.1.1.2. Perfil de ácidos grasos	140
4.1.1.3. Color	143
4.1.1.4. Compuestos fenólicos	145
4.1.1.5. Capacidad antioxidante	150
4.1.1.6. Estabilidad oxidativa.....	152
4.1.1.7. Análisis sensorial	154
4.1.1.8. Análisis estadístico multivariable.....	159
4.1.2. Influencia de los factores agroclimáticos y del estado de madurez de las aceitunas sobre la calidad del aceite de oliva.....	164
4.1.2.1. Parámetros agroclimáticos	164
4.1.2.2. Parámetros de calidad del aceite de oliva obtenido	166
4.1.2.3. Perfil de ácidos grasos	170
4.1.2.4. Color	172
4.1.2.5. Fenólicos totales, capacidad antioxidante y estabilidad oxidativa.....	174
4.1.2.6. Análisis estadístico multivariable.....	177
4.2. Conservación del aceite de oliva. Influencia de las variables de operación: atmosfera, luz, temperatura y ultrasonidos de potencia	184
4.2.1. Caracterización físico-química y sensorial de los aceites de oliva iniciales y los aceites pre-tratados con US de potencia.....	184
4.2.1.1. Aceite de oliva monovarietal procedente de la variedad <i>arbequina</i>	185
4.2.1.2. Aceite de oliva monovarietal procedente de la variedad <i>empeltre</i>	187
4.2.2. Evolución de los parámetros físico-químicos del aceite de oliva virgen extra durante el periodo de conservación	189
4.2.2.1. Evolución del grado de acidez (GA).....	189
4.2.2.2. Evolución del índice de peróxidos (IP).....	193

4.2.2.3. Evolución del coeficiente de extinción K_{232}	195
4.2.2.4. Evolución del coeficiente de extinción K_{270}	197
4.2.3. Evolución del perfil de ácidos grasos	200
4.2.4. Evolución de los componentes fenólicos durante la conservación del aceite de oliva	206
4.2.5. Evolución de la estabilidad oxidativa durante la conservación del aceite de oliva.....	209
4.2.6. Evolución del análisis organoléptico del aceite de oliva virgen durante el período de conservación	211
4.2.6.1. Variedad <i>arbequina</i>	212
4.2.6.2. Variedad <i>empeltre</i>	216
4.2.7. Otras observaciones relevantes: cristalización de las muestras durante el período de conservación a baja temperatura.....	225
4.3. Aprovechamiento de los subproductos de almazara. Extracción de compuestos bioactivos asistida acústicamente	228
4.3.1. Efecto de los US de potencia sobre la extracción de compuestos fenólicos del orujo de almazara	228
4.3.2. Aplicación del diseño experimental.....	229
4.3.3. El ajuste de los modelos de superficie de respuesta	232
4.3.3.1. Extracción de compuestos fenólicos.....	235
4.3.3.2. Capacidad Antioxidante	236
4.3.4. Superficies de respuesta	239
4.3.4.1. Efecto de las variables de extracción sobre los fenólicos totales.....	239
4.3.4.2. Efecto de las variables de extracción sobre la capacidad antioxidante	241
4.3.5. Optimización de las condiciones de extracción.....	246
5. CONCLUSIONES	251
6. RECOMENDACIONES	261
7. NOMENCLATURA	265
8. BIBLIOGRAFÍA	271
9. CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA ASOCIADA AL DESARROLLO DE LA TESIS	296

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

Figura 1.1.	Paisaje característico de la Sierra de Tramuntana.....	28
Figura 1.2.	Zonas de Mallorca.....	29
Figura 1.3.	Aceituna de la variedad empeltre.....	31
Figura 1.4.	Aceituna de la variedad arbequina.	32
Figura 1.5.	Aceituna de la variedad picual.....	32
Figura 1.6.	Esquema del sistema de extracción del aceite de oliva de tres fases	40
Figura 1.7.	Esquema del sistema de extracción del aceite de oliva de dos fases	41
Figura 1.8.	Estructura de las clorofilas a y b	54
Figura 1.9.	Esquema de los carotenos (a) (β -caroteno) y xantofilas (b) (luteína)	55
Figura 1.10.	Estructura del β -sisterol.....	56
Figura 1.11	Estructura del α -tocoferol.....	58
Figura 1.12.	Clasificación de las ondas acústicas en función de la frecuencia.	83
Figura 1.13.	Crecimiento de las burbujas de cavitación en el seno de un líquido sobre el que se aplican ultrasonidos de potencia(García-Pérez, 2007).....	85
Figura 1.14.	Formación de microjets en una interfase sólido-líquido como consecuencia del fenómeno de cavitación producido por la aplicación de ultrasonidos de potencia (González-Centeno, 2013)..	85
Figura 1.15.	Figura y esquema de un tanque de US	86
Figura 1.16.	Figura y esquema de una sonda de US.....	86

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 3.1.	Aceituna de la variedad arbequina según el grado de maduración seleccionado.....	100
Figura 3.2	Diagrama de muestreo de suelo en el olivar	102
Figura 3.3	Diagrama de muestreo de aceituna en el olivar. (x = car riles muestreados).....	102
Figura 3.4	Extracción del aceite de oliva mediante el sistema Abencor.....	103
Figura 3.5	Localización de los olivares objeto de estudio.	106

Figura 3.6	Planificación experimental correspondiente al estudio de las metodologías de conservación para el aceite de oliva de las variedades arbequina y empeltre.....	107
Figura 3.7	Equipo extractor con la sonda de ultrasonidos (González-Centeno, 2013).....	109
Figura 3.8	Esquema correspondiente al estudio del efecto de la potencia de ultrasonidos, el grado de dilución de la muestra y el tiempo de extracción sobre el proceso de extracción sólido-líquido de compuestos bioactivos del orujo de almazara.....	110
Figura 3.9	Espectrofotómetro UV-Visible, Cary 300 Bio.	116
Figura 3.10	Hoja reglamentaria para realizar la cata de aceites	117
Figura 3.11	Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A.....	118
Figura 3.12	Diagrama de las coordenadas de color en el espacio CIELab	119
Figura 3.13	Colorímetro Minolta CM-5.....	120
Figura 3.14	Equipo para determinar la estabilidad oxidativa. Modelo Rancimat 743	121
Figura 3.15	Esquema de la extracción de la fracción fenólica del aceite de oliva ...	123
Figura 3.16	Espectrofotómetro UV/Vis (MultiSkan Spectrum. Thermo Scientific.....	124
Figura 3.17	HPLC HP1100 Series.....	125
Figura 3.18	Principio químico del método ABTS (adaptado de Huang et al., 2005).....	126
Figura 3.19	Principio químico del método CUPRAC (adaptado de Huang et al., (2005)	127
Figura 3.20	Principio químico del método FRAP (adaptado de Huang et al.(2005).....	128
Figura 3.21	Textura del suelo. Clasificación USDA.	129
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN		
Figura 4.1	Fenólicos totales en aceites elaborados a partir de aceitunas de las variedades <i>arbequina</i> , <i>picual</i> y <i>empeltre</i> en diferente estado de madurez.	146

Figura 4.2	Estabilidad oxidativa de aceites de oliva elaborados a partir de aceitunas de las variedades <i>arbequina</i> , <i>picual</i> y <i>empeltre</i> en diferente estado de madurez	153
Figura 4.3	Evolución de los atributos positivos de los aceites elaborados a partir de aceitunas de la variedad <i>arbequina</i> de diferentes grado de madurez.	155
Figura 4.4	Evolución de los atributos positivos de aceites de la variedad <i>picual</i> elaborados a partir de aceitunas de diferentes grado de madurez.	157
Figura 4.5	Evolución de los atributos positivos de aceites de la variedad <i>empeltre</i> elaborados a partir de aceitunas de diferentes grado de madurez.	158
Figura 4.6	Representación gráfica de la distribución de las diferentes variables elegidas para realizar el análisis de componentes principales: CP1 vs. CP2.....	161
Figura 4.7	Análisis de componentes principales. Representación de las muestras de aceite procedente de las variedades <i>arbequina</i> , <i>picual</i> y <i>empeltre</i> de diferentes grados de madurez en función de CP1 y CP2.....	161
Figura 4.8	Representación gráfica de la distribución de las diferentes variables elegidas para realizar el análisis de componentes principales: CP1 vs. CP3.....	163
Figura 4.9	Análisis de componentes principales. Representación de las muestras de aceite de oliva procedente de las variedades <i>arbequina</i> , <i>picual</i> y <i>empeltre</i> de diferentes grados de madurez en función del primer (CP1) y tercer (CP3) componente principal	163
Figura 4.10	Representación gráfica de la distribución de las diferentes variables elegidas para realizar el análisis de componentes principales: CP1 vs. CP2.....	180
Figura 4.11	Representación de las muestras de aceite de oliva procedente de la variedad <i>arbequina</i> , en diferentes condiciones agroclimáticas como función del primer (CP1) y del segundo (CP2) componente principal.....	180
Figura 4.12	Representación gráfica de la distribución de las diferentes variables elegidas para realizar el análisis de componentes principales: CP1 vs. CP3.....	182

Figura 4.13	Representación de las muestras de aceite de oliva procedente de la variedad <i>arbequina</i> en diferentes condiciones agroclimáticas en función del primer (CP1) y del tercer (CP3) componente principal.....	182
Figura 4.14	Clasificación de los atributos positivos (A) y defectos (B) para los aceites de la variedad <i>arbequina</i> , inicial y tratado con US, según el Panel Oficial de Cata de Cataluña.....	186
Figura 4.15	Clasificación de los atributos positivos (A) y defectos (B) para los aceites de la variedad <i>empeltre</i> , inicial y tratado con US, según el Panel Oficial de Cata de Cataluña.....	188
Figura 4.16	Evolución del GA con el tiempo de almacenamiento para las diferentes metodologías de conservación aplicadas al aceite de oliva procedente de la variedad <i>arbequina</i>	190
Figura 4.17	Evolución del GA con el tiempo de almacenamiento para las diferentes metodologías de conservación aplicadas al aceite de oliva procedente de la variedad <i>empeltre</i>	191
Figura 4.18	Evolución del IP con el tiempo de almacenamiento para las diferentes metodologías de conservación aplicadas al aceite de oliva procedente de la variedad <i>arbequina</i>	194
Figura 4.19	Evolución del IP con el tiempo de almacenamiento para las diferentes metodologías de conservación aplicadas al aceite de oliva procedente de la variedad <i>empeltre</i>	195
Figura 4.20	Evolución del coeficiente de extinción K_{232} con el tiempo de almacenamiento para las diferentes metodologías de conservación aplicadas al aceite de oliva procedente de la variedad <i>arbequina</i>	196
Figura 4.21	Evolución del coeficiente de extinción K_{232} con el tiempo de almacenamiento para las diferentes metodologías de conservación aplicadas al aceite de oliva procedente de la variedad <i>empeltre</i>	197
Figura 4.22	Evolución del coeficiente de extinción K_{270} con el tiempo de almacenamiento para las diferentes metodologías de conservación aplicadas al aceite de oliva procedente de la variedad <i>arbequina</i>	198
Figura 4.23	Evolución del coeficiente de extinción K_{270} con el tiempo de almacenamiento para las diferentes metodologías de conservación aplicadas al aceite de oliva procedente de la variedad <i>empeltre</i>	199
Figura 4.24	Evolución del contenido en FT en función del tiempo de almacenamiento y de la metodología de conservación para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>arbequina</i>	207

Figura 4.25	Evolución del contenido en FT en función del tiempo de almacenamiento y de la metodología de conservación para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>empeltre</i>	208
Figura 4.26	Evolución de la estabilidad oxidativa durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>arbequina</i>	210
Figura 4.27	Evolución de la estabilidad oxidativa durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>empeltre</i>	211
Figura 4.28	Evolución del atributo frutado de aceituna durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>arbequina</i>	212
Figura 4.29	Evolución del atributo verde hoja durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>arbequina</i>	208
Figura 4.30	Evolución del atributo amargo durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>arbequina</i>	213
Figura 4.31	Evolución del atributo picante durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>arbequina</i>	214
Figura 4.32	Evolución del atributo dulce durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>arbequina</i>	215
Figura 4.33	Evolución del atributo frutado de aceituna durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>empeltre</i>	217
Figura 4.34	Evolución del atributo verde hoja durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>empeltre</i>	218
Figura 4.35	Evolución del atributo amargo durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>empeltre</i>	219
Figura 4.36	Evolución del atributo picante durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>empeltre</i>	219

Figura 4.37	Evolución del atributo dulce durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>empeltre</i>	221
Figura 4.38	Evolución del atributo astringente durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>empeltre</i>	221
Figura 4.39	Evolución de los otros atributos tolerables durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>empeltre</i>	222
Figura 4.40	Comparación de la cristalización para de aceite de oliva virgen extra de la variedad <i>arbequina</i> tratada con y sin US; a) muestra inicial; b) después de 4 meses de almacenamiento a 4 - 6°C de temperatura y b) después de 8 meses de almacenamiento a 4 - 6 ° C de temperatura.....	226
Figura 4.41	Comparación de la cristalización para de aceite de oliva virgen extra de la variedad <i>empeltre</i> tratada con y sin US; a) muestra inicial; b) después de 4 meses de almacenamiento a 4 - 6°C de temperatura y b) después de 8 meses de almacenamiento a 4 – 6 ° C de temperatura.....	227
Figura 4.42	Efecto de los ultrasonidos de potencia sobre la extracción de compuestos fenólicos (temperatura constante, 20 °C).....	229
Figura 4.43	Diagrama de Pareto correspondiente a la extracción de FT del orujo de almazara en función de las variables de proceso.....	236
Figura 4.44	Diagrama de Pareto para el modelo correspondiente a la capacidad antioxidante determinada mediante el método de CUPRAC en función de las variables de proceso.....	237
Figura 4.45	Diagrama de Pareto para el modelo correspondiente a la capacidad antioxidante determinada mediante el método de ABTS en función de las variables de proceso	238
Figura 4.46	Diagrama de Pareto para el modelo correspondiente a la capacidad antioxidante determinada mediante el método de FRAP en función de las variables de proceso	238

Figura 4.47	Superficies de respuesta para la extracción con asistencia acústica de FT del OOMW en función de (a) la potencia acústica vs. el grado de dilución (tiempo de extracción = 15 min; (b) la potencia acústica vs. el tiempo de extracción (grado de dilución = 15 mL/g y (c) el grado de dilución vs. el tiempo de extracción (potencia de US = 275 W/L).....	240
Figura 4.48	Superficies de respuesta para la capacidad antioxidante (CUPRAC) en los extractos asistido con US del OOMW en función de (a) la potencia acústicas vs. el grado de dilución (tiempo de extracción = 15 min; (b) la potencia acústica vs. el tiempo de extracción (grado de dilución = 15 mL/g y (c) el grado de dilución vs. el tiempo de extracción (potencia de US = 275 W/L).....	242
Figura 4.49	Superficies de respuesta para la capacidad antioxidante (ABTS) en los extractos asistido con US del OOMW en función de (a) la potencia acústicas vs. el grado de dilución (tiempo de extracción = 15 min; (b) la potencia acústica vs. el tiempo de extracción (grado de dilución = 15 mL/g y (c) el grado de dilución vs. el tiempo de extracción (potencia de US = 275 W/L).....	244
Figura 4.50	Superficies de respuesta para la capacidad antioxidante (FRAP) en los extractos asistido con US del OOMW en función de (a) la potencia acústicas vs. el grado de dilución (tiempo de extracción = 15 min; (b) la potencia acústica vs. el tiempo de extracción (grado de dilución = 15 mL/g y (c) el grado de dilución vs. el tiempo de extracción (potencia de US = 275 W/L).....	245

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1.	Datos de aceite de oliva elaborado en Mallorca durante las últimas cinco cosechas (Consejo Regulador DO “Oli de Mallorca”, 2013).....	30
Tabla 1.2.	Perfil de ácidos grasos (%) de aceite virgen extra procedente de diferentes variedades de aceituna (Rosselló <i>et al.</i> , 2003; Conde <i>et al.</i> , 2008).....	44
Tabla 1.3.	Principales ácidos benzoicos presentes en el aceite de oliva virgen extra.....	45
Tabla 1.4.	Principales ácidos cináricos presentes en el aceite de oliva virgen extra.....	45
Tabla 1.5.	Principales lignanos presentes en el aceite de oliva virgen extra.....	46
Tabla 1.6.	Principales flavonoides presentes en el aceite de oliva virgen extra.....	47
Tabla 1.7.	Principales alcoholes fenólicos identificados en el aceite de oliva virgen extra.....	48
Tabla 1.8.	Principales secoiridoides identificados en el aceite de oliva virgen extra.....	50
Tabla 1.9.	Efectos relevantes de los principales factores que influyen en la oxidación lípidica del aceite de oliva.....	71
Tabla 1.10.	Composición de los subproductos mayoritarios de la industria oleícola.....	73
Tabla 1.11.	Diseños experimentales de RSM más utilizados en la bibliografía relacionada con procesos de extracción de compuestos bioactivos en la industria agroalimentaria.....	92

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 3.1	Muestras de suelo.....	99
Tabla 3.2	Muestras de aceituna (<i>Olea europaea</i> L.).....	100
Tabla 3.3	Muestras de aceite de oliva.....	101
Tabla 3.4	Valores experimentales y codificados de las variedades independientes utilizados en el diseño de Box-Behnken.....	111
Tabla 3.5	Condiciones de extracción del diseño Box-Behnken.....	112

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.1	Contenido en aceite de las diferentes variedades de aceituna en función del grado de madurez.....	136
Tabla 4.2	Parámetros de calidad de los diferentes aceites monovarietales en función del grado de madurez de las aceitunas.....	137
Tabla 4.3	Perfil de ácidos grasos de aceites elaborados a partir de aceitunas de las variedades <i>arbequina</i> , <i>picual</i> y <i>empeltre</i> en diferente estado de madurez.....	141
Tabla 4.4	Coordenadas de color (CieLab*) de aceites elaborados a partir de aceitunas de las variedades <i>arbequina</i> , <i>picual</i> y <i>empeltre</i> en diferente estado de madurez	144
Tabla 4.5	Perfil fenólico de aceites de oliva elaborados a partir de aceitunas de las variedades <i>arbequina</i> , <i>picual</i> y <i>empeltre</i> en diferente estado de madurez.....	148
Tabla 4.6	Capacidad antioxidante de aceites de oliva elaborados a partir de aceitunas de las variedades <i>arbequina</i> , <i>picual</i> y <i>empeltre</i> en diferente estado de madurez	151
Tabla 4.7	Capacidad antioxidante de aceites de oliva elaborados a partir de aceitunas de las variedades <i>arbequina</i> , <i>picual</i> y <i>empeltre</i> en diferente estado de madurez	160
Tabla 4.8	Caracterización agroclimática (suelo, clima y paisaje) de los puntos geográficos de la Isla de Mallorca, origen de las aceitunas recogidas.....	165
Tabla 4.9	Parámetros de calidad de los aceites de la variedad <i>arbequina</i> en función del grado de madurez de la aceituna y de su procedencia geográfica	167
Tabla 4.10	Influencia del grado de madurez y de la procedencia geográfica sobre la composición de ácidos grasos del aceite de oliva.....	171
Tabla 4.11	Influencia del grado de madurez y de la procedencia geográfica sobre las coordenadas de color (espacio CieL*a*b*)	173
Tabla 4.12	Influencia del grado de madurez y la procedencia geográfica de las aceitunas sobre el contenido en FT, capacidad antioxidante y estabilidad oxidativa del aceite de oliva.....	175
Tabla 4.13	Análisis de componentes principales de los olivares-muestra. Contribución de las variables a los tres primeros componentes principales.....	179

Tabla 4.14	Caracterización inicial del aceite (<i>Arb</i>) con y sin tratamiento con US de potencia	185
Tabla 4.15	Caracterización inicial del aceite (<i>Emp</i>) con y sin tratamiento con US de potencia	187
Tabla 4.16	Evolución del perfil de ácidos grasos en función del tiempo de almacenamiento y de la metodología de conservación para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>arbequina</i>	202
Tabla 4.17	Evolución del perfil de ácidos grasos en función del tiempo de almacenamiento y de la metodología de conservación para el aceite de oliva procedente de la variedad <i>empeltre</i>	204
Tabla 4.18	Evolución de los defectos organolépticos durante el período de conservación	223
Tabla 4.19	Condiciones de extracción del diseño Box-Behnken.....	230
Tabla 4.20	Valores experimentales y calculados del contenido de FT, y de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de la extracción de orujo asistida mediante ultrasonidos de potencia	231
Tabla 4.21	ANOVA del DBB utilizado para la extracción de compuestos fenólicos, asistida con US, a partir del orujo de almazara.....	232

RESUMEN

El sector agroalimentario se ha dedicado, desde siempre, a la obtención de productos ligados a la tierra siguiendo las costumbres y las tradiciones que le son propias. En este sentido, la elaboración del aceite de oliva es un claro ejemplo de este tipo de productos. Las mejoras tecnológicas conjuntamente con los esfuerzos de las personas implicadas, cada vez más cualificadas, así como el control y la difusión de los Consejos Reguladores de las Denominaciones de Origen han dado como resultado una importante mejora en la calidad del aceite de oliva que se comercializa como aceite de oliva virgen extra.

En este contexto, en el presente trabajo se han propuesto varios objetivos. En una primera etapa, se procedió a evaluar la influencia de la variedad y del grado de madurez de las aceitunas, así como de los efectos agroclimáticos de suelo, clima y paisaje, sobre la calidad del aceite de oliva virgen extra. En una segunda etapa, el objetivo fue estudiar nuevas estrategias que permitan la mejora del proceso de conservación del aceite de oliva. Para ello se determinaron los efectos de la temperatura, la ausencia de luz y la utilización de una atmosfera modificada sobre la calidad del aceite de oliva. Además, como propuesta innovadora, también se evaluó el efecto de la eliminación parcial o total del oxígeno presente en la matriz del aceite de oliva mediante la aplicación de ultrasonidos (US) de potencia. Finalmente, la tercera y última línea de trabajo se centró en evaluar el posible aprovechamiento de los subproductos de almazara, como fuente de compuestos bioactivos. En concreto, se estudió la aplicación de los US de potencia como mecanismo para favorecer la extracción de compuestos antioxidantes a partir del orujo de almazara. El proceso de extracción se llevó a cabo utilizando un disolvente no tóxico y a baja temperatura, potenciando de esta forma el posible uso alimentario de los extractos como ingredientes funcionales.

En la primera fase del trabajo, se consideraron las variedades de aceituna autorizadas por la DO "Olí de Mallorca" (*arbequina*, *picual* y *empeltre*) recogidas manualmente en diferentes estados de madurez: verde (aceituna totalmente verde), en enero (aceituna mitad verde, mitad morada) y madura (aceituna totalmente morada). Se elaboraron los diferentes aceites mediante el sistema Abencor, y posteriormente se analizaron los principales parámetros físico-químicos de calidad: grado de acidez (GA), índice de peróxidos (IP) y coeficientes de extinción K_{232} y K_{270} , además de analizar el perfil de ácidos grasos, el perfil fenólico y el contenido en fenólicos totales (FT), la

capacidad antioxidante, la estabilidad oxidativa, y las coordenadas de color dentro del espacio CieLab. Por último, y para terminar de definir la calidad global del aceite de oliva también se llevó a cabo el análisis sensorial de todas las muestras. Mediante la aplicación de un análisis multivariable de los diferentes parámetros analizados se pudo visualizar la importancia tanto del efecto varietal como del estado de madurez de la aceituna, sobre las propiedades físico-químicas y organolépticas del aceite de oliva.

Todos los aceites analizados, tomando en consideración los parámetros de calidad que definen la categoría del aceite de oliva, independientemente del grado de madurez de las aceitunas de procedencia, se clasificaron dentro de la categoría virgen extra (de acuerdo con el Reglamento CEE 2568/91). No obstante, los parámetros GA y K_{270} experimentaron un ligero incremento a medida que aumentó el grado de madurez de las aceitunas. En cuanto al perfil de ácidos grasos de los diferentes aceites analizados, para una misma variedad de aceituna, no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los porcentajes de ácidos grasos como el oleico, el esteárico, el linolénico o el araquídico, presentes en los aceites obtenidos a partir de aceitunas de diferente grado de maduración. En cambio, sí hubo importantes diferencias en función de la variedad, siendo el aceite de oliva de la variedad *picual* el que exhibió los porcentajes más elevados de ácido oleico ($\sim 79\%$), seguido del aceite de la variedad *arbequina* ($\sim 67\%$) y de la variedad *empeltre* ($\sim 65\%$). No obstante, para los aceites de las distintas variedades analizadas, sí se apreció una ligera pero significativa disminución del porcentaje de ácido palmítico, durante el proceso de maduración de las aceitunas. En cambio, el ácido linoleico presentó una tendencia inversa al palmítico, incrementando ligeramente su porcentaje a medida que el aceite de oliva provenía de aceitunas más maduras. Como resultado de estos cambios en la composición de ácidos grasos, se detectó un ligero descenso en la relación entre ácidos grasos mono- y poliinsaturados (MUFA/PUFA) para todas las variedades de aceite analizadas.

Respecto a los valores de FT, capacidad antioxidante (analizada mediante las técnicas CUPRAC, ABTS y FRAP) y la estabilidad oxidativa, se observó como para las variedades *arbequina* y *picual*, estos parámetros presentaron valores máximos en aceites elaborados a partir de aceitunas en enero. Sin embargo para la variedad *empeltre*, se observó como el contenido en FT, así como la capacidad antioxidante y la estabilidad oxidativa disminuyeron a medida que aumentó el grado de madurez de las aceitunas. Las variedades estudiadas se caracterizaron por una elevada presencia de

compuestos fenólicos, en particular oleuropeína aglicona, luteolina aglicona, oleuropeína y pinosinol, siendo en general, e independientemente del grado de madurez, la variedad *empeltre* la que presentó los valores más elevados de estos compuestos.

Por otra parte, el análisis sensorial mostró como los atributos *frutado*, *amargo* y *picante* fueron los más característicos de los aceites de las variedades *arbequina* y *picual*, mientras que para la variedad *empeltre*, el atributo *amargo* fue el más representativo, en particular del aceite procedente de aceitunas en envero. En general, no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) para los diferentes atributos positivos a medida que aumentó el grado de madurez de las aceitunas. También es interesante destacar que no se detectara defecto alguno en ninguno de los aceites analizados.

Los tres tipos de aceites de oliva elaborados a partir de las variedades *arbequina*, *picual* y *empeltre* se distribuyeron en tres grupos diferenciados, como resultado de la aplicación del análisis de componentes principales (ACP) sobre las características físico-químicas y sensoriales de estos. Mediante el CP1, correlacionado positivamente con el atributo positivo de dulce y de forma negativa con los FT, los atributos *frutado*, *picante* y *astrigente* y la coordenada de color a^* , pudo explicarse un 45,8 % de la variabilidad total. Por su parte el CP2, representando un 19,8 % de dicha variabilidad, quedó definido positivamente por el GA y el parámetro K_{232} y negativamente por la estabilidad oxidativa y el ratio MUFA/PUFA. Adicionalmente, gracias al tercer componente principal (CP3) permitió recoger otro 12,8 % de la variabilidad total de la base de datos de los aceites de oliva objeto de estudio, presentando una correlación negativa con las variables de capacidad antioxidante (ABTS) y los FT y una correlación positiva con el IP, las coordenadas de color L^* y b^* y el parámetro C^* . Globalmente, los resultados indican que la recolección en la etapa del envero parece ser la más idónea para la elaboración del aceite de oliva, ya que en ella se llega a un mayor equilibrio entre los diferentes parámetros que determinan la calidad del aceite de oliva.

En esta primera etapa, también se evaluó el efecto que ejercen las características agroclimáticas del olivar sobre la calidad del aceite de oliva. Para este estudio, se consideraron tres olivares de edad similar, situados en diferentes puntos de la Isla de Mallorca, en los cuales predomina la variedad de aceituna *arbequina*. En cada uno de

ellos se tomaron muestras de aceituna en diferentes estados de madurez, así como muestras de suelo, y se registraron las condiciones climáticas y de paisaje.

Mediante la aplicación de un análisis multivariable, los tres primeros componentes principales resultantes de la aplicación de ACP identificaron conjuntamente los diferentes patrones de comportamiento de los olivares en base a sus condiciones agroclimáticas, explicando el 71 % de la varianza total de los parámetros analizados. Los resultados indicaron que los aceites de oliva elaborados en los olivares menos lluviosos y de mayor elevación sobre el nivel del mar fueron los que presentaron el contenido más alto en FT, mayor capacidad antioxidante y mayor estabilidad frente a la oxidación. En cambio, para un mismo olivar-muestra no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los aceites elaborados con aceitunas en diferente estado de madurez.

Como resultado de esta primera fase de la investigación se ha propuesto una metodología capaz de diferenciar entre aceites de oliva, elaborados a partir de una misma variedad de aceituna, con diferente procedencia geográfica, en función de las características físico-químicas de los aceites y de los atributos agroclimáticos de la zona, sin incluir el factor humano.

En la segunda etapa de este trabajo, se evaluaron diferentes estrategias para la conservación del aceite de oliva basadas en la utilización de una atmósfera inerte, ausencia de luz y baja temperatura, incorporando una nueva técnica, innovadora en este campo, basada en la aplicación de un pretratamiento con US de potencia, con el fin de desplazar el oxígeno disuelto en la matriz del aceite de oliva.

Este estudio se llevó a cabo con dos tipos de aceite de oliva virgen extra; un primer aceite caracterizado por su bajo GA bajo (0,15% ácido oleico), procedente de la variedad *arbequina*, y un segundo tipo, procedente de la variedad *empeltre*, caracterizado por un GA relativamente elevado (0,74% ácido oleico), próximo al límite legislado para la categoría virgen extra. En el estudio se determinaron los principales parámetros de calidad definidos en el Reglamento CEE 2568/91 (GA, IP y los coeficientes de extinción K_{232} y K_{270}), así como el perfil de ácidos grasos, el contenido en fenoles totales, la estabilidad oxidativa, y se llevó a cabo un exhaustivo análisis organoléptico tanto de los atributos positivos, como de los posibles atributos negativos, durante un período de conservación de 16 meses.

Antes de iniciar el estudio de conservación, se comprobó, a partir del análisis inicial de las muestras pretratadas con US de potencia, como dicho tratamiento no modificó de forma significativa las propiedades físico-químicas y sensoriales del aceite de oliva, lo cual permitió la incorporación de las muestras tratadas con esta nueva metodología al estudio de conservación.

A partir del estudio basado en el seguimiento de los diferentes parámetros físico-químicos y sensoriales de las muestras, durante un periodo de conservación de 16 meses, pudo observarse como en el caso de trabajar con un aceite de oliva con valores iniciales correspondientes a los parámetros de calidad muy por debajo de los límites establecidos para la categoría virgen extra (en particular, un bajo GA: 0,1-0,2 % ácido oleico), el hecho de conservar el aceite de oliva en condiciones que minimizan las reacciones de oxidación (atmósfera inerte, ausencia de luz, baja temperatura y/o mediante pretratamiento con US de potencia) no tuvo efectos significativos sobre la calidad del mismo, durante al menos un período de 16 meses.

Sin embargo, cuando el aceite de oliva virgen extra desde un principio no es de buena calidad (valores de los parámetros de calidad, sobretodo el GA, próximos al límite establecido por la categoría virgen extra), los procesos de conservación en atmósfera inerte o en ausencia de luz no fueron eficaces para el mantenimiento de la calidad del aceite de oliva como virgen extra, más allá de los cuatro meses de almacenamiento. En este caso, solo la conservación del aceite de oliva a baja temperatura (con y sin pretratamiento con US) consiguió que el aceite de oliva se mantuviera dentro de la categoría virgen extra, durante un período de como mínimo 12 meses.

También es interesante destacar, en el caso de las muestras almacenadas a baja temperatura con y sin pretratamiento con US de potencia, el hecho que las muestras pretratadas con pulsos ultrasónicos presentaran, en la parte final del periodo de almacenamiento, unos valores inferiores para el índice de peróxidos, una mayor estabilidad oxidativa y una mayor intensidad del atributo frutado.

La conservación del aceite de oliva a baja temperatura implica la aparición de un proceso cristalización de los triglicéridos que va en detrimento de la calidad del mismo. No obstante, en los estudios de conservación, llevados a cabo con las variedades *arbequina* y *empeltre*, se observó como las muestras pretratadas con US de potencia y

conservadas a baja temperatura, presentaron una significativa reducción del proceso de cristalización de los triglicéridos, durante el período de almacenamiento. Este descubrimiento, de claro interés industrial, dio lugar a la obtención de una patente (P25827ES00) con el fin de proteger la propiedad intelectual de esta nueva metodología.

Finalmente, en la tercera y última fase de la presente tesis doctoral, se evaluó el proceso de obtención de extractos, a partir del orujo de almazara, con un alto contenido en compuestos fenólicos y que presentaran una elevada capacidad antioxidante. La metodología aplicada para la extracción se basó en la aplicación US de potencia con la finalidad de mejorar la eficacia del proceso.

En un estudio inicial se comprobó como un aumento de la potencia de la sonda de US utilizada, provocaba un significativo aumento del contenido en compuestos fenólicos extraídos a partir del orujo de almazara, utilizando una solución etanol:agua (1:1, v/v), con un ratio disolvente/soluto de 15/1 (mL/g), un tiempo de extracción de 15 min y una temperatura de 20 °C.

Es interesante resaltar que la aplicación de los US de potencia permitió la utilización de una mezcla de disolventes de extracción no tóxicos y aptos para su uso en la industria alimentaria (mezcla etanol/agua (1:1, v/v)), obteniéndose porcentajes de extracción similares a los descritos en la bibliografía utilizando disolventes de gran poder extractor pero elevada toxicidad, como por ejemplo el metanol.

Con el fin de optimizar el proceso de extracción de compuestos bioactivos a partir del orujo de almazara se aplicó la metodología de superficie de respuesta (RSM), utilizando como variables la potencia de US, el ratio disolvente/soluto y el tiempo de extracción. Todas las experiencias se llevaron a cabo a una temperatura controlada de 20 °C, utilizando una mezcla etanol:agua (1:1, v/v) como disolvente.

Se utilizó un diseño tipo Box-Behnken (BBD) para evaluar el efecto de las variables independientes mencionadas: potencia de ultrasonidos ($X_1 = 175 - 375$ W/L), grado de ratio disolvente/soluto ($X_2 = 5 - 25$ mL/g) y tiempo de extracción ($X_3 = 27 - 3$ min).

Los datos experimentales obtenidos, mediante el BBD, relativos a la extracción de compuestos fenólicos (FT), así como los correspondientes a la capacidad

antioxidante de los extractos, determinada mediante las técnicas CUPRAC, y FRAP, se ajustaron de forma significativa a un modelo lineal ($p < 0,05$), capaz de explicar satisfactoriamente el comportamiento del sistema y de predecir las respuestas en el dominio experimental considerado. Por otra parte, para la capacidad antioxidante evaluada mediante la técnica ABTS, los datos experimentales obtenidos se ajustaron de forma significativa ($p < 0,05$) a un modelo cuadrático.

Las condiciones experimentales, resultantes de la aplicación de la RSM, que permitieron obtener el máximo rendimiento en FT, así como extractos de orujo de almazara que exhibieran la mayor capacidad antioxidante, fueron los siguientes: 375 W/L de potencia ultrasónica, 25 mL/g en la relación disolvente/soluto y un tiempo de extracción de 27 min.

La metodología establecida para la extracción de compuestos bioactivos a partir de orujo de almazara, mediante asistencia ultrasónica, permite la extracción de compuestos termolábiles a baja temperatura, utilizando un disolvente no tóxico y con un tiempo de extracción significativamente menor que el utilizado en los procesos de extracción convencional realizados con agitación mecánica.

Globalmente, el trabajo realizado durante la elaboración de esta Tesis Doctoral ha querido contribuir y apoyar, dentro de nuestras posibilidades, al sector oleícola de las Islas Baleares, y en particular a los productores y elaboradores de aceite de la Isla de Mallorca, mediante la caracterización del aceite de oliva procedente de las tres variedades autorizadas por la DO ‘Oli de Mallorca’ (*arbequina*, *picual* y *empeltre*) en función del grado de madurez de la aceituna y de los factores agroclimáticos propios de los olivares de Mallorca. Además, se ha puesto a disposición de los productores adscritos a la DO “Oli de Mallorca”, la nueva metodología de conservación del aceite de oliva, que permite el almacenamiento a baja temperatura preservando las propiedades físico-químicas y sensoriales del aceite, reduciendo de forma significativa, el proceso de cristalización de los triglicéridos. Finalmente, se ha intentado aportar un procedimiento, basado en la aplicación de los US de potencia, que permita el aprovechamiento de los residuos de almazara, contribuyendo de esta forma a la revalorización del producto.

RESUM

El sector agroalimentari s'ha dedicat, des de sempre, a l'obtenció de productes lligats a la terra seguint els costums i les tradicions que li són pròpies. En aquest sentit, l'elaboració de l'oli d'oliva és un clar exemple d'aquest tipus de productes. Les millores tecnològiques conjuntament amb els esforços de les persones implicades, cada vegada més qualificades, així com el control i la difusió dels Consells Reguladors de les Denominacions d'Origen han donat com a resultat una important millora en la qualitat de l'oli d'oliva que es comercialitza com oli d'oliva verge extra.

En aquest context, el present treball s'han proposat diversos objectius. En una primera etapa es va procedir a avaluar la influència de la varietat i del grau de maduresa de les olives, així com dels efectes agro-climàtics de sòl, clima i paisatge, sobre la qualitat de l'oli d'oliva verge extra. En una segona etapa, l'objectiu va ser el d'estudiar noves estratègies que permetin la millora del procés de conservació de l'oli d'oliva. Per a això es van determinar els efectes de la temperatura, l'absència de llum i la utilització d'una atmosfera modificada sobre la qualitat de l'oli d'oliva. A més, com a proposta innovadora, també es va avaluar l'efecte de l'eliminació parcial o total de l'oxigen present dintre de la matriu de l'oli d'oliva mitjançant l'aplicació d'ultrasons (US) de potència. Finalment, la tercera i darrera línia de treball, es va centrar en avaluar el possible aprofitament dels subproductes de la indústria oleícola, com a font de composts bioactius. En concret, es va estudiar l'aplicació d'US de potència com a mecanisme per afavorir l'extracció de compostos antioxidants a partir de la piolada. El procés d'extracció es va dur a terme a baixa temperatura i utilitzant un dissolvent no tòxic, potenciant d'aquesta forma el possible ús alimentari dels extractes com a ingredients funcionals.

En la primera fase del treball, es van considerar les varietats d'oliva autoritzades per la DO " Oli de Mallorca" (*arbequina*, *picual* i *empeltre*) recollides manualment en diferents estats de maduresa: verd (oliva totalment verda), semi madura (oliva meitat verd, meitat morada) i madura (oliva totalment morada). Els olis es van elaborar mitjançant el sistema Abencor, i, posteriorment, es van analitzar els principals paràmetres fisicoquímics de qualitat: grau d'acidesa (GA), índex de peròxids (IP) i coeficients d'extinció K_{232} i K_{270} , a més d'analitzar el perfil de àcids grassos, el perfil fenòlic i el contingut en fenòlics totals (FT), la capacitat antioxidant, l'estabilitat oxidativa, i les coordenades de color dins de l'espai CIELAB. Finalment, i per acabar de

definir la qualitat global de l'oli d'oliva també es va dur a terme l'anàlisi sensorial de totes les mostres. Mitjançant l'aplicació d'una anàlisi multivariable dels diferents paràmetres analitzats es va poder visualitzar la importància tant de l'efecte varietal com de l'estat de maduresa de l'oliva, sobre les propietats fisicoquímiques i organolèptiques de l'oli d'oliva.

Tots els olis analitzats, considerant els paràmetres de qualitat que defineixen la categoria de l'oli d'oliva, independentment del grau de maduresa de les olives de procedència, es van classificar dintre de la categoria verge extra (d'acord amb el Reglament CEE 2568/91). Malgrat això, en general els paràmetres GA i K_{270} van augmentar a mesura que el grau de maduresa de les olives augmentava. En quant al perfil d'àcids grassos dels diferents olis analitzats, per a una mateixa varietat d'oliva, no es van observar diferències significatives ($p < 0,05$) en els percentatges d'àcids grassos com l'oleic, l'estearic, el linolènic i l'araquídico presents en els olis obtinguts a partir d'olives de diferent grau de maduració. En canvi, si hi va haver importants diferències varietals, sent l'oli d'oliva de la varietat *picual* el que va exhibir els percentatges més elevats d'àcid oleic (~ 79%), seguit de l'oli de la varietat *arbequina* (~ 67%) i de la varietat *empeltre* (~ 65%). No obstant, per als olis de les diferents varietats analitzades, sí que es va apreciar una lleugera però significativa disminució del percentatge d'àcid palmític, durant el procés de maduració de les olives. En canvi, l'àcid linoleic, va presentar una tendència inversa al palmític, incrementant lleugerament el seu percentatge a mesura que l'oli d'oliva provenia d'olives més madures. Com a resultat d'aquests canvis en la composició d'àcids grassos, es va detectar un lleuger descens en la relació entre àcids grassos mono- i poli-insaturats (MUFA/PUFA) per a totes les varietats d'oli d'oliva analitzades.

Pel que fa als valors dels FT, capacitat antioxidant (analitzada mitjançant les tècniques CUPRAC, ABTS i FRAP) i l'estabilitat oxidativa, es van observar com, per a les varietats *arbequina* i *picual*, aquests paràmetres presentaren valors màxims en olis elaborats a partir d'olives semimadures. En canvi, per a la varietat *empeltre*, es va observar una disminució del contingut en FT, així com de la capacitat antioxidant i de l'estabilitat oxidativa mesura que va augmentar el grau de maduresa de les olives. Les varietats estudiades es van caracteritzar per una elevada presència de compostos fenòlics, en particular oleuropeïna aglicona, luteolina aglicona, oleuropeïna i

pinoresinol, essent en general, la varietat *empeltre* la que presentà els valors més elevats d'aquests compostos, independentment del grau de maduresa de les olives.

D'altra banda, l'anàlisi sensorial va mostrar com els atributs *fruitat d'oliva*, *amarg* i *picant* foren els més característics dels olis de les varietats *arbequina* i *picual*, mentre que per a la varietat *empeltre*, l'atribut *amarg* va ser el més representatiu, concretament per a l'oli procedent d'olives semimadures. En general, no s'observaren diferències significatives ($p < 0,05$) entre els diferents atributs positius a mesura que va augmentar el grau de maduresa de les olives. També és interessant destacar el fet que no es detectés cap defecte en cap dels olis analitzats.

Els tres tipus d'olis d'oliva elaborats a partir de les varietats *arbequina*, *picual* i *empeltre* es van distribuir en tres grups diferenciats, com a resultat de l'aplicació de l'anàlisi de components principals (ACP) sobre les característiques fisicoquímiques i sensorials dels diferents olis. Mitjançant el CP1, correlacionat positivament amb l'atribut positiu de *dolç* i de forma negativa amb els FT, els atributs *fruitat d'oliva*, *picant* i *astriгент* i la coordenada de color a^* , va poder explicar el 45,8 % de la variabilitat total. Per la seva banda el CP2, representant un 19,8 % d'aquesta variabilitat, quedà definit positivament pel GA i pel paràmetre K_{232} i negativament per l'estabilitat oxidativa i la relació MUFA/PUFA. Addicionalment, gràcies al tercer component principal (CP3) va permetre recollir un altre 12,8% de la variabilitat total de la base de dades dels olis d'oliva objecte d'estudi, presentant una correlació negativa amb les variables de capacitat antioxidant (ABTS) i els FT, i una correlació positiva amb l'IP, les coordenades de color L^* i b^* , i el paràmetre C^* . Globalment, els resultats indiquen que l'elaboració de l'oli d'oliva procedent d'olives semimadures sembla ser la més idònia, ja que en ella s'arriba a un major equilibri entre els diferents paràmetres que defineixen la qualitat de l'oli d'oliva.

En aquesta primera etapa, també es va avaluar l'efecte que exerceixen les característiques agroclimàtiques de l'olivarà sobre la qualitat de l'oli d'oliva. En aquest estudi, es van considerar 3 oliverars d'edat similar, situats en diferents punts de l'Illa de Mallorca, en els quals predomina la varietat d'oliva *arbequina*. En cada un d'ells es van prendre mostres d'oliva en diferents estats de maduresa, així com mostres de sòl, i es van registrar les condicions climàtiques i de paisatge .

Mitjançant l'aplicació d'una anàlisi multivariable, els tres primers components principals resultants de l'aplicació de ACP identificaren conjuntament els diferents trets diferenciadors dels oliverars en base a les seves condicions agroclimàtiques, explicant el 71% de la variància total dels paràmetres analitzats. Els resultats van indicar que els olis d'oliva elaborats a partir d'oliverars menys plujosos i de major elevació sobre el nivell del mar van ser els que presentaren el contingut més alt en FT, major capacitat antioxidant i major estabilitat davant l'oxidació. En canvi, per a un mateix oliverar-mostra no es van observar diferències significatives ($p > 0,05$) entre els olis elaborats amb olives en diferent estat de maduresa.

Com a resultat d'aquesta primera fase de la investigació s'ha proposat una metodologia capaç de diferenciar entre olis d'oliva, elaborats a partir d'una mateixa varietat d'oliva, en funció de les característiques fisicoquímiques dels olis i dels atributs agroclimàtiques de la zona, sense incloure-hi el factor humà.

Dins la segona etapa d'aquest treball, es van avaluar diferents estratègies per a la conservació de l'oli d'oliva basades en la utilització d'una atmosfera inert, absència de llum i baixa temperatura, a més d'incorporar una nova tècnica, innovadora en aquest camp, basada en l'aplicació d'un pretractament amb US de potència, per tal de desplaçar l'oxigen dissolt en la matriu de l'oli d'oliva i així minimitzar, encara més les reaccions d'oxidació.

Aquest estudi es va dur a terme amb dos tipus d'oli d'oliva verge extra, un primer oli caracteritzat pel seu baix GA (0,15% àcid oleic), procedent de la varietat *arbequina*, i un segon tipus, procedent de la varietat *empeltre*, caracteritzat per un GA relativament elevat (0,74% àcid oleic), el qual es troba pròxim al límit legislat per a la categoria verge extra. En l'estudi es van determinar els principals paràmetres de qualitat definits en el Reglament CEE 2568/91, (GA, IP i els coeficients d'extinció K232 i K270), així com el perfil d'àcids grassos, el contingut en fenols totals, l'estabilitat oxidativa, així com un exhaustiu anàlisi organolèptic tant dels atributs positius, com dels possibles atributs negatius, durant un període de conservació de 16 mesos.

Abans d'iniciar l'estudi de conservació, es va comprovar, a partir de l'anàlisi inicial de les mostres pretractades amb US de potència, com aquest tractament no va modificar de manera significativa les propietats fisicoquímiques i sensorials de l'oli

d'oliva, la qual cosa va permetre la incorporació de les mostres tractades amb aquesta nova metodologia a l'estudi de conservació .

A partir de l'estudi basat en el seguiment dels diferents paràmetres fisicoquímics i sensorials de les mostres, durant un període de conservació de 16 mesos, es va poder observar com en el fet de treballar amb un oli d'oliva amb valors inicials corresponents als paràmetres de qualitat molt per sota dels límits establerts per a la categoria verge extra (en particular un baix grau d'acidesa: 0,1-0,2 % àcid oleic), el fet de conservar l'oli d'oliva en condicions que minimitzin les reaccions d'oxidació (atmosfera inert, absència de llum, baixa temperatura i/o mitjançant un pretractament amb US de potència) no va tenir efectes significatius sobre la qualitat del mateix, durant almenys un període de 16 mesos .

Malgrat això, quan l'oli d'oliva verge extra des d'un principi no es de tan bona qualitat (valors dels paràmetres de qualitat, sobretot del grau d'acidesa, pròxim la límit establert per aquesta categoria), les metodologies de conservació en atmosfera inert o en absència de llum no van ser eficaces per al manteniment de la qualitat de l'oli d'oliva com verge extra, més enllà dels quatre mesos d'emmagatzematge. En aquest cas, només la conservació a baixa temperatura (amb i sense pretractament amb US) va aconseguir que l'oli d'oliva es mantingués dins de la categoria verge extra, almenys fins als 12 mesos.

També és interessant destacar, que en el cas de les mostres emmagatzemades a baixa temperatura amb i sense pretractament amb US, les mostres en les quals s'havia fet un pretractament amb polsos ultrasònics presentaren, al final del període d'emmagatzematge, uns valors inferiors per a l'índex de peròxids, una major estabilitat oxidativa, així com una major intensitat de l'atribut fruitat d'oliva.

A més, la conservació de l'oli d'oliva a baixa temperatura implica la cristallització dels triglicèrids, fet que va en detriment de la qualitat del mateix. En els estudis de conservació, duts a terme amb les varietats *arbequina* i *empeltre*, es va observar com les mostres pretractades amb US de potència i emmagatzemades a baixa temperatura, van presentar un menor grau de cristallització dels triglicèrids, al llarg del període de conservació. Aquest descobriment, de clar interès industrial, va donar lloc a l'obtenció d'una patent (P25827ES00) per tal de protegir la propietat intel·lectual d'aquesta nova metodologia .

Finalment, dins la darrera fase de la present tesi doctoral, es va avaluar el procés d'obtenció d'extractes, amb un alt contingut en compostos fenòlics i elevada capacitat antioxidant, a partir de la pinyolada, residu sòlid procedent de obtenció de l'oli d'oliva. La metodologia aplicada per a l'extracció es basà en l'aplicació US de potència amb la finalitat de millorar l'eficàcia del procés .

En un estudi inicial es va comprovar com un augment de la potència d'US, aplicat mitjançant una sonda d'ultrasons, provocava un augment significatiu del contingut en compostos fenòlics extrets a partir de la pinyolada, utilitzant com a dissolvent una solució etanol:aigua (1:1 , v/v) , amb una relació dissolvent/solut de 15/1 (mL/g), un temps d'extracció de 15 min i una temperatura controlada de 20 ° C.

És interessant remarcar que l'aplicació dels US de potència va permetre la utilització d'una barreja de dissolvents d'extracció no tòxics i aptes per al seu ús en la indústria alimentària, obtenint percentatges d'extracció semblants als descrits en la bibliografia utilitzant dissolvents de gran poder extractor, però elevada toxicitat, com el metanol.

Per tal d'optimitzar el procés d'extracció de compostos bioactius a partir d'aquest subproducte de tafona es va aplicar la metodologia de superfície de resposta (RSM), utilitzant com a variables la potència d'US, la relació dissolvent/solut i el temps d'extracció. Totes les experiències es van dur a terme a una temperatura controlada de 20 ° C , utilitzant una barreja etanol:aigua (1:1, v/v) com a dissolvent.

Es va aplicar un disseny tipus Box-Behnken (BBD) per avaluar l'efecte de les variables independents esmentades: potència d'ultrasons ($X_1 = 175-375 \text{ W / L}$), grau de dilució dissolvent/solut ($X_2 = 5-25 \text{ mL/g}$) i temps d'extracció ($X_3 = 3-27 \text{ min}$) .

Les dades experimentals obtingudes, mitjançant el BBD, relatives a l'extracció de compostos fenòlics (FT) , així com les corresponents a la capacitat antioxidant dels extractes, determinada mitjançant les tècniques CUPRAC i FRAP, es van ajustar de forma significativa amb un model lineal ($p < 0,05$), capaç d'explicar satisfactòriament el comportament del sistema i de preveure les respostes dins del domini experimental considerat. D'altra banda, per a la capacitat antioxidant avaluada mitjançant la tècnica ABTS, els valors experimentals obtinguts es van ajustar de forma significativa ($p < 0,05$) a un model quadràtic .

Les condicions experimentals, extretes de l'aplicació de la RSM, que maximitzaren el rendiment d'extracció de composts fenòlics, així com d'extractes que exhibissin la major capacitat antioxidant a partir de la pinyolada, van ser els següents: 375 W/L de potència ultrasònica , 25 ml/g en la relació dissolvent/solut i un temps d'extracció de 27 min .

La metodologia establerta per a l'extracció de compostos bioactius a partir de la residu sòlid de tafona, mitjançant assistència d'US de potencia, permet l'extracció de compostos termolàbils a baixa temperatura, utilitzant un dissolvent no tòxic i amb un temps d'extracció significativament menor que l'utilitzat en processos de extracció convencional realitzats amb agitació mecànica .

Globalment, el treball realitzat durant l'elaboració d'aquesta Tesi Doctoral ha volgut contribuir i donar suport, dintre de les nostres possibilitats, al sector oleícola de les Illes Balears, i en particular als productors i elaboradors d'oli de l'illa de Mallorca, mitjançant la caracterització de l'oli d'oliva procedent de les tres varietats autoritzades per la DO "Oli de Mallorca" (*arbequina*, *picual* i *empeltre*) en funció del grau de maduresa de l'oliva i dels factors agroclimàtiques propis dels olivars de Mallorca. A més, s'ha posat a disposició dels productors adscrits a la DO "Oli de Mallorca", la nova metodologia de conservació de l'oli d'oliva, que permet l'emmagatzematge a baixa temperatura preservant les propietats fisicoquímiques i sensorials de l'oli, i reduint, de manera significativa, el procés de cristallització dels triglicèrids. Finalment, s'ha intentat aportar un procediment, basat en l'aplicació dels US de potència, que permeti l'aprofitament dels residus d'aquesta indústria, contribuint d'aquesta manera a la revalorització del producte.

ABSTRACT

Historically, the food-processing sector has been focused on the development of products linked to the land, following their own customs and traditions. In this sense, the elaboration of the olive oil is a clear example of such products. The technological improvements, together with the efforts of the implied people, increasingly qualified, as well as the control and the diffusion of the Regulatory Councils of the Appellation of Origin (AO) have achieved an important improvement of the overall quality of the olive oil commercialized as extra virgin olive oil.

In this context, the present work has different objectives. Thus, on a first stage, the aim was to evaluate the influence of the olive's variety and ripening degree, as well as the influence of the agroclimatic conditions, including soil, climate and landscape, on the quality of the extra virgin olive oil. On a second stage, the objective was to develop new strategies in order to maintain the quality of the olive oil during the conservation process. Thus, the effects of different parameters such as low temperature, darkness and modified atmospheres on the quality of the olive oil were determined. In addition, as part of an innovative strategy, the effect of the partial or total elimination of the oxygen from the olive oil counterfoil by means of the application of power ultrasounds (US) was evaluated. Finally, the third objective was focused on the evaluation of the possible revalorization of by-products from olive oil mill waste, as a source of bioactive compounds. In particular, the application of power US to improve the extraction process of antioxidant compounds from the olive oil mill waste was investigated. The extraction process was carried out using a non-toxic solvent and at low temperature, promoting the possible use of the extracts as functional ingredients.

In the first phase of this work, the olive varieties authorized by the AOP "Oli de Mallorca" (*arbequina*, *picual* and *empeltre*), gathered manually at different states of maturity: green (green olives), in "*envero*" (half green and half purple olives) and mature (completely purple olive), were considered. The different oils were elaborated using the Abencor system, and the main physicochemical parameters were analyzed: free acidity (GA), peroxide index (IP) and extinction coefficients K_{232} and K_{270} . Moreover, the fatty acids profile, the total phenolic content (FT) and the phenolic profile, the antioxidant capacity, the oxidative stability, and the color coordinates (CieLab*) were also determined. Finally, in order to assess the global quality of the olive oil, a sensory analysis was also carried out. By means of a multivariable analysis

including all the analyzed parameters, the relative importance and the influence of, both, the olive variety as well as its maturity state, on the physicochemical and sensory properties of the olive oils could be established.

All the oils analyzed, considering the quality parameters that define the olive oil category, regardless of the maturity of the olives, were classified within the category of extra virgin (according to EEC Regulation 2568/91). However, the parameters GA and K270 underwent a slight increase as the maturity of the olives augmented. Regarding the fatty acids profile of the different oils analyzed, for the same olive variety, there were significant differences ($p < 0.05$) in the percentage of fatty acids such as oleic, stearic, linolenic and arachidic acids, present in the oils obtained from olives at different stages of maturation. In addition, there were important varietal differences, the *picual* olive oil exhibited the highest percentage of oleic acid ($\sim 79\%$), followed by *arbequina* ($\sim 67\%$) and *empeltre* ($\sim 65\%$) varieties. Also, for oils of the same variety, a slight but significant decrease in the percentages of palmitic acid was observed during the maturation process of the olives. In contrast, the linoleic acid, presented a reverse trend, increasing slightly as the olive oil was produced from riper olives. As a result of these changes in the fatty acid profile, a small but significant decrease was detected in the relationship between mono- and poly-unsaturated (MUFA/PUFA) fatty acids for all the olive oil samples.

Regarding to the results of FT, antioxidant capacity (analyzed by means of the CUPRAC, ABTS and FRAP methods) and the oxidative stability, the *arbequina* and *picual* varieties exhibited the maximum values for oils elaborated from olives in the “*envero*” ripening stage. However, the *empeltre* variety, showed a decrease on FT content, as well as on the antioxidant capacity and oxidative stability, as the olives ripening degree increased. All the studied varieties were characterized by a large presence of phenolic compounds, in particular, oleuropein aglycone, luteolin aglycone, oleuropein and pinoresinol, being, in general, the *empeltre* variety, the one that presented the highest values, regardless the olives ripening degree.

On the other hand, the sensory analysis showed as the fruity, bitter and piquant attributes were the most characteristics for the oils from *arbequina* and *picual* varieties, whereas for the *empeltre* variety, the bitter attribute was the most representative, especially in the oil produced from olives in “*envero*”. In general, no significant differences ($p < 0.05$) were observed for the different positive attributes as the olive

ripening degree increased. It is also interesting to highlight that no defects were detected in any of the analyzed oils.

The three types of olive oils elaborated from *arbequina*, *picual* and *empeltre* varieties were distributed in three differentiated groups, as a result of the application of the principal components analysis (ACP) on the physicochemical and sensory characteristics of the different oils. By means of the CP1, correlated positively with the sweet attribute and negatively with the FT, the fruity, piquant and astringent attributes, and the a* color coordinate, it could be explained the 45.8 % of the total variability. The CP2, representing 19.8 % of the above mentioned variability, was defined positively by the GA and the K₂₃₂ parameter and, negatively by the oxidative stability and the ratio MUFA/PUFA. In addition, the third principal component (CP3) could explain another 12.8 % of the total database variability of the studied oils, presenting a negative correlation with the antioxidant capacity (ABTS) and the FT variables and a positive correlation with the IP, the color coordinates L* and b* and the color parameter C*. Globally, these results indicate that the olives should be picked at the “*envero*” ripening stage, since a better balance among the different quality parameters is achieved.

At this first stage, the effect of the agroclimatic characteristics of the olive cultivar on the olive oil was also evaluated. For this study, three different olive cultivars of similar age, placed in different locations of Majorca Island, in which the *arbequina* variety was predominant, were considered. For each cultivar, olive samples were collected at different ripening stage, and, also, soil samples were taken. Finally, the climatic and landscape conditions were also registered.

By means of multivariable analysis, the three principal components, resulting from ACP's application, identified together the different standards of behavior of the olive cultivars on the basis of its agroclimatic conditions, explaining 71 % of the total variance of the analyzed parameters. The results indicated that olive oils elaborated from olives from cultivars with little rain and relatively high elevation over the sea level, were those which presented the highest FT content, antioxidant capacity and oxidation stability. On the other hand, for the same cultivar, no significant differences ($p > 0.05$) between the oils elaborated with olives at different ripening degrees were observed.

As a result of this first phase, a methodology was proposed, being capable to differentiate between olive oils elaborated from the same olive variety, with different

geographical origin, depending on the oil physicochemical characteristics and on the agro-climatic attributes of each geographical zone (excluding the human factor).

At the second stage of this research, different strategies were evaluated in order to improve the conservation process of olive oil. These strategies were based on: the utilization of an inert atmosphere, the absence of light and the use of low temperature. Moreover, a new strategy, innovative in this field, based on the application of a pretreatment with US power to remove the oxygen dissolved in the olive oil counterfoil was also considered.

This study was carried out with two types of extra virgin olive oil. The first oil was characterized by its low acidity degree (0.15 % oleic acid), produced from the *arbequina* variety; and the second one, produced from *empeltre* variety and characterized by a relatively high acidity degree (0.74 % oleic acid), close to the limit established for the extra virgin category. In this study, the main quality parameters defined on the European Regulation CEE 2568/91 (GA, IP and the extinction coefficients K_{232} and K_{270}), as well as the fatty acids profile, the total phenols content and the oxidative stability were monitored for 16 months. Also, a complete sensory analysis, for both positive and negative attributes, was also carried out during a conservation period of 16 months.

Previous to the conservation study, it was verified, from the initial analysis of the samples pretreated with power US, that this treatment did not significantly modify the physicochemical and/or sensory properties of the olive oil. This fact allowed the incorporation of the samples, treated with this new methodology, within the conservation study.

From the study based on the characterization of the physicochemical and sensory parameters of the samples during a conservation period of 16 months, it could be observed that, when considering an olive oil with initial values for the quality parameters far below the established limits for the extra virgin olive oil (i.e. with a low acidity degree of 0.1-0.2 % oleic acid), the different strategies used for preserving olive oil by minimizing the oxidation reactions (inert atmosphere, absence of light, low temperature and/or by applying a US of power pretreatment) did not show significant effects on the oil quality during at least a period of 16 months.

On the contrary, when the initial extra virgin olive oil was of lower quality (with quality parameter values, in particular the GA value close to the limit for this category), the methods of preservation based on the use of an inert atmosphere or the absence of light were not effective in maintaining the quality of extra virgin olive oil beyond four months of storage. In fact, only the strategies based on the application of low temperature (with and without US pretreatment) maintained the extra virgin category for at least a conservation period of 12 months.

It is also interesting to emphasize that in the case of the samples stored at low temperature, with and without US pretreatment, the samples pretreated with ultrasonic pulses presented, at the end of the storage period, lower values for the peroxide index, a higher oxidative stability and higher intensity for the fruity attribute.

It is well known that the conservation of the olive oil at low temperature implies the appearance of a crystallization process of the triglycerides, reducing the overall quality of the olive oil. In this study, carried out with *arbequina* and *empeltre* varieties, samples pretreated by US power and stored at low temperature, presented a significant reduction of the crystallization process during the storage period. This discovery, of clear industrial interest, gave place to a patent (P25827ES00), in order to protect the intellectual property of this new methodology.

Finally, in the third and last phase of the present doctoral thesis, the extraction process of olive oil mill waste extracts, with a high phenolic content and elevated antioxidant capacity, was evaluated. The methodology applied for the extraction was based on the application of power US with the aim of improving the process efficiency.

In an initial study, it was observed that an increase on the power of the US probe promoted a significant increase on the phenolic content extracted from the olive oil mill waste, using a solution of ethanol:water (1:1, v/v), with a dissolvent/solute ratio of 15/1 (mL/g), an extraction time of 15 min and a temperature of 20 °C.

It is interesting to note that the application of the power US allowed the utilization of non-toxic and suitable solvents for the food processing industry, such as an ethanol/water mix (1:1, v/v)), obtaining similar extraction percentages to those described in the bibliography using solvents with a high extractor power but also with high toxicity, as for example, methanol.

In order to optimize the extraction process of bioactive compounds proceeding from olive oil mill waste, the response surface methodology (RSM) technique was applied, using as independent variables: the power of the US probe, the solvent/solute ratio and the extraction time. All the experiences were carried out at a controlled temperature of 20 °C, using a mixture of ethanol:water (1:1, v/v) as a solvent.

A Box-Behnken design (BBD) was used to evaluate the effect of the independent variables: power of US ($X_1 = 175 - 375$ W/L), solvent/solute ratio ($X_2 = 5 - 25$ mL/g) and extraction time ($X_3 = 3 - 27$ min).

The information obtained by means of the BBD, relative to the extraction of phenolic compounds (FT), as well as the antioxidant capacity of the extracts, measured with the methods CUPRAC and FRAP, could be adjusted to a linear model ($p < 0.05$), and was capable to explain satisfactorily the system behavior and to predict the answers in the experimental domain considered. On the other hand, the antioxidant capacity evaluated by means of the ABTS method, could be significantly adjusted ($p < 0.05$) to a quadratic model.

The experimental conditions, resulting from the RSM application, that allowed to obtain the maximum FT yield, as well as extracts from olive oil mill waste that exhibited the highest antioxidant capacity, were the following: 375 W/L of ultrasonic power, 25 mL/g in the solvent/solute ratio and extraction time of 27 min.

The methodology established for the extraction of bioactive compounds from olive oil mill waste, with ultrasonic assistance, allowed the extraction of thermo labile compounds at low temperature, using a non-toxic solvent and with a minimum extraction time, significantly lower to that used in conventional extraction processes with mechanical stirring.

Globally, the research carried out for this Doctoral Thesis pretended to contribute and to support, inside our possibilities, the olive oil sector of the Balearic Islands, and in particular, the olive oil producers from the Majorca Island, by means of the characterization of the olive oil proceeding from the three authorized varieties by the AOP “Oli de Mallorca” (*arbequina*, *picual* and *empeltre*), depending on the olive ripening degree and on the agroclimatic factors from Majorca olive cultivars. In addition, a new methodology of olive oil conservation, which allows the storage at low temperature, preserving the physicochemical and sensory properties and reducing

significantly the crystallization process of the triglycerides, have been placed at the disposal of the producers assigned to the AOP “Oli de Mallorca”. Finally, a procedure based on the application of US, which allows the utilization of the olive oil mill waste, contributing in this way, to take advantage of the product, has also been included in this work.

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

El olivo, y el jugo de su fruto, el aceite de oliva, han tenido, desde la más remota antigüedad una amplia difusión a lo largo de los cinco continentes. Esta proyección a nivel mundial obliga, de forma exigente, a tener especial cuidado en su cultivo, recolección, conservación y presentación. Se trata de un importante legado que es necesario conservar, mejorar y transmitir a las futuras generaciones en beneficio de su alimentación, salud y calidad de vida.

El desarrollo económico de las Islas Baleares en las últimas décadas se ha fundamentado en el sector terciario, el cual ha determinado el encarecimiento del precio de la tierra y de la mano de obra. Esta situación junto a otros factores ha influido de forma muy importante sobre la competitividad de la agricultura, la ganadería y la pesca. Ante esta coyuntura económica, el sector primario ha respondido con valentía manteniendo los productos tradicionales de las Islas Baleares y adaptando sus producciones a las nuevas demandas del consumidor. Este esfuerzo del sector agrario tiene el apoyo de la administración, distinguiendo los productos con denominaciones de calidad, y del consumidor, el cual cada vez quiere conocer más y mejor este tipo de productos.

Un claro ejemplo, lo representa el aceite de oliva, alimento de referencia en la Isla de Mallorca, que en los últimos años ha recuperado su prestigio, elaborando un aceite de máxima calidad reconocida bajo la Denominación de Origen Protegida (DOP) “Oli de Mallorca”.

El aceite de oliva es un producto fuertemente arraigado en la isla de Mallorca. Esta industria ha sido la causante de la existencia de miles de metros de márgenes en las montañas de Mallorca, de haber robado terreno al bosque, y de todo lugar en el cual se pudiera plantar o injertar un acebuche (**Figura 1.1**). Disponer aceite de oliva representó, durante muchas generaciones, tener el poder económico y social. La pequeña aceituna no es consciente de la forma en que ha condicionado la sociedad de la Sierra de Tramuntana y la economía de sus pueblos.

Hasta el año 1960, las actividades agrarias, y dentro de éstas, el sector del aceite con un papel muy destacado, constituían la base de la economía de las Islas, a pesar del desarrollo industrial que se había experimentado, sobre todo, en la isla de Mallorca. A partir de este año, la llegada del turismo de masas toma la mayor parte de los activos agrarios y atrae a los que se integran por primera vez al mercado laboral, este hecho

provoca la pérdida de una de las bases del sistema agrario tradicional: la mano de obra barata y abundante. Además, el aumento de los salarios y la orientación de la capacidad empresarial y de los capitales hacia inversiones turísticas de alta rentabilidad agravan la situación del sector agrario.



Figura 1.1. Paisaje característico de la Sierra de Tramuntana

Por otra parte, el desarrollo tecnológico, que fue tan beneficioso en otras ramas de la agricultura, no se introdujo en el cultivo del olivo y, como consecuencia, el aceite de oliva se convirtió casi en un producto de lujo.

Los últimos años de la década de los 80 y principios de los 90, marcaron un punto de inflexión importante en la historia del aceite en Mallorca. Por una parte, la aparición de nuevas plantaciones de olivos, principalmente en la zona del “Raiguer, Pla, Migjorn y Llevant de Mallorca” (**Figura 1.2**), facilitando el proceso de recolección respecto al de los viejos olivos de la Sierra de Tramuntana, y, por otra, la introducción del método de elaboración de aceite en continuo, permitieron la obtención de aceites de oliva de mayor calidad y con características propias y diferenciadas de aceites similares producidos en otros lugares de la península. Todo este cúmulo de circunstancias hizo posible la obtención, en el año 2002, de un distintivo de máxima calidad como es la Denominación de Origen “Oli de Mallorca”. Mediante la Orden del Consejero de Agricultura y Pesca, de 31 de Octubre de 2002, quedó aprobado, con carácter transitorio, establecido en el artículo 5.5 del Reglamento (CEE) 2081/1992, el Reglamento de la Denominación de Origen "Oli de Mallorca". Más adelante, en el año 2004, el "Diario Oficial de la Unión Europea", mediante el Reglamento (CE) 1437/2004

de la Comisión, de 11 de agosto de 2004, inscribió la Denominación de Origen "Oli de Mallorca" en Registro Oficial de las Denominaciones de Origen Protegidas de la Comunidad Europea.

1.1. Cultivo, producción y variedades de aceitunas en Mallorca

En la actualidad, la superficie del olivar mallorquín, representa aproximadamente un 8% del total de la superficie cultivada, distribuida geográficamente de manera bastante irregular. La mayor parte se concentra en la zona de la Sierra de Tramuntana, aunque a raíz de los nuevos sistemas de recolección (recolección mecánica), se ha visto incrementada la superficie oleícola situada en la zona del "Raiguer, Pla, Migjorn y Llevant de Mallorca" (Figura 1.2).



Figura 1.2. Zonas de Mallorca

La actividad oleícola en Mallorca constituye la principal actividad agrícola en determinadas zonas de la Isla, como es el caso de la Sierra de Tramuntana. Dicha actividad ha permitido el mantenimiento y la preservación del paisaje, evitando la desertización y la erosión del terreno, y a su vez ha determinado la configuración de uno de los enclaves más emblemáticos de la isla de Mallorca.

En un estudio realizado por Jara y Rubert en 1993 se indicaba la predominancia casi absoluta de la variedad *empeltre*. Sin embargo, en este censo empezaba a reflejarse la implantación de nuevas variedades que han ido introduciéndose a lo largo de estos últimos 20 años, entre las cuales cabe destacar las variedades *Arbequina* y *Picual*. De

hecho, los últimos datos publicados por el Consejo Regulador de la DO “Oli de Mallorca” (campaña 2011-2012), indican que las variedades *empeltre*, *arbequina* y *picual* representan el 41,9%, 38,4% y 13,3% del total de olivos existentes en la Isla de Mallorca, respectivamente. De hecho, actualmente, estas tres variedades son las únicas autorizadas e incluidas por el Consejo Regulador de la DO “Oli de Mallorca”. A partir del año 2009, se han introducido otras variedades, de forma experimental, tales como la *hojiblanca*, *picudo*, *cornicabra*, *koroneiki* o la *frantoio*. En la actualidad, estas variedades representan un 6,34% del total de plantaciones de olivo.

Tabla 1.1. Datos de aceite de oliva elaborado en Mallorca durante las últimas cinco cosechas (Consejo regulador DO “Oli de Mallorca”, 2013)

	Campaña 2007-2008	Campaña 2008-2009	Campaña 2009-2010	Campaña 2010-2011	Campaña 2011-2012
Aceitunas almazara (kg)	1.242.299	1.524.416	1.678.005	2.088.548	2.233.300
Elaboración total de aceite (L)	185.827	233.689	252.450	350.671	325.729
Elaboración de aceite DO (L)	126.211	118.217	175.541	195.302	154.935

La evolución, así como las perspectivas de la producción de aceite de oliva en Mallorca, son positivas (**Tabla 1.1**). Obviamente, el aceite de oliva que oferta el sector olivarero de Mallorca no pretende competir con las cantidades producidas en otras zonas en las que el cultivo del olivo ocupa grandes extensiones de terreno, de ahí que la oportunidad del mercado del aceite de oliva de Mallorca se fundamente en la competencia en términos de calidad, como producto diferenciado y tradicional de la Isla de Mallorca.

1.1.1. Variedades de aceitunas incluidas en la DO “Oli de Mallorca”

Tal y como se ha mencionado anteriormente, en la actualidad, el Consejo Regulador de la DO “Oli de Mallorca” solo autoriza la elaboración de aceite de oliva procedente de las variedades de aceituna *empeltre*, *arbequina* y *picual*.

La variedad *empeltre* (**Figura 1.3**), representa la aceituna mallorquina por excelencia. Se trata de una variedad arraigada en la cultura, tradición e historia de Mallorca (Rosselló *et al.*, 2003). Según los historiadores, no es posible, a día de hoy, afirmar que la variedad *empeltre* sea una variedad autóctona o propia de la Isla de Mallorca, de hecho, se puede encontrar, de forma mayoritaria, en la zona del bajo

Aragón, de ahí que también sea conocida con las denominaciones *aragonesa* o *injerto* (Barranco *et al.*, 2008).

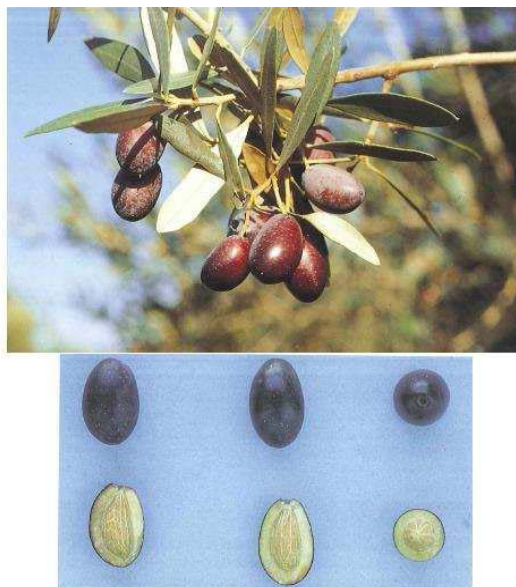


Figura 1.3. Aceituna de la variedad *empeltre*.

Esta variedad de aceituna es apreciada por su productividad y la excelente calidad del aceite que produce. Presenta una capacidad de enraizamiento baja, por lo que habitualmente se propaga por injerto. La maduración temprana de sus frutos, la baja resistencia al desprendimiento y el porte erguido de sus ramas la hacen ideal para la recolección mecanizada. Tiene problemas de cuajado de frutos y de daños por heladas invernales. En general, el aceite presenta una sensación fluida en boca, organolépticamente presenta un frutado suave con toques que recuerda a la almendra.

La variedad *arbequina* (**Figura 1.4**) se considera rústica por su resistencia al frío y su tolerancia a la salinidad. Es muy apreciada por su precoz entrada en producción, elevada productividad, buen rendimiento graso y excelente calidad de aceite (aceites suaves, poco amargos y astringentes con toques de almendra, alcachofa y manzana), aunque este presenta una baja estabilidad oxidativa. Su vigor reducido permite su utilización en plantaciones intensivas y superintensivas. El pequeño tamaño de las aceitunas dificulta su recolección mecanizada por vibración. Se le atribuye cierta tolerancia al repilo y verticilosis (enfermedades típicas de los olivos en zonas con humedades elevadas) (Barranco *et al.*, 2008).

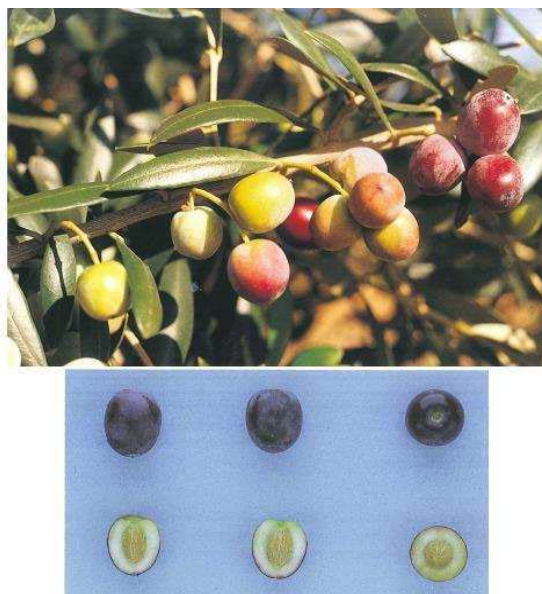


Figura 1.4. Aceituna de la variedad *arbequina*.

La variedad *picual* (**Figura 1.5**) es muy apreciada por su precoz entrada en producción, alta productividad, rendimiento graso elevado y facilidad de cultivo. Su aceite es de calidad media, aunque destaca por su alto contenido en ácido oleico. Se considera tolerante a la tuberculosis, pero muy susceptible a *r epilo* y *verticilosis*. Organolépticamente produce aceites de oliva con cuerpo donde predominan los atributos a frutado, amargo y picante (Barranco *et al.*, 2008).

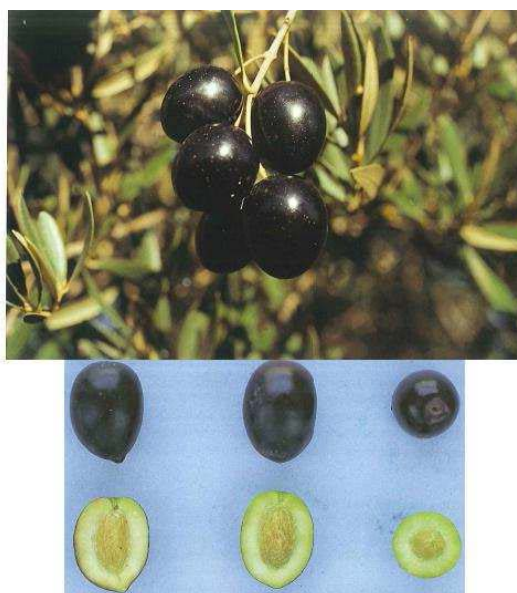


Figura 1.5. Aceituna de la variedad *Picual*.

1.2. Elaboración del aceite de oliva

La elaboración del aceite de oliva se realiza únicamente mediante procesos físicos, en los cuales se separa la fracción oleosa del resto de las partes de la aceituna. Estos procesos pueden clasificarse en:

- Operaciones preliminares
 - o Recolección
 - o Transporte
 - o Almacenamiento
 - o Lavado del fruto
- Preparación de la pasta
 - o Molturación
 - o Batido
- Extracción y separación del aceite
 - o Tradicional
 - o Sistema de tres fases
 - o Sistema de dos fases
- Almacenamiento

1.2.1. Operaciones preliminares: recolección, transporte, almacenamiento y lavado del fruto

La *recolección*, aún siendo una operación independiente de la elaboración propia, se considera como una de las principales etapas de control de calidad del aceite elaborado. Para obtener un aceite de calidad se debe partir de aceitunas sanas y en un estado de maduración adecuado. En cuanto a la época de recolección, la aceituna debe ser recogida en el momento de su madurez óptima, considerando como tal, el estado en que el fruto tenga la máxima cantidad de aceite y posea las mejores características nutricionales y organolépticas. Aún así, en la mayoría de las ocasiones la recolección se establece en base al índice de madurez determinado a partir de la coloración del fruto. Para su cálculo se han establecido diferentes formulas matemáticas (Uceda y Frías, 1975; Salvador *et al.*, 2001). En líneas generales, se puede afirmar que este momento

llega en el “envero”, entendiéndose como tal cuando se produce el cambio de color verde-amarillento a morado de la mitad de la pulpa en la mayoría de los frutos del árbol. Una vez definido el momento adecuado se procede a la recolección del fruto. En cuanto al sistema de recolección debe tenerse siempre presente la consideración de que el producto final es el zumo de la aceituna, por lo tanto, deben utilizarse sistemas que minimicen el deterioro de los frutos. El método tradicional (muy arraigado en Mallorca, sobretodo en la Sierra de Tramuntana, donde la morfología del terreno y la antigüedad de los olivos hace imposible la aplicación de otros métodos) se realiza a mano mediante el ordeño, vareo o con rasquetas. Puesto que la recogida manual es económicamente muy costosa, se ha diseñado una serie de maquinaria específica para automatizar el proceso y obtener beneficios. Existen distintos tipos de máquinas para ello, desde aquellas de pequeña potencia que simulan el ordeño o el vibrado de pequeñas ramas, hasta los vibradores de tronco, que someten al árbol a una potente vibración que hacen caer las aceitunas al interior de un paraguas. Sea cual sea el sistema de recolección utilizado, siempre se debe tener en cuenta no dañar ni al fruto ni al olivo, causando el menor daño posible a las hojas y tallos. Se debe tener en cuenta que la producción del año siguiente dependerá de los tallos producidos el año anterior.

El *transporte* de las aceitunas hasta la almazara es una etapa fundamental. En él se tiene que prestar especial atención a dos parámetros: presión ejercida por el propio peso del fruto y temperatura alcanzada. El empleo de cajas apilables de plástico con orificios, resistentes y lavables son las más adecuadas. Los orificios permiten disipar el calor generado por la propia actividad catabólica del fruto, lo que es muy importante para evitar un sobrecalentamiento del fruto y así reducir el riesgo de que se produzcan fermentaciones y a su vez evita que se ejerza una presión elevada sobre los frutos depositados en la parte inferior.

La *recepción y almacenamiento* del fruto empieza en el patio de recepción de la almazara donde los agricultores descargan las aceitunas, que se acondicionan hasta su procesado. Se trata de una de las etapas más importantes ya que es el único punto donde es posible realizar una clasificación inicial en función de la calidad esperada del aceite de oliva. Una vez en la línea de extracción ya no es posible separar calidades hasta la entrada del aceite de oliva en la bodega de almacenamiento. Los criterios de separación suelen ser sencillos y se deciden en función de las especificaciones de cada zona

(variedades, aceitunas sanas y/o estropeadas por picadura de mosca, aceitunas frescas, amontonadas varios días, etc).

Por otra parte, se trata de una etapa donde existe un elevado riesgo de alteraciones y reacciones de fermentación de los frutos que pueden inducir a pérdidas de calidad importantes. En efecto, los microorganismos que están asociados a las aceitunas (levaduras, anaerobacterias, bacterias acéticas, mohos, etc.) pueden encontrar condiciones muy favorables a su crecimiento (frutos mojados, aplastados o roturas, especialmente en tolvas de almacenamiento), llegando a alcanzar la pulpa de los frutos y fermentando sus azúcares, lo que da lugar a compuestos como el etanol, el ácido láctico o el ácido acético, relacionados con los defectos de “avinado-agrio-vinagre” y “atrojado” (Angerosa *et al.*, 1998). Otros estudios más recientes demuestran que dichos microorganismos también pueden actuar sobre los polifenoles de la pulpa del fruto, generando fenoles volátiles también relacionados con los defectos sensoriales (Vichi *et al.*, 2008). Debido a este efecto, reglamentos específicos como el de la DO “Oli de Mallorca” aconsejan que el tiempo transcurrido desde la recolección hasta la molturación no exceda de 24 horas, ya que las aceitunas una vez separadas del árbol comienzan una descomposición de la materia orgánica, con desintegración de las paredes celulares, perdiendo así, el epicarpio, la propiedad de servir como barrera antimicrobiana.

La limpieza y lavado de las aceitunas se llevan a cabo antes de entrar en el proceso de molturación. Las limpiadoras se basan en un sistema de aspiración de aire colocado encima de una cinta transportadora con bandejas vibradoras y cribas. El sistema de aspiración absorbe todas las impurezas, principalmente hojas y ramas, pero también piedras, terrones pequeños, aceitunas defectuosas de escaso tamaño, etc. (Barranco *et al.*, 2008).

El lavado de las aceitunas siempre se debe realizar con agua fría para evitar el desarrollo de mohos. Las lavadoras trabajan en un circuito cerrado y disponen de un depósito de agua, bombas de recirculación y cribas para la separación del fruto del agua de lavado. Actualmente ya existen en el mercado sistemas que integran en un mismo equipo las funciones de limpieza y lavado.

1.2.2. Preparación de la pasta: molturación y batido

La preparación de la pasta consiste en romper íntegramente la estructura vegetal de las aceitunas con el fin de liberar el aceite que se encuentra en el interior de las células que constituyen el parénquima oleoso del mesocarpio para, a continuación, llevar a cabo la coalescencia de las fases líquidas por medio del batido.

La *molturación* del fruto tiene por objeto la rotura de los tejidos de la aceituna donde se aloja la materia grasa. Probablemente, ésta sea la etapa del proceso de elaboración del aceite de oliva que más ha evolucionado a lo largo de los años, pasando de un sistema tradicional o discontinuo, en donde se realizaba una molturación con piedras, a los sistemas modernos o continuos, en los cuales la molturación se lleva a cabo mediante molinos de martillos.

El tamaño final de las partículas se fija mediante la instalación de un tamiz de un diámetro determinado (los más usados oscilan entre 5 – 7 mm) a la salida del molino, de manera que la pasta de aceituna quede retenida en la zona de molturación hasta alcanzar el tamaño fijado por el tamiz.

En esta etapa, la velocidad de giro de los martillos dentro del molino (pudiendo llegar a las 3000 rpm, en función del fabricante) es un factor determinante tanto para la eficacia del proceso extractivo, como para la calidad final del aceite de oliva. Por una parte, si no se controla dicha etapa, se favorece la formación de emulsiones agua-aceite que luego hay que romper en el proceso de batido, con el fin de evitar pérdidas de aceite en los subproductos, paralelamente, la fricción generada por el molino, aumenta la temperatura de la pasta de aceituna favoreciendo la oxidación de los triglicéridos (Caponio *et al.*, 2003), lo cual puede traducirse en una pérdida de estabilidad del aceite. Aún así no todo son desventajas, al aumentar el contacto entre agua-aceite-pulpa, favorece la acumulación de polifenoles hidrolílicos en la fase oleosa, lo cual tiene repercusiones en la estabilidad del aceite y en el sabor (en general, el aceite es más amargo, picante y astringente). Evidentemente, también se inician numerosas reacciones químicas y enzimáticas que pueden tener efectos adversos sobre la calidad del producto final (Fernández-Martínez *et al.*, 2011).

Tradicionalmente, las aceitunas trituradas en los molinos se disponían junto con los huesos en cachos. Para la obtención de la fase líquida se empleaban prensas, y esta fase que contenía tanto aceite como otros productos (agua de vegetación, fibras,

partículas del fruto, etc.) era almacenada en decantadores. Tras un lento proceso de sedimentación era posible separar el aceite del resto. Esta separación por sedimentación era lenta y presentaba el inconveniente de una capacidad de producción baja (sistemas discontinuos), grandes espacios de almacenamiento y la baja calidad del aceite debido a que al estar en contacto con el resto de material y el oxígeno se producía la oxidación del mismo (Fernández-Martínez *et al.*, 2011). Estos problemas fueron solventados con la introducción de batidoras y centrifugadoras en el proceso de elaboración del aceite de oliva.

Las batidoras son equipos constituidos por un recipiente dotado de una camisa externa por la que se hace circular agua caliente para modificar y controlar la temperatura del proceso de batido según las necesidades. En el interior, presenta uno o varios ejes con palas, que giran a una velocidad comprendida entre 20 - 30 rpm. Existen dos tipos de batidoras, por una parte se habla de batidoras verticales, si la disposición del eje es vertical, y de forma análoga, cuando se dispone el eje de forma horizontal, se denominan batidoras horizontales.

La función del *batido* es separar las diferentes fases que constituyen la pasta. Para ello, este proceso permite agrupar las pequeñas gotas de aceite que van saliendo de las vacuolas del fruto en gotas de mayor tamaño (coalescencia) y así facilitar la separación del resto de material. Este proceso es básico en la elaboración del aceite debido a que la pasta molida obtenida en la etapa anterior presenta una complejidad constitucional que posibilita interacciones físicas y biológicas que pueden modificar la textura y las propiedades reológicas de la pasta debido a la formación de membranas lipoproteicas que facilitan la formación de emulsiones. Esto dificulta la posterior separación de las fases sólido – líquido y líquido – líquido.

El efecto deseado del batido se consigue a partir del control de la velocidad de las palas, el tiempo de batido y la temperatura a la que se lleva a cabo el proceso. Un movimiento lento de la pasta promueve la unión entre diferentes gotitas de aceite al aumentar la probabilidad de que éstas se encuentren y formen gotas más grandes para después mejorar la separación. A mayor tiempo de batido, se consigue un mayor rendimiento de extracción de aceite, con una menor presencia del mismo en los subproductos finales. Aún así se alcanza un punto estacionario en el cual aunque se prolongue el tiempo de batido no aumenta el rendimiento de aceite extraído (Mendoza *et al.*, 2009).

Por otro lado la temperatura influye en la viscosidad de la pasta. En base a este parámetro se establecen dos sistemas de batido: en frío, donde el rendimiento en aceite que se consigue es menor, y mixtos, primero un batido en frío y a continuación, con la finalidad de facilitar la posterior separación del aceite, se dota a las batidoras de un sistema de calefacción consistente en un fluido calefactor que circula por la camisa externa del cuerpo de la batidora y que, generalmente, es agua. La mayoría de las batidoras presentes en las almazaras traen de fábrica fijado el tipo y la velocidad de las palas en base a la capacidad del cuerpo de la batidora, dejando la temperatura a decisión del almazarero. Para la elección de la temperatura se debe tener en cuenta que temperaturas bajas (18 – 20 °C) no permiten obtener rendimientos de extracción satisfactorios, y aunque a temperaturas superiores a los 30 – 35 °C se obtienen rendimientos más competitivos, se producen alteraciones en la calidad de los aceites al favorecer la evaporación de diferentes componentes volátiles. De hecho Boselli *et al.*, (2009) aconseja que la temperatura de batido no supere los 28 °C, para mantener al máximo los atributos sensoriales del aceite de oliva.

Durante esta etapa tienen lugar las reacciones químicas más importantes relacionadas con las características sensoriales finales del aceite:

- Los polifenoles y los pigmentos se reparten entre las fracciones oleosa y acuosa, según su estructura química y solubilidad relativa. El coeficiente de reparto determina la cantidad de sustancias solubilizadas en el aceite, dependiendo de los volúmenes relativos de aceite y agua, así como la cantidad total de sustancias presentes en el sistema (Bianchi *et al.*, 1999).
- La temperatura, junto con el oxígeno del aire que va introduciéndose en cada giro de las palas de la batidora, favorece las reacciones de oxidación de los ácidos grasos del aceite y de otros compuestos minoritarios.
- El contacto del aceite con algunos de los enzimas del fruto promueve reacciones, algunas de las cuales son responsables del desarrollo del perfil aromático del aceite; en concreto, la denominada vía de la lipoxigenasa (LOX) promueve la formación de aromas relacionados con el frutado verde del aceite por oxidación de los ácidos grasos linoleico y linolénico (Lercker *et al.*, 1999).

En determinadas circunstancias, en esta etapa se añaden los denominados coadyuvantes tecnológicos para favorecer la separación correcta de fases. En el caso de

pasta de aceitunas muy secas (frutos del suelo, helados o muy maduros), las palas de la batidora no baten la pasta y puede ser necesario añadir agua para fluidificarla hasta el punto que la batidora pueda realizar su función. En el caso de frutos con exceso de humedad (muy verdes, de regadío, tras alguna lluvia, etc.) el exceso de agua en el sistema también puede dificultar el trabajo de la batidora, siendo necesario retirar una parte del exceso de humedad mediante el uso de talco micronizado (que en etapas posteriores se centrifuga con los sólidos).

1.2.3. Extracción del aceite de oliva

En el proceso de elaboración, la extracción del aceite se puede llevar a cabo mediante dos procedimientos diferentes: el sistema tradicional y el sistema continuo.

En España, el *método tradicional* está prácticamente en desuso. Sin embargo, a nivel mundial, alrededor del 50% de las almazaras aún poseen este tipo de elaboración (Mendoza *et al.*, 2009). Este sistema se lleva a cabo mediante dos etapas, primero se realiza un prensado de la pasta batida para la separación sólido-líquido y posteriormente una centrifugación para la separación líquido-líquido.

La etapa de prensado mecánico se realiza mediante capachos. Estos se disponen unos encima de otros en una vagoneta y van guiados por una aguja central. Entre ellos se coloca la pasta batida y se someten entonces a la presión necesaria. Se trata, por tanto, de un sistema discontinuo de carga de capachos, prensado y descapachado. Al prensar la pasta, se obtiene por un lado un líquido denominado mosto oleoso que contiene aceite de oliva (30%), agua de vegetación (65%) y una pequeña cantidad de sólidos que escapan de la prensa (5%) y, por otra parte el residuo sólido denominado orujo.

Los inconvenientes con los que cuenta este sistema son la discontinuidad del proceso, el contacto en todo momento la pasta con el oxígeno del aire y la imposibilidad de una limpieza completa de los conductos de drenaje que podría dar lugar a fermentaciones, disminuyendo la calidad del aceite de oliva obtenido.

Los procesos de extracción en continuo se han impuesto al sistema tradicional, dichos sistemas se agrupan en las instalaciones que realizan este proceso con una doble característica: por una parte utilizan la fuerza centrífuga como elemento fundamental para la separación de las diferentes fases y por otro lado, todo el proceso de extracción se lleva a cabo de forma continua.

Dentro del sistema continuo se pueden diferenciar a su vez, dos tipos en función de las corrientes de salida: sistema de tres fases y sistema de dos fases.

El *sistema continuo de tres fases* (**Figura 1.6**) fue el primer sistema centrífugo en introducirse en la producción de aceite de oliva para separar las diferentes fases de la pasta batida. En estas plantas el equipo diferenciador es el decantador centrífugo horizontal, comúnmente conocido como decanter. El proceso se inicia mezclando la pasta batida con una cantidad de agua, a 30 - 35 °C, comprendida entre un 40 - 50 % con el objetivo de mejorar la separación entre las fracciones sólida y oleosa en el interior del decanter. Se introduce en el sistema y se separan de forma continua tres fracciones: la parte sólida u orujo, y por la otra, las aguas de vegetación y el aceite.

El agua de vegetación y el aceite son posteriormente separados por efecto de la fuerza centrífuga. Por un lado, sale el aceite de oliva y por el otro un efluente líquido formado por la unión del agua de vegetación de las aceitunas y del agua de adición al decanter, conocido como alpechín (Albuquerque *et al.*, 2004),

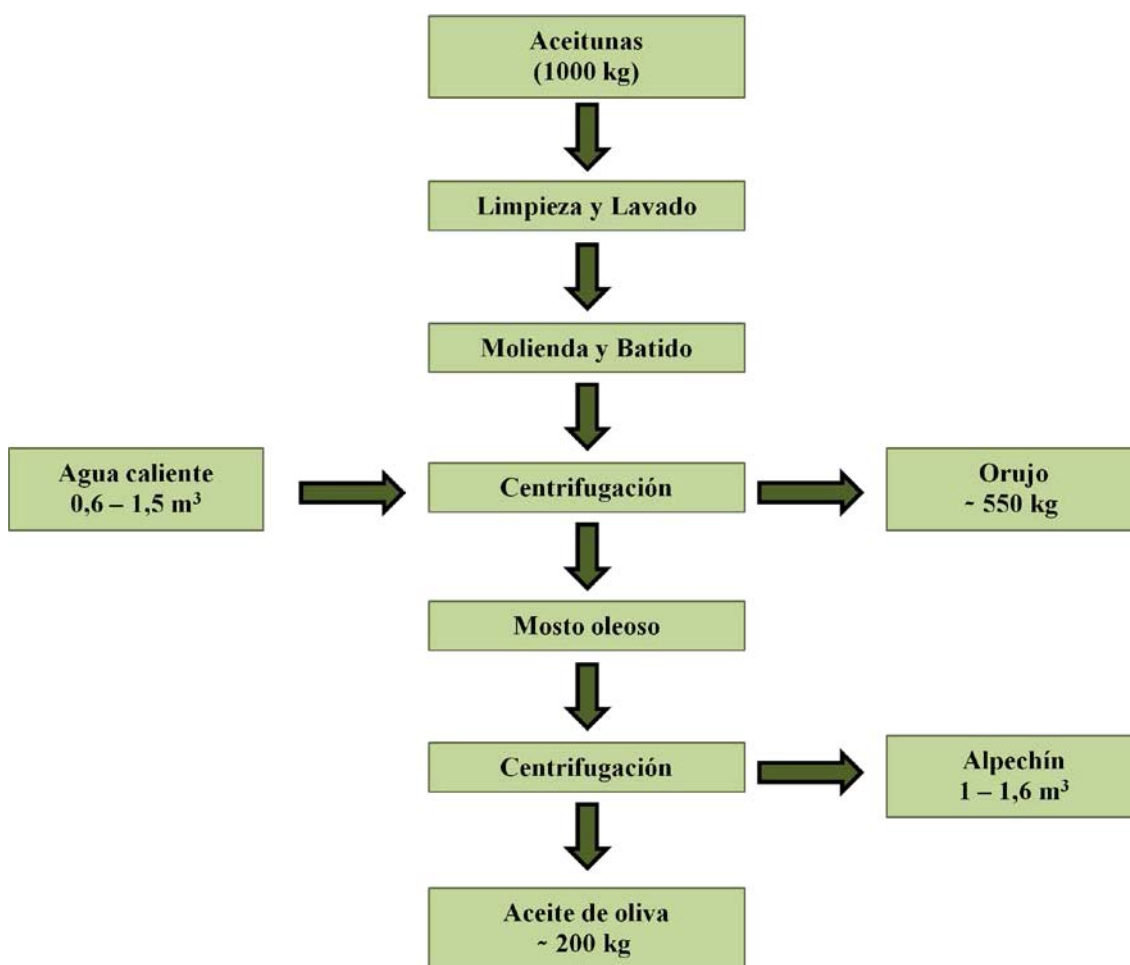


Figura 1.6. Esquema del sistema de extracción del aceite de oliva de tres fases

Este último subproducto (alpechín) supone un gran problema medioambiental. Debido a ello, a principios del 1990 comenzaron a desarrollarse nuevos sistemas de extracción del aceite, en los que no era necesaria la adición de agua en el decanter. A partir de ahí se introdujo el *sistema continuo de dos fases* (Figura 1.7). La pasta batida entra en el decanter tal y como sale de la batidora. El único requisito para poder extraer el aceite con un sistema de dos fases es que la pasta de aceituna, y por extensión, las aceitunas, deben contener un mínimo de humedad (50 - 53%) para permitir una mínima separación del agua entre las fases de aceite y sólidos en el interior del decanter (Mendoza *et al.*, 2009). Si debido a las condiciones climatológicas o al estado de maduración, la pasta es demasiado seca, es necesario incorporar la cantidad de agua necesaria hasta llegar a ese nivel de humedad requerido a la entrada del decanter. Después de someter la pasta a centrifugación, por una parte salen los sólidos y el agua de vegetación (comúnmente denominado orujo de dos fases o alperujo), y por otra, fluye el aceite de oliva.

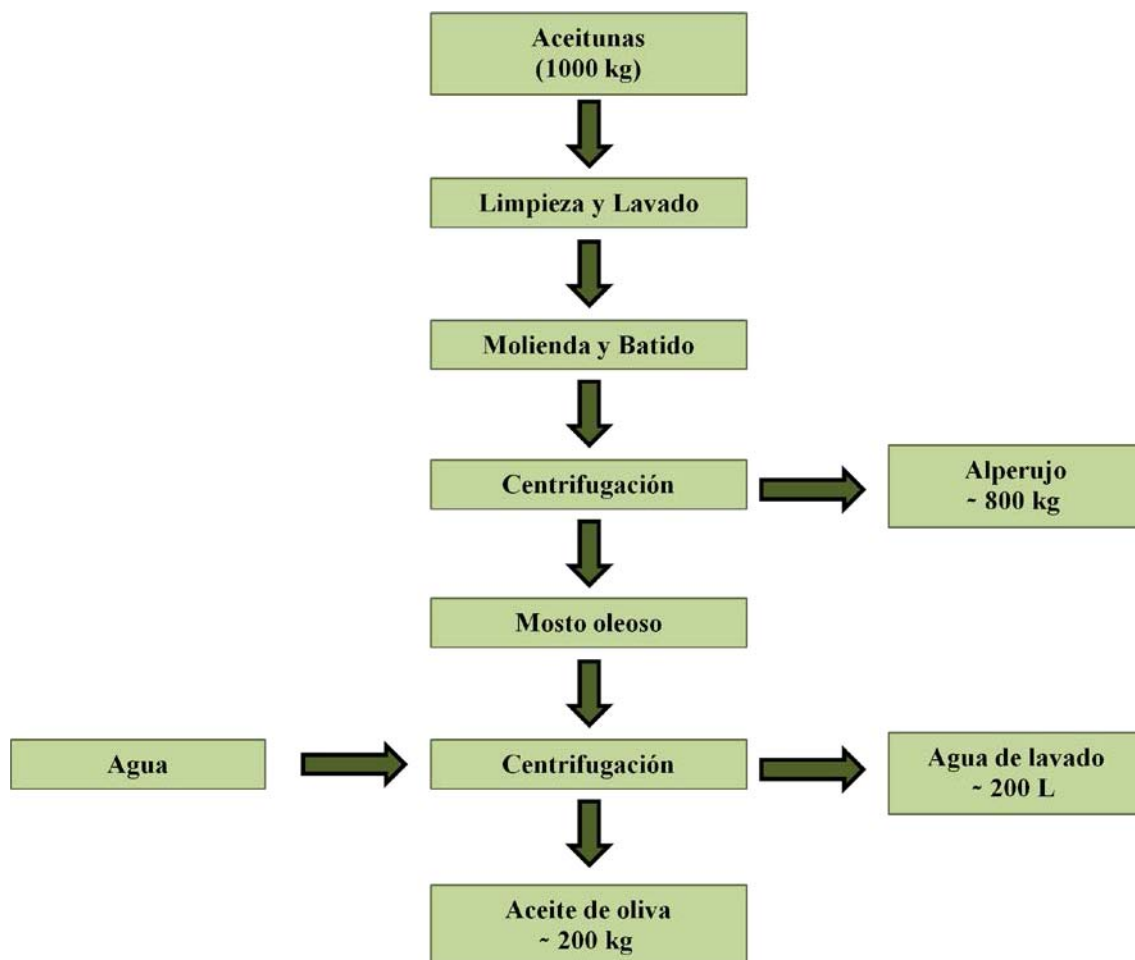


Figura 1.7. Esquema del sistema de extracción del aceite de oliva de dos fases

1.2.4. Almacenamiento

Una vez obtenido el aceite, este se pasa a la bodega de almacenamiento hasta el momento de su expedición y embotellado para la venta. El aceite se conserva en depósitos enterrados (trujales) o aéreos, pudiendo ser de diferentes materiales (plástico, acero inoxidable, resinas, etc.) y también de diferentes capacidades (normalmente entre 1000 y 50000 L). La bodega debe estar en condiciones de poca luz y temperatura constante (alrededor de 18 °C) para evitar la oxidación del aceite.

1.3. Composición química del aceite de oliva

Desde el punto de vista químico, el aceite de oliva se divide en dos fracciones, una fracción mayoritaria que tradicionalmente se denomina “fracción saponificable”, que representa entre el 98 y el 99% del peso total del aceite de oliva, formada principalmente por triglicéridos y ácidos grasos, y una segunda fracción minoritaria (insaponificable), que supone entre el 1 y el 2% del peso total del aceite de oliva (Monterodoro *et al.*, 2007).

1.3.1. Fracción saponificable

Los componentes lipídicos predominantes en la fracción saponificable son los triglicéridos, cuya diferenciación puede hacerse en base a su composición ácida o perfil de ácidos grasos, de los cuales destaca por su elevado contenido el ácido oleico. Este ácido graso está formado por una cadena de 18 átomos de carbono y una insaturación en la posición n-9 (C18:1 o C18:1 n:9); siguiendo la misma nomenclatura están los ácidos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3), araquídico (C20:0), gadoleico (C20:1) y behénico (C22:0). En la **Tabla 1.2** pueden observarse, de forma general y aproximada, los perfiles en ácidos grasos correspondientes a diferentes aceites de oliva virgen extra monovarietales.

En este contexto, resulta especialmente relevante la revisión realizada por Conde *et al.*, (2008), para entender las diferencias de composición ácida de una variedad concreta. La lipogénesis requiere azúcares para sintetizar ácidos grasos: así, la glicólisis de azúcares proporciona piruvato que se transforma, por vía enzimática, a acetil-CoA que constituye el substrato inicial para la síntesis de la cadena carbonada de los ácidos grasos. La síntesis de ácidos grasos progresa, en el interior de los cloroplastos de los frutos, hasta obtener ácidos palmítico, esteárico y oleico, que salen al retículo

endoplasmático, donde por elongación dan lugar a ácidos grasos de mayor longitud y donde también se combinan con el glicerol, para dar lugar a los triglicéridos.

Esta peculiar composición en ácidos grasos confiere al aceite de oliva un carácter de grasa monoinsaturada que lo diferencia del resto de aceites vegetales comestibles extraídos a partir de semillas oleaginosas, que son más ricos en ácidos grasos poliinsaturados. (Rosselló *et al.*, 2003). La presencia de enlaces insaturados en los aceites, aparte de otorgarle interesantes propiedades biológicas, los hace más sensibles al oxígeno, pudiendo dar lugar al fenómeno de autooxidación, responsable del enranciamiento y causa principal del deterioro en la calidad de este producto (Bendini *et al.*, 2009).

Tabla 1.2. Perfil de ácidos grasos (%) de aceite virgen extra procedente de diferentes variedades de aceituna (Rosselló *et al.*, 2003; Conde *et al.*, 2008)

Variedad	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	Ins/Sat
Arbequina	13,5	1,5	1,9	70,2	11,4	0,8	5,3
Blanqueta	14,5	1,5	1,5	67,4	14,2	0,6	5,2
Changlot Real	10,9	0,6	1,3	8,0	6,1	0,6	7,1
Cornicabra	8,5	0,6	3,9	80,3	5,6	0,7	6,8
Empeltre	12,1	1,2	1,4	74,6	9,4	1	6,4
Hojiblanca	8,6	0,7	4,1	74,3	10	1,4	6,5
Lechin	12,3	1,1	1,7	69,2	13,5	1,4	5,9
Picual	9,9	0,6	3,6	79,7	4,8	0,8	6,2
Picudo	13,5	1,4	2,2	65,6	15,6	1,4	5,2
Verdial	10,8	0,9	2,6	71,1	3,1	0,7	6,1
Zorzaleño	11,2	1	1,2	75,5	9,3	0,7	6,9

Varios autores se han guiado en el perfil de ácidos grasos del aceite de oliva como parámetro clasificador y diferenciador de los aceites de diferentes zonas de procedencia o variedad. A modo de ejemplo, ya a principios de los años 80, Tiscornia *et al.*, (1982) analizaron el contenido en ácidos grasos de diferentes aceites italianos y mediante técnicas de análisis discriminante pudieron clasificar algunos de estos aceites en función de su región de origen. Más tarde, Alonso y Aparicio (1993) hicieron un estudio semejante en el cual el perfil ácido fue decisivo para discriminar aceites de oliva vírgenes procedentes de diferentes regiones de España, Italia y Portugal. De forma análoga, Motilva *et al.*, (2001) analizaron el perfil de ácidos grasos con el objetivo de diferenciar los aceites procedentes de dos subzonas de la DO “Les Garrigues”. Por su

parte Sánchez *et al.*, (2003 y 2009) utilizaron los ácidos grasos para caracterizar los aceites de oliva de Extremadura. También resulta especialmente relevante la revisión realizada por Conde *et al.*, (2008) para entender las diferencias entre la composición acídica de aceites de oliva elaborados a partir de diferentes variedades de aceituna. Todos estos estudios ponen de manifiesto la importancia que tiene el estudio del perfil de ácidos grasos en el aceite de oliva debido a la gran relación existente entre el contenido de los diferentes ácidos grasos y la variedad, el grado de maduración y la procedencia geográfica de la aceituna.

1.3.2. Fracción insaponificable

La fracción insaponificable del aceite de oliva se caracteriza por su diversidad y compleja naturaleza. Esta fracción incluye más de 230 compuestos, denominados usualmente compuestos minoritarios (Montedoro *et al.*, 2007). Entre estas sustancias destacan compuestos fenólicos, pigmentos, esteroides, alcoholes triterpénicos, tocoferoles, compuestos volátiles, etc.

En el reino vegetal, los compuestos fenólicos constituyen el segundo grupo de sustancias químicas en abundancia tras el de los carbohidratos (Pridham, 1965). Su biosíntesis tiene lugar a través del metabolismo secundario de las plantas, que lejos de ocuparse del crecimiento y desarrollo de las mismas como individuos (metabolismo primario – ciclo vegetativo), asegura la adaptación, evolución y perpetuidad de las distintas especies (ciclo reproductor) (Beckman, 2000; Naczki y Shahidi, 2004).

Desde un punto de vista químico, los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen una gran familia de moléculas orgánicas de muy diversa y heterogénea estructura y reactividad. No obstante, tal y como su nombre indica, todos ellos incluyen como mínimo un núcleo aromático sustituido con uno o varios grupos hidroxilo.

Los compuestos fenólicos pueden clasificarse en función del número y distribución de los átomos de carbono que lo componen o la longitud de la cadena alifática unida al núcleo aromático (Cheynier *et al.*, 1997). Sin embargo, dada su complejidad, a día de hoy, su conocimiento sigue siendo el campo de batalla para muchos grupos de investigación. Los principales compuestos identificados pertenecen a las familias: de los ácidos fenólicos, los lignanos, los compuestos flavonoides, los alcoholes fenólicos secoiridoides y las hidroxycumarinas.

Los *ácidos fenólicos* fueron los primeros compuestos fenólicos descritos en el mundo oleícola. Estos se subdividen en dos grandes grupos: por una parte, los ácidos benzoicos (**Tabla 1.3**), y por otra los ácidos cináricos (**Tabla 1.4**).

Los ácidos benzoicos presentan una estructura química básica de C6-C1. Los principales ácidos de este tipo descritos son el *p*-hidrocibenzoico, el protocatecuico, el vanílico, el sirínico y el gálico. Dentro del grupo de los ácidos cináricos se encuentran mayoritariamente el ácido *p*-cumárico, el cafeico, el sinápico y el ferúlico (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005; De la Torre-Carbot *et al.*, 2005). Estos compuestos están presentes en pequeñas cantidades, inferiores a 1 mg/kg de aceite de oliva (Tsimidou *et al.*, 1992; Hrnčirik y Fritsche, 2004). Sin embargo, en algunas muestras de aceite de oliva virgen extra se han detectado algunos ácidos fenólicos, tales como el ácido vanílico, el sirínico, el *p*-cumárico o el ferúlico en cantidades superiores a estos valores (Bianco *et al.*, 2003).

Tabla 1.3. Principales ácidos benzoicos presentes en el aceite de oliva virgen extra.

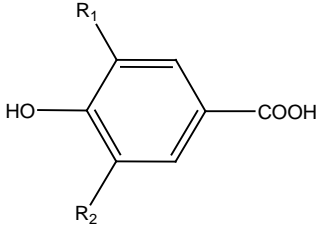
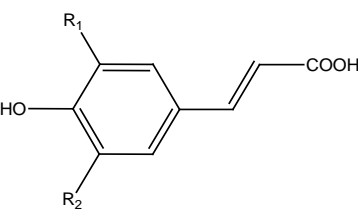
ACIDOS BENZOICOS	R ₁	R ₂	ESTRUCTURA
<i>p</i> -Hidroxibenzoico	H	H	
Protocatecuico	OH	H	
Vanílico	OCH ₃	H	
Sirínico	OCH ₃	OCH ₃	
Gálico	OH	OH	

Tabla 1.4. Principales ácidos cináricos presentes en el aceite de oliva virgen extra.

ACIDOS CINÁRICOS	R ₁	R ₂	ESTRUCTURA
<i>p</i> -Cumárico	H	H	
Cafeico	OH	H	
Ferúnico	OCH ₃	H	
Sinápico	OCH ₃	OCH ₃	

Es importante destacar que los ácidos fenólicos se han asociado, no solo con las propiedades antioxidantes del aceite de oliva, sino también con las características organolépticas (sabor y astringencia) que presenta (Bendini *et al.*, 2007; 2009).

Los *lignan*os, representados de forma esquemática en la **Tabla 1.5**, junto con los secoiridoides, son los principales compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva. Según Owen *et al.*, (2000) el aceite de oliva virgen extra puede contener hasta 100 mg/kg de aceite de este grupo de compuestos, aunque existen variaciones considerables entre aceites de diferente procedencia y variedad.

Los primeros lignanos que se detectaron en el aceite de oliva fueron el (+)-1-pinoresinol y (+)-1-acetoxipinoresinol. Brenes *et al.*, (2002) establecieron que estos compuestos están presentes dentro del rango de 20 - 25 mg/kg aceite para el (+)-1-acetoxipinoresinol y de 2 a 95 mg/kg de aceite para el (+)-1-pinoresinol. Además evaluaron el contenido en aceites provenientes de diferentes variedades tanto españolas como italianas, llegando a establecer que la concentración de (+)-1-acetoxipinoresinol en aquellos que provenían de la variedad Picual era prácticamente insignificante o nula en comparación con los demás aceites. En las conclusiones derivadas de su estudio se recoge la idea de que esta ausencia podría ser considerada como un marcador varietal. Otros autores han descrito cantidades de (+)-1-acetoxipinoresinol de hasta 160 mg/kg en diferentes muestras de aceites de origen italiano (Oliveras-López *et al.*, 2007).

Tabla 1.5. Principales lignanos presentes en el aceite de oliva virgen extra.

LIGNANOS	R ₁	R ₂	R ₃	ESTRUCTURA
(+)-1-Pinoresinol	H	H	H	
(+)-1-Acetoxipinoresinol	COOCH ₃	H	H	
Hidroxipinoresinol	OH	H	H	
Siringaresinol	H	OCH ₃	OCH ₃	

Posteriormente, el análisis de diferentes aceites de oliva virgen extra puso de manifiesto la presencia de otros compuestos pertenecientes a este grupo tales como el hidroxipinoresinol y el sirangaresinol (Christophoridou *et al.*, 2005).

Los *flavonoides*, representados en la **Tabla 1.6**, son sintetizados por condensación de un fenilpropanoide con tres moléculas de malonil-CoA. Presentan anillos aromáticos en su estructura, uno de ellos así como la cadena lateral de tres átomos de carbono provienen de la L-fenilalanina, mientras que el resto tienen su origen en el acetil-CoA, por la ruta del acetato. Presentan una variación estructural debida a reacciones de hidroxilación, metoxilación, prenilación o glicosilación. Se subdividen en flavonas, flavonoles, flavanones y flavanonoles.

En el aceite de oliva virgen extra se han descrito tanto las flavonas como los flavonones. Sin embargo, son los compuestos pertenecientes al primer grupo los que han sido caracterizados por un mayor número de autores. Así, las flavonas apigenina y luteolina y sus derivados, tales como la metoxiluteolina, han sido ampliamente identificadas en diferentes muestras de aceite (De la Torre-Carbot *et al.*, 2005; Dais *et al.*, 2007; Christophoridou *et al.*, 2005). Su origen podría estar en las formas glicosadas que aparecen en el grupo. El rango de concentración en el que se encuentran presentes va desde los 0,5 hasta los 10 mg de compuesto por kg de aceite (De la Torre-Carbot *et al.*, 2005).

Con respecto a otros grupos de compuestos fenólicos pertenecientes a los flavonoides, en el trabajo de Carrasco-Pancorbo *et al.*, (2005) se identificó un flavanonol, en concreto el (+)-taxofolin, en muestras de aceite de oliva de la variedad “Bertolli”.

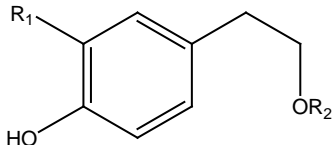
Tabla 1.6. Principales flavonoides presentes en el aceite de oliva virgen extra.

FLAVONOIDES	R ₁	R ₂	R ₃	ESTRUCTURA
Luteolina	OH	H	H	
Apigenina	H	H	H	
Metoxiluteolina	OH	H	OCH ₃	
(+)-Taxifolin	OH	OH	H	

La **Tabla 1.7**, incluye los principales *alcoholes fenólicos* descritos en el aceite de oliva. Entre ellos cabe destacar el hidroxitirosol (3,4-dihidroxifeniletanol ó 3,4-DHPEA) y el tirosol (*p*-hidroxifeniletanol, *p*-HPEA). En el trabajo de Owen *et al.*, (2000) se analizaron muestras pertenecientes a diferentes variedades de aceituna y se obtuvieron unos valores medios en torno a los 14 mg/kg de aceite para el hidroxitirosol, y de 28 mg/kg de aceite para el tirosol. Sin embargo, en otros trabajos como el presentado por De la Torre-Carbot *et al.*, (2005), en aceites elaborados a partir de aceitunas de las variedades *arbequina* y *picual*, los rangos para estos compuestos fueron de 7 a 64 mg/kg de aceite y de 3 a 24 mg/kg de aceite para el hidroxitirosol y el tirosol, respectivamente.

También se han identificado derivados de alcoholes fenólicos tales como el hidroxitirosol acetato, el tirosol acetato y una forma glicosilada del hidroxitirosol (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005; Tovar *et al.*, 2001). Es interesante destacar que estos compuestos se han relacionado con atributos positivos del aceite de oliva tales como el amargor y el picante (Servilli *et al.*, 2004; Bendini *et al.*, 2009).

Tabla 1.7. Principales alcoholes fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen extra

ALCOHOLES FENÓLICOS	R ₁	R ₂	ESTRUCTURA
Hidroxitirosol	OH	H	
Tirosol	H	H	
Hidroxitirosol acetato	OH	COCH ₃	
Tirosol acetato	OH	COCH ₃	

Los polifenoles pertenecientes al grupo de los *secoiridoides* se encuentran sólo en las plantas que pertenecen a la familia *Oleaceae*, que incluye la *Olea europaea* L. Estos compuestos proceden del metabolismo secundario de los terpenos siendo sintetizados a partir de la ruta del ácido mevalónico. Se caracterizan por la presencia de una estructura fenil etil alcohol (3,4-DHPAE o *p*-HPEA) unido al ácido elenoico o sus derivados, y en la mayoría de las ocasiones se presentan glicosilados. El ácido elenoico y sus derivados pueden presentar diferentes formas en base al anillo cerrado o abierto y

a sus formas aldehídicas, y todas ellas pueden unirse a la parte alcohólica (De La Torre-Carbot *et al.*, 2005).

El principal glicósido presente en el fruto del olivo es la oleuropeína (Savarese *et al.*, 2007; Gutiérrez-Rosales *et al.*, 2010). Químicamente es un éster del oleósido-11-metil-éster (ácido elenólico glicosado) con el 3,4-DHPEA. En el proceso de maduración del fruto y extracción del aceite se produce la aglicona correspondiente por la actividad del encima β -glucosidasa (Gutiérrez-Rosales *et al.*, 2010). Esto justifica que en el aceite de oliva se encuentren únicamente las agliconas de este grupo de compuestos. Otro secoiridoide de interés presentes en el aceite de oliva es el ligustrósido aglicona, que tiene una estructura similar a la de la oleuropeína, pero en este caso el alcohol que forma parte de la molécula es el *p*-HPEA.

En los últimos años se han identificado derivados tanto de la oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-AE) como del ligustrósido aglicona (*p*-HPEA-EA) debido a diversas reacciones, tales como la metilación, descarboximetilación, hidroxilación o hidrólisis (Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2006; Suárez *et al.*, 2008). Además, se han descrito diferentes isómeros de estos compuestos, principalmente de la oleuropeína aglicona, compuesto para el que se han detectado hasta un total de 11 isómeros (Fu *et al.*, 2009), aumentando aún más la complejidad de esta fracción. Todo ello hace que el número de compuestos derivados o isómeros de la oleuropeína aumente de forma considerable, siendo los componentes más abundantes en el aceite de oliva virgen extra.

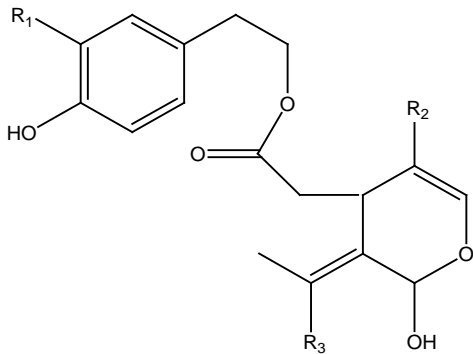
Las cantidades de estos compuestos varían en función de la variedad. En su totalidad este grupo supera los 100 mg/kg de aceite en la mayoría de las muestras analizadas por diferentes investigadores (Hrncirik *et al.*, 2004; Suárez *et al.*, 2008; Servilli *et al.*, 2009; García-Villalba *et al.*, 2010). La **Tabla 1.8**, incluye los principales secoiridoideos y sus derivados identificados en muestras de aceite de oliva. El almacenamiento durante la vida útil del aceite de oliva produce la hidrólisis de estos compuestos dando lugar a un incremento de fenoles simples (3,4-DHPEA y *p*-HPEA) y de la parte acíclica de la molécula.

Se han establecido diversas relaciones entre las características sensoriales del aceite de oliva virgen extra y el contenido en polifenoles. De acuerdo con el trabajo de Gutiérrez-Rosales *et al.*, (2003), las formas aldehídicas y dialdehídicas de los derivados descarboximetilados de la oleuropeína y de los ligustrósido agliconas son los principales compuestos responsables del amargor del aceite. Posteriormente, Mateos *et al.*, (2004)

establecieron una clara correlación entre este atributo y los polifenoles del aceite de oliva virgen extra, en concreto con la forma aldehídica del 3,4-DHPEA-EA.

Otros atributos positivos del aceite de oliva también se han relacionado con el contenido total de polifenoles. Así, la astringencia se produce debido a las interacciones de los polifenoles con las proteínas de la saliva. Su percepción depende del número de radicales hidroxilo unidos a la mitad aromática de la molécula (Inajeros-García *et al.*, 2009). Por otro lado, el compuesto principalmente responsable del picante de los aceites de oliva es la forma descarboximetilada del ligustrósido aglicona, recientemente denominado oleocantal (Andrewes *et al.*, 2003).

Tabla 1.8. Principales secoiridoides identificados en el aceite de oliva virgen extra.

SECOIRIDOIDES AGLICONAS	R ₁	R ₂	R ₃	ESTRUCTURA
Oleuropeína-aglicona (3,4-DHPEA-EA)	OH	COOCH ₃	H	
Ligustrósido aglicona (<i>p</i> -HPEA-EA)	H	COOCH ₃	H	
Hidroxi-oleuropeína aglicona	OH	COOCH ₃	OH	
Metil-oleuropeína aglicona	OH	COOCH ₃	CH ₃	
Descarboximetil-oleuropeína aglicona (3,4-DHPAE-EDA)	OH	H	H	
Hidroxi-descarboximetil-oleuropeína aglicona	OH	H	OH	
Descarboximetil-ligustrósido aglicona u oleocantal (<i>p</i> -HPAE-EDA)	H	H	H	

A parte de las principales familias de los compuestos fenólicos identificados en el aceite de oliva, se ha descrito la presencia de otros compuestos fenólicos derivados como los hidroxi-cromanos. Bianco *et al.*, (2002) detectaron la presencia de dos de estos compuestos, 1-fenil-6,7-dihidroxi-isocromano y su derivado 1-(3'metoxi-4'-

hidroxi) fenil-6,7-dihidroxi-isocromano. Estos compuestos se forman durante la extracción del aceite por reacción del 3,4-DHPEA con diferentes ácidos fenólicos (El Riachy *et al.*, 2011).

Son muchos los trabajos que hacen una cuantificación conjunta del contenido en polifenoles (expresando esta fracción como fenólicos totales, FT). Ya en los años 70, Vázquez-Romero *et al.*, (1975) observó como el contenido en polifenoles totales variaba entre 50 y 500 ppm de ácido cafeico. En aceites israelíes, se observaron valores inferiores a 157 ppm de ácido cafeico (Gutfinger *et al.*, 1981). En aceites turcos, los valores detectados variaron entre 35 y 335 ppm de ácido cafeico, mientras que en aceites griegos los valores se situaron entre 19 y 242 ppm de ácido cafeico (Nergiz y Unal, 1991). Esta variabilidad puede ser atribuida a la variedad de aceituna, al cultivo, al grado de madurez de las aceitunas (mínimo valor cuando las aceitunas están muy maduras), al estado sanitario y de conservación de las aceitunas (las aceitunas dañadas o conservadas mucho tiempo sufren fenómenos de oxidación e hidrólisis formando derivados de mayor polaridad y solubilidad en agua) o al sistema de extracción utilizado para la obtención del aceite de oliva (conforme aumenta el agua utilizada, disminuye su contenido) (Fedelli, 1993, Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005; Bendini *et al.*, 2007).

Estos compuestos, además de dotar al aceite de diferentes atributos organolépticos, han cobrado popularidad debido al número creciente de publicaciones científicas que los relacionan con efectos beneficiosos para la salud humana (Cicerale *et al.*, 2009, 2010; Bendini *et al.*, 2007; Ghanbari *et al.*, 2012; Caramia *et al.*, 2012). El potencial antioxidante de estos compuestos les permite actuar como mecanismo de defensa frente a las especies reactivas del oxígeno (ERO). Las ERO generadas como consecuencia del estrés oxidativo al que está sometido el organismo pueden provocar daños en los lípidos, proteínas y ADN, desencadenando el envejecimiento celular, arterosclerosis, cáncer, así como diferentes enfermedades neurodegenerativas (Caramia *et al.*, 2012). No obstante, no se puede olvidar que aunque en la mayoría de los casos su actividad biológica se ha asociado a su capacidad antioxidante, el mecanismo molecular por el cual estos compuestos producen efectos beneficiosos sobre la salud sigue siendo, a día de hoy y en la mayoría de los casos, desconocido.

Diferentes autores han avalado la capacidad antioxidante de estos compuestos fenólicos. Ya a mediados de los años 90, Baldioli *et al.*, (1996) determinaron la estabilidad oxidativa de fenoles y secoiridoides aislados del aceite de oliva empleando,

para ello, el test Rancimat, siendo los *o*-difenoles los compuestos que poseían una mayor capacidad antioxidante, comparados con el *p*-HPEA o el α -tocoferol.

Estos resultados fueron corroborados y concordantes con posteriores estudios obtenidos por Mateo y colaboradores (Mateos *et al.*, 2003) quienes evaluaron la capacidad antioxidante de fenoles simples, secoiridoides, flavonas y α -tocoferoles, observando como los compuestos 3,4-DHPEA, 3,4-DHPEA-EA y la luteolina presentaban una mayor capacidad antioxidante que el α -tocoferol. Artarjo *et al.* (2006) obtuvieron resultados similares cuando evaluaron la capacidad antioxidante de estos compuestos adicionados al aceite de oliva refinado. En otro trabajo realizado por Carrasco-Pancorbo *et al.*, (2005) se aislaron algunos polifenoles de diferentes muestras de aceite y se determinó su potencial antioxidante. De igual forma que en estudios anteriores, fueron los compuestos *o*-difenoles los que presentaron una mayor capacidad antioxidante.

Los estudios llevados a cabo para evaluar el efecto de los polifenoles sobre la salud cardiovascular han puesto de manifiesto una actividad biológica importante que incluye, de evitar la oxidación de las LDL-colesterol tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* deteniendo el desarrollo del proceso oxidativo (Covas, 2008; De la Torre-Carbot *et al.*, 2010), otras funciones tales como antiagregantes plaquetarios, antihiperlipémicos (Yang *et al.*, 2007; Dell'Agli *et al.*, 2008).

Diferentes autores también han establecido la relación existente entre los polifenoles del aceite de oliva y algunos procesos inflamatorios. Como ejemplo, el 3,4-DHPEA es capaz de intervenir en el metabolismo de los eicosanoides inhibiendo la formación de moléculas proinflamatorias como el leucotrieno B₄ por inhibición del enzima lipooxigenasa (Servilli *et al.*, 2009). Otros compuestos, como el *p*-HPEA-EDA (oleocantal), presenta un efecto similar al producido por el ibuprofeno. Ambos, polifenoles junto con el principio activo del fármaco, son capaces de inhibir las ciclooxigenasas en la ruta biosintética de las prostaglandinas derivadas del ácido araquidónico (Beauchamp *et al.*, 2005).

También se ha investigado la relación existente entre los polifenoles del aceite con enfermedades del síndrome metabólico. Liozzo *et al.*, (2011) evaluaron la actividad de extractos de diferentes variedades de aceite en ensayos *in vitro* con enzimas implicadas en la diabetes (α -amilasa y α -glucosidasa) e hipertensión (enzima convertidora de

angiotensina). En este trabajo, todos los extractos demostraron una actividad *in vitro* hipoglucemiante e inhibidora de la principal enzima asociada con la hipertensión.

Varios autores han relacionado las propiedades bioactivas de los polifenoles del aceite de oliva con la actividad antimicrobiana. Un claro ejemplo es el trabajo de Medina *et al.*, (2006) en el cual se demostró la actividad bactericida de estos compuestos frente a un amplio espectro de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Los compuestos responsables de esta actividad fueron el 3,4-DHPEA, el *p*-HPEA, el 3,4-DHPEA-EDA, y el *p*-HPEA-DEA. De todos ellos, el polifenol que mostró una mayor correlación con la actividad bactericida fue el *p*-HPEA-DEA. Este compuesto también fue el principal responsable de la actividad bactericida demostrada frente al *Helicobacter pylori*, indicando que podrían estar también relacionados con la prevención de la úlcera gástrica (Romero *et al.*, 2007).

Sin embargo la mayor popularidad de estos compuestos bioactivos se debe fundamentalmente a sus efectos beneficiosos sobre la función celular y, en gran medida, a la acción preventiva en el desarrollo de tumores malignos al evitar el daño oxidativo del ADN (Cicerale *et al.*, 2009). En los últimos años numerosos estudios *in vitro* han puesto de manifiesto la actividad anticancerígena de los polifenoles del aceite de oliva. Investigaciones como la llevada a cabo por Fabiani *et al.*, (2011) pusieron de manifiesto la existencia de una relación positiva entre el contenido en secoiroides y alcoholes fenólicos con una mayor actividad anticancerígena. Además comprobaron que el extracto fenólico completo presentó una mayor actividad que los compuestos aislados, lo que podría indicar efectos sinérgicos entre este tipo de compuestos. Otros investigadores, en el mismo campo, han demostrado que los polifenoles del aceite evitan la peroxidación lipídica en líneas celulares intestinales (Deiana *et al.*, 2010).

En otros estudios tales como los de Menéndez *et al.* (2007) y el de Warleta *et al.* (2011), se evaluó la actividad anticancerígena de los compuestos fenólicos en el caso del cáncer de mama. Se llegó a la conclusión de que estos fenoles son capaces de inhibir el crecimiento de las células cancerígenas y de reducir su expresión, aunque el mecanismo de acción no ha sido dilucidado.

Los pigmentos presentes en el aceite de oliva se dividen en dos grupos: clorofilicos y carotenoides. Los pigmentos clorofilicos o clorofilas son los pigmentos fotosintéticos más importantes presentes en el aceite de oliva. La molécula de clorofila (**Figura 1.8**) presenta básicamente cuatro anillos pirrólicos sustituidos, uno de los

cuales está reducido, y se hallan coordinados con un ión Mg^{2+} . El carácter hidrofóbico de estos compuestos se debe a la presencia del fitol, alcohol insoprenoide monoinsaturado de estructura C20, que se encuentra esterificando el ácido propiónico de la molécula de clorofila. En las plantas superiores, sólo están presentes la clorofila *a* y *b*. La diferencia entre ellas estriba en que la clorofila *a* tiene un grupo metilo en el carbono número 3 mientras que la clorofila *b* posee un grupo formilo. Las clorofilas son los pigmentos hidrosolubles responsables del color verde del aceite de oliva, aun así una proporción de estos pigmentos clorofílicos se oxidan, transformándose en feofitinas, cuando el ion Mg^{+2} del anillo central porfirínico es sustituido por un H^+ . Estos últimos compuestos son los responsables del color marrón que toman los aceites en estado avanzado de oxidación o los que se elaboran de aceitunas más maduras (Gandul *et al.*, 1996).

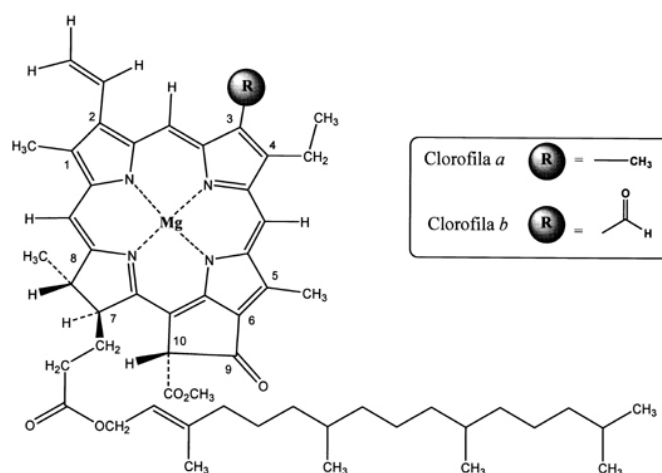


Figura 1.8. Estructura de las clorofilas *a* y *b*.

Los pigmentos carotenoides, desde el punto de vista químico, se clasifican como terpenoides y se consideran biosintéticamente derivados del ácido mevalónico, intermediario metabólico que aporta la unidad básica estructural. Se dividen en dos grandes grupos: los carotenos (**Figura 1.9a**), que son estrictamente hidrocarburos, estos compuestos mayoritariamente son β -caroteno, y las xantofilas (**Figura 1.9b**), que contienen oxígeno, en el aceite de oliva principalmente se encuentran en forma de luteína. Los carotenoides son los pigmentos responsables de la mayoría de los colores amarillos y anaranjados de numerosas frutas y verduras.

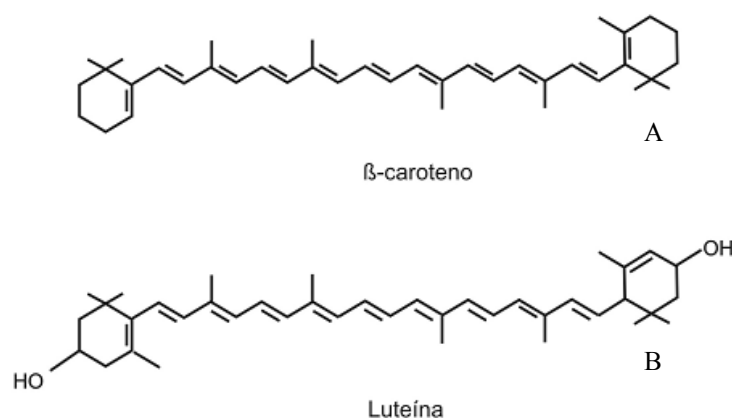


Figura 1.9. Esquema de los carotenos (a) (β -caroteno) y xantofilas (b) (luteína)

Ya se ha argumentado que el color característico del aceite de oliva depende en gran medida de las clorofilas y de los pigmentos presentes. No obstante, en el correspondiente Reglamento (CEE) 2568/91 y actualizaciones, no se exige un análisis de la pigmentación.

El color es una propiedad sensorial con una fuerte influencia sobre la aceptación de los alimentos, ya que contribuye de manera decisiva a la percepción inicial que uno puede tener sobre la madurez, grado de procesamiento, y otras características de los alimentos (Alos *et al.*, 2006). En el caso de las aceitunas, este hecho ha llevado al establecimiento de índices de madurez basados en la medida del color (Rapisarda *et al.*, 2001). Aunque, el color del aceite de oliva depende no solo del grado de madurez de la aceituna, sino también de la variedad, el área de cultivo, el periodo de recolección así como de los métodos de elaboración utilizados (Benedito *et al.*, 2002).

El papel del color en la aceptación de los alimentos por parte de los consumidores ha llevado, en la última década, a la realización de numerosos estudios que tienen por objetivo la caracterización de este atributo junto a otros parámetros de calidad (Meléndez-Martínez *et al.*, 2007). De igual forma, muchas investigaciones se han llevado a cabo con el objetivo de evaluar los cambios de color durante la maduración (Dufossé *et al.*, 2005), la conservación (Gonçalves *et al.*, 2007), etc. Sin embargo, en los últimos años los estudios se han dirigido hacia la correlación mediante modelos estadísticos, del color con el contenido en pigmentos (Méndez-Martínez *et al.*, 2003; Ruíz *et al.*, 2005; Meléndez-Martínez *et al.*, 2007). Estos estudios ofrecen una serie de ventajas no solo para los científicos, sino también para los productores de alimentos y para la industria agroalimentaria, en general.

Los *esteroles* son alcoholes de elevado peso molecular con una cadena lateral alifática que forman parte de la fracción insaponificable del aceite, pudiendo estar en forma libre o esterificada con ceras triterpénicas. En el aceite de oliva virgen, el esteroles mayoritario es el β -sistosterol (**Figura 1.10**), seguido del Δ -5-avenasterol, el campesterol, y el estigmasterol, así como otros esteroles minoritarios como el colesterol, el campestanol, el Δ -7-campesterol, el clerosterol, el Δ -5,24-estigmastadienol, el Δ -7-estigmastenol y el Δ -7-avenasterol (Sanchez *et al.*, 2009). Aunque usualmente su análisis se relaciona con estudios de pureza, existen trabajos donde se relaciona la composición esterólica con factores de variedad, maduración, zona de producción y proceso extractivo (Berenguer *et al.*, 2006; Lazzez *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2009; Krichene *et al.*, 2009; Ilyasoglu *et al.*, 2010). Las técnicas más utilizadas para analizar los esteroles se basan en diferentes métodos espectrofotométricos, mediante HPLC, y en particular, utilizando cromatografía de gases (GC).

Estos esteroles se han relacionado con efectos cardiosaludables, no tanto por sus propiedades antioxidantes o antitrombóticas, sino por reducir los niveles de LDL-colesterol plasmático. Los esteroles presentan una estructura molecular análoga que deriva del ciclopentanoperhidrofenantreno. Debido a su similitud estructural con el colesterol, les permite establecer competencia con las moléculas del colesterol dietético limitando o reduciendo su absorción a través de la barrera intestinal (Ghanbari *et al.*, 2012).

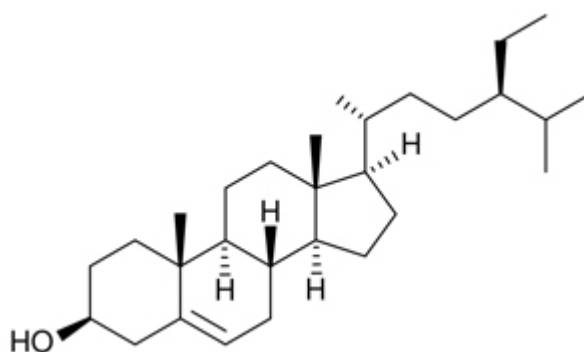


Figura 1.10. Estructura del β -sisterol.

Los hidrocarburos triterpénicos (escualeno), y los alcoholes triterpénicos (eritrodiool y uvaol) los cuales son cromatografiados junto con los esteroles, están generalmente localizados en el exocarpo de la aceituna (Chistopoulou *et al.*, 1996).

Durante la maduración de la aceituna, se incrementa la concentración de estos compuestos cuanto más frágil se hace el exocarpo y, por tanto, más se fragmenta durante la molturación de la aceituna (Sanchez *et al.*, 2004). El escauleno representa el 40 % del total de la fracción insaponificable. A este hidrocarburo triterpénico se le ha relacionado con propiedades inmunomoduladoras y anticancerígenas frente a diferentes tipos de tumores, tales como el cáncer de mama, de colon y de próstata (Ghanbari *et al.*, 2012). Recientes estudios *in vitro* han demostrado que, a pesar de poseer una baja capacidad antioxidante, este compuesto es capaz de evitar el daño oxidativo del ADN producido por las ERO en células epiteliales mamarias (Warleta *et al.*, 2010). Este hecho puso de manifiesto que este compuesto podría contribuir al efecto preventivo que ejerce el aceite de oliva sobre esta patología, pero no paliativo. Esta observación podría ser una de las causas de la menor incidencia de cáncer de mama en poblaciones de países mediterráneos. Por su parte, el *eritrodiol* y *uvaol* parecen estar relacionados con efectos cardiovasculares, así Allouche *et al.*, (2010) evaluaron la actividad antiaterogénica de estos compuestos *in vitro* sobre las LDL, junto con otros ácidos relacionados, el ácido maslínico y el ácido oleanico, los cuales están presentes en la piel de la drupa de oliva y en los subproductos que se originan durante el proceso de elaboración del aceite de oliva. Los resultados obtenidos pusieron de relieve las propiedades antioxidantes y antitrombóticas del eritrodiol y del uvaol, propiedades que justificarían la actividad antiaterogénica previamente reportada en la literatura científica.

Los *tocóferoles* son otros de los constituyentes importantes dentro de la fracción insaponificable, de hecho comprenden entre el 2,8 y el 3,5% del total de los componentes minoritarios. La forma α -tocoferol (**Figura 1.11**) es la que representa más del 90 % de todas las formas encontradas en el aceite de oliva. Se caracteriza por su actividad biológica vitamínica. El término “vitamina E” es utilizado para denominar a los tocoferoles, siendo la forma α la más activa, y considerada, por tanto, la auténtica vitamina (Salvador *et al.*, 2003). Se han realizado numerosas investigaciones determinando el contenido de tocoferoles presentes en aceites de oliva de diferente procedencia y, en todos los casos, se observó un amplio rango de concentración. Su contenido depende mucho tanto de la variedad de aceituna como de la época de recolección, encontrándose un mayor porcentaje al principio de la campaña (Fedelli, 1993). A modo de ejemplo, Psomidou *et al.*, (2000) analizaron el contenido de α -tocoferol de 90 aceites de oliva virgen de diferentes variedades cultivadas en diferentes

regiones de Grecia durante tres campañas consecutivas. Se observó que más del 60% de las muestras contenían valores superiores a los 200 ppm de α -tocoferol. En diferentes aceites de oliva italianos los valores encontrados de α -tocoferol estuvieron comprendidos entre 55 y 315 ppm (Esti *et al.*, 1996; Manzi *et al.*, 1998). En aceites de procedencia española, el contenido de α -tocoferol mostró una clara dependencia de la variedad de aceituna; así para la variedad *cornicabra* se encontraron valores comprendidos en un rango situado entre 55 y 234 ppm (Salvador *et al.*, 1999), para las variedades *hojiblanca* y *picual* obtuvieron valores de 114-283 ppm y 223-432 ppm, respectivamente (Aparicio *et al.*, 1999).

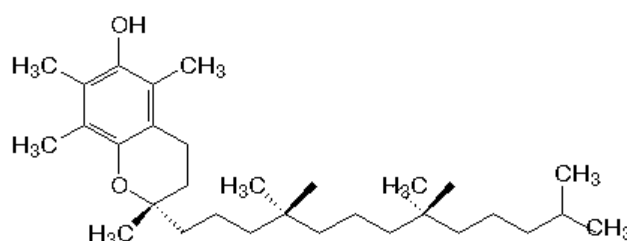


Figura 1.11- Estructura del α -tocoferol

Debido al carácter antioxidante de la vitamina E, este compuesto evita la oxidación de los lípidos de las membranas celulares en los sistemas biológicos, previene los desórdenes de la piel, así como la arterosclerosis y actúa frente a diferentes tipos de cáncer (Psaltopoulou *et al.*, 2011).

Finalmente, la última familia de compuestos minoritarios que caracterizan el aceite de oliva son los *compuestos volátiles* responsables del aroma del aceite de oliva. Existe una amplia bibliografía donde se relacionan las características organolépticas del aceite de oliva con los distintos compuestos aromáticos identificados en el aceite de oliva (Angerosa *et al.*, 1998 y 2004; Dabbou *et al.*, 2009; Bendini *et al.*, 2009; Vekiari *et al.*, 2010). La mayor parte de aromas responsables del frutado de aceituna y sus matices verdes son los que derivan de la acción de la lipoxigenasa (LOX) sobre los ácidos linoleico y linolénico (Morales *et al.*, 1997; Angerosa *et al.*, 1998; Lerker *et al.*, 1999; Padilla *et al.*, 2009). De manera resumida, la LOX promueve la formación del 9- y del 13-hidroperóxido de dichos ácidos grasos. Posteriormente, la acción de lipasas específicas rompen los peróxidos para formar aldehídos C6, que en el caso de ser insaturados, pueden pasar de la configuración cis-3 a la trans-2 (más estable), por la acción de una isomerasa; por otra parte, los aldehídos C6 pueden ser reducidos a los correspondientes alcoholes (por la alcohol-desidrogenasa), que a su vez dan lugar a

ésteres (por la alcohol-acetil-transferasa) (Servili *et al.*, 2009). Cada uno de estos compuestos puede asociarse a determinados aromas vegetales, como el frutado verde (hexenal), manzana (E-2-pentenal), verde hoja (cis-3-hexenal), etc (Lercker *et al.*, 1999; Angerosa *et al.*, 2004; Bendini *et al.*, 2009). En el caso concreto del ácido linolénico, la LOX puede catalizar la formación de radicales estables 1,3-penteno, que pueden dimerizarse para formar hidrocarburos C10 (dímeros penteno), o pueden reaccionar con un radical hidroxilo originando alcoholes C5, que a su vez pueden oxidarse a compuestos carbonilo C5 (Servili *et al.*, 2009).

Otros compuestos aromáticos se han asociado a características sensoriales que se corresponden con aromas no deseables, de hecho es probable que los aldehídos formados, sean los principales responsables del sabor desagradable (Angerosa *et al.*, 2004). Morales *et al.* (1997) observaron que cuando al aceite de oliva virgen es forzado a un proceso de termo-oxidación, en la primera hora de ésta, desaparecen la mayoría de los compuestos volátiles responsables de las características sensoriales agradables del aceite de oliva virgen, formándose compuestos sensorialmente desagradables. La presencia del nonanal (no detectado en aceites de oliva virgen y virgen extra) podría ser utilizado para determinar la iniciación de la oxidación. Morales *et al.* (1997) encontró compuestos carbonílicos saturados, tales como el pentanal, hexanal, octanal, nonanal, como los principales compuestos formados en el aceite de oliva oxidado (almacenado durante 6, 8 y 16 días a 60 °C).

Solinas *et al.* (1987) estudió la relación entre la rancidez percibida y el contenido en 2-pentenal, hexanal, 2-heptenal, 2-octenal, octanal y nonanal. El 2-pentenal y el 2-heptenal fueron los principales indicadores de rancidez, con umbrales de 0,5 y 1,5 ppm, respectivamente (Kalua *et al.*, 2007a).

Cabe mencionar la importancia que tienen las características organolépticas del aceite de oliva. El olor y el sabor de un alimento produce placer, y es el principal reclamo para la aceptación de los consumidores.

La complejidad y el equilibrio entre los diferentes compuestos que conforman el aceite de oliva, hacen, de éste, uno de los alimentos clave en la dieta mediterránea, e incluso hay autores que lo definen, en base a todas sus propiedades beneficiosas para la salud, como un verdadero alimento funcional (Lozano-Sanchez *et al.*, 2010).

1.4. Calidad del aceite de oliva

La calidad del aceite de oliva se puede definir como el conjunto de propiedades o atributos del aceite, los cuales determinan el grado de aceptación por parte del consumidor respecto a un determinado uso (Carpio y Jiménez, 1993).

Según el Reglamento (CE) 61/2011 de la Comisión, de 24 de enero de 2011, por el que modifica el Reglamento (CEE) 2568/91 de la Comisión, de 11 de julio de 1991, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis, la calidad del aceite de oliva viene definida mediante determinaciones químicas como son: el grado de acidez, el estado de oxidación y la detección de anomalías, así como por los resultados derivados del análisis sensorial relativos a las características organolépticas del aceite, definidas por parte de un panel oficial de catadores a partir de la degustación realizada en el laboratorio de cata, cualificando y cuantificando los atributos positivos (principalmente el frutado) así como la ausencia-presencia de defectos. Básicamente, el análisis sensorial viene legislado por el Reglamento (CE) 640/2008 de la Comisión, de 4 de julio de 2008, el cual modifica el Reglamento general (CEE) 2568/91.

1.4.1. Parámetros físico-químicos de calidad

Las determinaciones químicas más importantes que rigen la calidad y la categoría del aceite de oliva son:

- Grado de acidez (GA): expresa el porcentaje de ácidos grasos libres presentes en el aceite de oliva. Su valor se expresa como porcentaje de ácido oleico. La normativa actual define los límites del grado de acidez para las diferentes categorías de aceite de oliva. Se considera el límite para el aceite de oliva virgen extra en 0,8 % ácido oleico, mientras que para el aceite de oliva el límite se encuentra en el 2 % ácido oleico, valores superiores a este valor, califican al aceite como lampante (aceite no apto para ser embotellado ni para el consumo humano). Este parámetro, debido a la sencillez de su análisis, se utiliza mayoritariamente en las almazaras para clasificar, en primera instancia el aceite de oliva, sin embargo, únicamente con este análisis no se puede clasificar el aceite de oliva. Es importante destacar que el GA no condiciona el sabor del aceite de oliva y solo puede ser detectado mediante un análisis químico.

- Índice de peróxidos (IP): Es uno de los índices más utilizados en la química del aceite de oliva. Este parámetro ofrece información sobre el estado primario de oxidación de los ácidos grasos. El oxígeno atmosférico actúa sobre el aceite de oliva provocando la oxidación de los ácidos grasos al fijarse en las cadenas de éstos, inicialmente sobre los dobles enlaces provocando la formación de peróxidos. Este índice se mide en miliequivalentes de oxígeno por kg de aceite (meq.O₂/kg aceite). Según el reglamento actual, el límite entre el aceite de oliva apto para ser embotellado y consumido (virgen extra y virgen) y el lampante es de 20 meq.O₂/kg aceite).
- Prueba espectrofotométrica al ultravioleta (índices K₂₃₂ y K₂₇₀): Estos coeficientes están relacionados con la calidad del aceite de oliva derivado de su estado de conservación y de las posibles alteraciones causadas durante el proceso de extracción. Esto se debe a que algunos compuestos de oxidación primaria (peróxidos e hidroperóxidos) formados durante la extracción y el almacenamiento del aceite, absorben a 232 nm, mientras que los productos de oxidación secundaria (aldehídos, cetonas, etc.) lo hacen a longitudes de onda más elevadas (232, 268, 270 y 274 nm).

De acuerdo con las últimas modificaciones del Reglamento (CEE) 2568/91, un aceite de oliva para clasificarse como aceite de oliva virgen extra debe presentar valores del GA $\leq 0,8$ % ácido oleico; IP ≤ 20 meq.O₂/kg aceite; K₂₃₂ $\leq 2,50$ y K₂₇₀ $\leq 0,22$. Para la categoría virgen, los valores máximos correspondientes a los parámetros de calidad corresponden a: 2,0 % ácido oleico para el GA; 20 meq.O₂/kg aceite para el IP y 2,6 y 0,25 para los coeficientes K₂₃₂ y K₂₇₀, respectivamente. Cuando el aceite supera uno o más de estos valores, el aceite se considera lampante y por tanto no apto para su comercialización.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, además de cumplir con las especificaciones físico-químicas mencionadas, es necesario realizar un análisis sensorial del aceite para poder definir correctamente la categoría del aceite de oliva.

1.4.2. Análisis sensorial del aceite de oliva

La valoración de los diferentes atributos positivos y defectos que conforman el análisis sensorial del aceite de oliva viene establecida por el método científico elaborado por el Consejo Oleícola Internacional (COI) mediante la norma COT-T20/Doc. nº15

Rev. del 2 de septiembre de 2007 y por el Reglamento (CE) 640/2008 de la Comisión, de 4 de julio de 2008. Dichos métodos tienen como objetivo establecer los criterios necesarios para poder valorar las características del “flavor” (conjunto de percepciones de los estímulos olfactivegustativos, táctiles y quimiosintéticos que pretenden identificar un alimento) del aceite de oliva y definir la sistematización necesaria para llevarlos a cabo.

Es una apreciación general entre los catadores e investigadores en aceite de oliva, que la zona geográfica, las condiciones agroclimáticas, el estado de madurez de la aceituna y los efectos de posibles enfermedades, inciden tanto en la composición química como en las características organolépticas del aceite producido.

Aunque en las diferentes normativas sobre la calidad de los alimentos tengan igual importancia tanto las propiedades físico-químicas como sensoriales, son estas últimas las que determinan el grado de aceptación por parte de los consumidores

El panel de catadores, por una parte, informa de la presencia o no de defectos, midiendo la intensidad los mismos en el caso de ser detectados, y, por otra, valora y cuantifica la presencia de atributos positivos, entre los cuales cabe destacar (Rosselló *et al.*, 2003; Barranco *et al.*, 2008):

- Frutado de aceituna: aroma que recuerda al fruto del olivo y que puede presentar matices verdes o maduros, tiene cierto carácter varietal y depende del estado de la aceituna (sana, fresca, verde o madura). Se trata de una sensación compleja relacionada con la presencia de diversas moléculas aromáticas, muchas de las cuales se originan por vía enzimática durante los procesos de trituración y batido de la aceituna.
- Verde: Si las aceitunas son verdes y/o van acompañadas de cantidades significativas de tallos y hojas, el aceite de oliva presenta unas notas verdes que recuerdan a la hierba o a la hoja. Según la variedad también se pueden percibir ciertos tonos de hierbas aromáticas y/o de tipo floral.
- Amargo: Sabor elemental característico del aceite de oliva obtenido de aceitunas verdes o en envero. Se percibe en las papilas circunvaladas de la uve lingual (parte posterior de la lengua) y está relacionado con la presencia de polifenoles.

- Picante: Sensación táctil de picante, característico de aceites producidos al comienzo de la campaña, principalmente de aceitunas todavía verdes. Se percibe en toda la cavidad bucal, especialmente en la garganta, y como en el caso del atributo amargo, está fuertemente relacionado con el contenido de compuestos fenólicos, y por lo tanto, con la variedad de aceituna.
- Astringente: hace referencia a la sensación de sequedad en la boca debido a la presencia de ciertos compuestos fenólicos que interaccionan con la saliva.
- Dulce: Sabor relacionado con la presencia de azúcares, aunque en el caso particular del aceite de oliva, está relacionado con la falta de sensación de amargor, picor y astringencia. Esta sensación es típica de aceites procedentes de aceitunas maduras o de aceites viejos.

En el caso de los atributos negativos o defectos que pueden aparecer en el aceite de oliva cabe mencionar (Rosselló *et al.*, 2003; Kalua *et al.*, 2007a):

- Atrojado: sensación aromática relacionada con frutos fermentados por acción microbiana en ausencia de oxígeno.
- Borras: sensación aromática debida a la fermentación de sustancias de decantación de la parte baja de los depósitos de aceite, por acción microbiana y en ausencia de oxígeno. Se trata de un defecto parecido al anterior en sus causas, pero que tiene una percepción diferente y normalmente muy desagradable.
- Moho-Humedad-Tierra: sensación aromática y también de boca que recuerda los frutos enmohecidos, normalmente precedentes del suelo o de trujales donde los frutos han permanecido demasiado tiempo a la intemperie antes de ser procesados.
- Avinado-Agrio-Avinagrado: aroma de etanol, de lácticos fermentados o de vinagre, debido a la presencia de dichos compuestos por acción microbiana sobre los azúcares de la aceituna antes de ser procesados.
- Rancio: sensación aromática propia de aceites viejos y oxidados.
- Metálico: sensación aromática propia de aceites que han estado en contacto, durante un tiempo prolongado, con superficies metálicas, durante los procesos de molienda, batido, prensado o almacenamiento.

- *Otros defectos*: debidos a distintas alteraciones de los frutos (aceites heladas, gusano, salmuera, etc.) o del aceite (metálico, alpechín, etc.).

La valoración de los resultados la realiza el jefe del panel, calculando la mediana de cada atributo así como su coeficiente de variación sólida. Si el coeficiente de variación sólida de los atributos supera el 20% debe repetirse la sesión de cata.

Actualmente, en función del análisis organoléptico, el aceite de oliva puede clasificarse en tres categorías: “Virgen Extra”, “Virgen” y “Lampante” en función de la mediana de los posibles defectos (Md) que se pueden encontrar en el aceite y del atributo *frutado de aceituna* (Mf) obtenidas por el panel de cata. En este sentido, la categoría “Virgen Extra” debe tener una Md=0 y una Mf>0, la categoría “Virgen” debe tener una Md<3,5 siempre y cuando tenga una Mf>0. Los aceites “Lampantes” son todos aquellos que no cumplan lo anteriormente expuesto y aquellos que tengan una Md>3,5.

Con el fin de garantizar la fiabilidad de los resultados, los paneles de cata oficiales deben estar certificados por la norma internacional ISO 17025. Entre otros requisitos, dicha norma exige trazabilidad, confidencialidad del origen de las normas, un adecuado sistema de documentación y, especialmente, un exhaustivo sistema de control de la fiabilidad del grupo tanto a nivel de exactitud como de precisión (Romero-Aroca *et al.*, 2009).

1.5. Conservación del aceite de oliva

El aceite de oliva se considera como un producto vivo y como tal se ha de tener especial cuidado a la hora de manipularlo, almacenarlo y conservarlo, ya que si se hace en condiciones deficientes puede experimentar cambios que pueden alterar sus propiedades, tanto físico-químicas como organolépticas (Bendini *et al.*, 2009).

Hoy en día, la principal preocupación por parte de los productores y envasadores del aceite de oliva es el poder garantizar la estabilidad del aceite el mayor tiempo posible. En el caso especial del aceite de oliva las reacciones de oxidación son la principal causa de la pérdida de calidad, y la velocidad de ésta, uno de los factores más importantes que determinan de vida útil del aceite de oliva.

Por lo tanto, para mantener la calidad de los componentes volátiles y no volátiles (fenoles y otros compuestos minoritarios) responsables de las características

organolépticas así como de las propiedades nutritivas, tan apreciadas del aceite de oliva, durante el almacenamiento y conservación, es absolutamente imprescindible controlar todos y cada uno de los factores que afectan a la oxidación lipídica.

La elevada estabilidad oxidativa del aceite de oliva virgen extra con respecto a otros aceites vegetales se debe, principalmente, a la composición de ácidos grasos, en particular, a la elevada relación entre ácidos mono- y poli-insaturados, así como a la presencia de algunos compuestos minoritarios que juegan un papel imprescindible en la preservación de la oxidación (Bendini *et al.*, 2009).

Pese a la elevada estabilidad oxidativa del aceite de oliva, este también es susceptible a experimentar procesos oxidativos como son la oxidación enzimática, que se produce normalmente durante las etapas de extracción, en frituras, la foto-oxidación (exposición del aceite de oliva a la luz), la auto-oxidación que se produce, principalmente cuando el aceite de oliva está en contacto con el oxígeno (atmosférico y/o disuelto en la matriz lipídica) durante la extracción, envasado y conservación (Frankel, 1985; Bendini *et al.*, 2009).

La oxidación lipídica es la consecuencia de la interacción entre el triacilglicerol de los ácidos grasos y el oxígeno molecular presente en la matriz del aceite de oliva. El principal producto de esta reacción son los hidroperóxidos, los cuales se generan mediante un mecanismo que incluye la aparición de radicales libres. Esta reacción de oxidación presenta una energía de activación elevada, esto hace que la reacción aumente la velocidad en presencia de precursores tales como trazas de metales, la luz o la temperatura (Bendini *et al.*, 2009).

La inestabilidad de los hidroperóxidos hace que se descompongan rápidamente originando una gama o batería de productos volátiles y no volátiles, tales como aldehídos, entre otros, que son la causa principal de la sensación a rancio en aceites vegetales (Angerosa, 2004).

Entre otros factores, además de la temperatura y la exposición a la luz, que puede influir notablemente en la oxidación de los lípidos se encuentran la permeabilidad del oxígeno a través del material del envase, así como el oxígeno atmosférico presente en el espacio comprendido entre la superficie del aceite y la parte inferior del tapón de la botella (Bendini *et al.*, 2009).

Cabe destacar que el efecto de la oxidación viene atenuado mediante la presencia de compuestos antioxidantes tales como polifenoles y carotenos los cuales actúan como inhibidores de las reacciones de auto-oxidación, mientras que los tocoferoles, clorofilas y los fosfolípidos demuestran sus actividades anti- y pro-oxidantes en función del tipo de aceite y de las condiciones utilizadas para su almacenamiento (Choe y Min, 2006).

1.5.1. Factores físicos a tener en cuenta durante el almacenamiento del aceite de oliva

Tal y como se ha mencionado anteriormente, en la etapa de almacenamiento y conservación es especialmente importante controlar los factores físicos que promueven la oxidación lipídica con la finalidad de evitar la alteración del aceite de oliva y, por consiguiente, alargar su vida útil.

Los principales factores que deben tenerse en cuenta para un adecuado almacenamiento son los siguientes:

- Disponibilidad de oxígeno.

El nivel de oxígeno presente en el aceite está correlacionado con la presión parcial y la difusión de éste desde la atmosfera hacia el interior de la matriz lipídica. Esta difusión está relacionada e influenciada por las condiciones y procesos utilizados en la elaboración del aceite (batido, centrifugado, decantación, filtrado, etc.)

Una vez producido el aceite de oliva, éste se lleva a los tanques de almacenamiento. La configuración de estos también puede influir de forma notable en la conservación de aceite. En el caso de los depósitos y de las botellas, en los cuales la relación volumen-superficie de contacto con el aire es relativamente pequeña, la difusión del oxígeno del aire hacia el interior del aceite es un factor que determina la cinética del proceso oxidativo y depende del mecanismo de difusión (Yanishlieva-Maslarova, 2001). En este sentido, en el caso de botellas, el volumen de aire presente entre la superficie del aceite y el tapón del recipiente es uno de los factores más importantes a considerar para reducir la disponibilidad de oxígeno. Es evidente que a más volumen de aire atmosférico en contacto con el aceite de oliva, mayor es la disponibilidad de oxígeno que puede interaccionar con la parte lipídica del aceite. En la misma línea de lo expuesto anteriormente, es de vital importancia controlar la porosidad de la tapa del depósito o tapón del envase, así como la permeabilidad del oxígeno a través del material con el cual se fabrica el envase. Todos estos factores pueden jugar un

papel muy importante en la estabilidad del aceite de oliva durante el almacenamiento o conservación (Gutiérrez-Rosales *et al.*, 1988; Del Nobile *et al.*, 2003).

Para eliminar el factor de oxidación atribuido al oxígeno atmosférico presente en el espacio de cabeza, se han realizado estudios en los cuales se ha desplazado el aire del espacio de cabeza mediante un gas inerte. Se ha observado como el uso de nitrógeno o argón puede evitar o reducir de forma significativa el grado de oxidación del aceite durante el período de almacenamiento (Di Giovacchino *et al.*, 2002).

En este mismo contexto, se han publicado algunos resultados sobre la permeabilidad del oxígeno en diferentes materiales plásticos, comparando la estabilidad del aceite de oliva virgen en función del material del envase. En el trabajo de Tawfit y Kuyghebaert, (1999) se observó como la estabilidad en los envases de policloruro de vinilo (PVC) era mayor que en envases de polietilenterftalato (PET), y a su vez, mejor que en envases de polipropileno (PP) y de poliestireno (PS).

Por otro lado, las diferencias observadas en el tiempo de vida útil del aceite de oliva envasado en botellas de PVC o en vidrio, son atribuidas principalmente a la diferencia de oxígeno disuelto en el aceite de oliva y no a la permeabilidad del PVC o del vidrio (Sacchi *et al.*, 2008).

A día de hoy, no se han encontrado estudios en los cuales se elimine, parcial o totalmente, el oxígeno disuelto en la matriz del aceite mediante procedimientos físicos para minimizar las reacciones de oxidación del aceite de oliva en los depósitos o envases durante el periodo de conservación.

- Temperatura de conservación

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la temperatura de almacenamiento es uno de los parámetros más relevantes a tener en cuenta. Son muchos los trabajos que han evaluado el efecto de la temperatura sobre la estabilidad y la vida útil del aceite de oliva. Entre éstos, cabe destacar un estudio de carácter cinético en el cual se observó la evolución de la reacción de oxidación del aceite de oliva almacenado a diferentes temperaturas (25, 40, 50, 60 y 75 °C), en ausencia de compuestos pro- y anti-oxidantes. Los autores de este trabajo observaron como el valor de la constante de reacción de oxidación aumentaba de manera exponencial a medida que se elevaba la temperatura (Gómez-Alonso *et al.*, 2004).

El efecto de la temperatura sobre la oxidación de aceite de oliva es bastante complejo. Al mismo tiempo que un aumento de la temperatura de almacenamiento promueve un aumento en la formación de hidroperóxidos, también reduce la solubilidad del oxígeno dentro de la matriz del aceite y aumenta la descomposición de los mismos hidroperóxidos, alternando el perfil de los compuestos de oxidación formados en esta etapa (Ragnarsson y Labuza, 1977; Velasco y Dobarganes, 2002).

- Exposición a la luz

La luz es otro de los factores importantes a tener en cuenta en el proceso de oxidación del aceite de oliva durante el almacenamiento, ya que puede actuar como iniciador o precursor de la auto-oxidación así como promover, lo que se conoce como foto-oxidación. Por lo tanto, evitar la incidencia de luz durante el almacenamiento es vital para alargar la vida útil del aceite de oliva (Caponio *et al.*, 2005). No obstante, con frecuencia, el aceite de oliva virgen extra se suele proteger de la luz en el momento de extracción hasta que se exponen en los puntos de venta. Es a partir de este momento donde la opacidad de los envases es fundamental para su conservación (Gutiérrez-Rosales *et al.*, 1988; Méndez y Falques *et al.*, 2007).

1.5.2. Factores químicos a tener en cuenta durante el almacenamiento del aceite de oliva

Además de los factores físicos externos descritos anteriormente, la susceptibilidad del aceite de oliva a la oxidación también se ve influenciada por su composición química. Entre los diferentes componentes químicos que pueden afectar a la calidad del aceite durante su almacenamiento cabe destacar:

- Triglicéridos (TAGs)

La susceptibilidad de los lípidos a los procesos de oxidación aumenta de forma considerable en función del grado de insaturación que presentan los ácidos grasos que conforman los triglicéridos. Ya en 1947 un estudio realizado por Holman y Elmer demostró que el linoleato es 40 veces más reactivo que el oleato, y que el linoleato, 2,4 veces más reactivo que el linoleato.

- Ácidos grasos libres (AGL).

Los ácidos grasos libres presentan un efecto pro-oxidante (Miyashita y Takai, 1986; Bendini *et al.*, 2009). Por lo tanto es especialmente importante contar con niveles

bajos de AGL (así como de hidroperóxidos) en el aceite de oliva recién elaborado, ya que estos compuestos pueden acelerar de forma significativa los procesos de oxidación.

El efecto pro-oxidante de los AGL se debe al grupo carboxílico, el cual acelera la descomposición de los hidroperóxidos (Miyashita y Takay, 1986; Frega *et al.*, 1999). De hecho, los valores de estabilidad oxidativa del aceite de oliva aumentan proporcionalmente con el aumento del porcentaje en ácido oleico.

- Fenoles

Tal y como se ha mencionado anteriormente, existe una relación directa entre el contenido de compuestos fenólicos y la estabilidad oxidativa del aceite de oliva. En el caso del hidroxitirosol y sus derivados secoiriodides muestran una actividad antioxidante muy semejante a la de los fenoles (Baldioli *et al.*, 1996; Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2005), su capacidad antioxidante se debe a la formación de un radical estable que evita la iniciación de las reacciones de oxidación (Vasolini y Galli, 1998). Por otro lado, el tirosol y sus derivados presentan una baja actividad antioxidante a causa de la ausencia de grupos capaces de ceder electrones y de una elevada energía de transmisión que dificulta la formación de estos radicales libres estables.

La presencia de estos compuestos fenólicos en el aceite de oliva, es extremadamente importante dada su capacidad de evitar la oxidación de los lípidos en las etapas iniciales donde tienen lugar este tipo de reacciones.

- Pigmentos

Los carotenos, en especial el β -caroteno, se comporta como un auténtico protector ante la foto-oxidación del aceite de oliva ya que son capaces de desactivar el oxígeno singlete transformándolo a su estado no reactivo de triplete (Wagner *et al.*, 1999).

Por otro lado, la capacidad que tiene la molécula de la clorofila para absorber la energía lumínica y transferirla a otras sustancias químicas, hace que este compuesto sea especialmente activo a la oxidación lipídica del aceite de oliva. Aún así, las clorofilas también pueden actuar como antioxidantes cuando el aceite se conserva en ausencia de luz, probablemente debido a su capacidad como donante de hidrógeno (Psomiadou y Tsimidou, 2002).

- Trazas de metales

Los metales de transición como el hierro (Fe) o el cobre (Cu), pueden actuar como catalizadores de la descomposición de los hidroperóxidos, generando radicales libres, peroxilos y alcoholilos, los cuales inician una oxidación en cadena vía radicales libres (Benjollou *et al.*, 1991). Bendini *et al.*, (2006) observó como la estabilidad del aceite de oliva virgen extra, medida a partir del índice de peróxidos y el coeficiente espectrofotométrico K_{270} , fue menor (bajo las mismas condiciones) cuando el aceite se almacenó en contenedores de acero al carbono, que para el aceite almacenado en contenedores no metálicos. También se realizaron experiencias en contenedores de cobre llegando a la misma conclusión. Esto demuestra la elevada capacidad de las trazas de estos metales para promover reacciones de auto-oxidación en el aceite de oliva.

En la **Tabla 1.9**, se muestra de forma esquemática y resumida algunos de los aspectos más relevantes relacionados con los principales factores externos e internos del aceite de oliva que pueden influir de forma significativa en la oxidación de los lípidos.

Tabla 1.9. Efectos relevantes de los principales factores que influyen en la oxidación lípida del aceite de oliva.

Factores	Aspectos relevantes	Referencias bibliográficas
Disponibilidad de oxígeno	<ul style="list-style-type: none"> - Presión parcial y difusión. - Permeabilidad de los materiales del envase. - Uso de gases inertes dentro del envase. 	Gutiérrez-Rosales <i>et al.</i> , 1988 Yanishlieva, 2001 Di Giovacchino <i>et al.</i> , 2002 Sacchi <i>et al.</i> , 2008 Stefanoudaki <i>et al.</i> , 2010 Masella <i>et al.</i> , 2012 Piras <i>et al.</i> , 2013
Temperatura de almacenamiento	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento de la constante de reacción. - Aumento de la velocidad de formación y descomposición de los hidroperóxidos. - Disminución de la solubilidad del oxígeno. 	Ragnarsson and Labuza, 1977 Frankel, 1998 Velasco <i>et al.</i> , 2002 Gómez-Alonso <i>et al.</i> , 2004 Samaniego-Sánchez <i>et al.</i> , 2012 Mancebo-Campos <i>et al.</i> , 2014
Exposición a la Luz	<ul style="list-style-type: none"> - Iniciación auto-oxidación. - Foto-oxidación. - Envase opaco a la luz. 	Gutiérrez-Rosales <i>et al.</i> , 1988 Caponio <i>et al.</i> , 2005 Méndez y Flaqui, 2007 Masella <i>et al.</i> , 2012 Rizzo <i>et al.</i> , 2013
Trazas de metales	<ul style="list-style-type: none"> - Catalizadores de la descomposición de hidroperóxidos. 	Benjelloun <i>et al.</i> , 1991
Triglicéridos	<ul style="list-style-type: none"> - Grado de insaturación de los ácidos grasos 	Holman y Elmer, 1947
Ácidos grasos libres	<ul style="list-style-type: none"> - Efecto pro-oxidante ejercido por los grupos carboxílicos. 	Miyashita y Takagi, 1986 Kiritsakis <i>et al.</i> , 1992 Frega <i>et al.</i> , 1999
Fenoles	<ul style="list-style-type: none"> - Relación directa entre el contenido y la estabilidad oxidativa. - Hidroxitirosol y sus derivados secoirioides son los antioxidantes más activos. - El tirosol y sus derivados presentan una baja o nula actividad antioxidante. 	Vázquez-Romero <i>et al.</i> , 1973 Gutiérrez <i>et al.</i> , 1977 Montedoro <i>et al.</i> , 1992 Baldioli <i>et al.</i> , 1996 Salvador <i>et al.</i> , 1999 Carrasco-Pancorbo <i>et al.</i> , 2005 De Leonardis <i>et al.</i> , 2013 Mancebo-Campos <i>et al.</i> , 2014
Pigmentos	<ul style="list-style-type: none"> - Carotenos: Protectores eficaces contra la foto-oxidación. - Clorofilas: Pro-oxidantes en presencia de luz y antioxidantes en ausencia de luz 	Endo <i>et al.</i> , 1984 Gutiérrez <i>et al.</i> , 1992 Rahmani <i>et al.</i> , 1998 Psomiadou Tsimidou <i>et al.</i> , 2002 Samaniego-Sánchez <i>et al.</i> , 2012 Rizzo <i>et al.</i> , 2013

1.6. Subproductos de la industria agroalimentaria

Los subproductos de la industria agroalimentaria son restos de naturaleza orgánica formados por aquellas partes de la materia prima que no son útiles en el proceso de fabricación de los productos principales. Estos subproductos pueden llegar a representar en algunos casos hasta el 75-80% del peso de la materia prima, como es el caso de la industria del aceite de oliva. En general los subproductos de la industria agroalimentaria apenas generan residuos tóxicos o peligrosos y, en cambio, se caracterizan por un alto contenido en materia orgánica y elevados valores de demanda biológica de oxígeno. Además, la generación de estos subproductos suele ir ligada a una cierta estacionalidad, de manera que se produce mucha cantidad de un determinado subproducto en un espacio muy corto de tiempo. Todo ello hace que sean muy difíciles de eliminar y que las industrias estén buscando diferentes alternativas para dar valor a estos subproductos y poder reducir el impacto ambiental que generan, además de obtener un cierto beneficio económico a partir de los mismos. Entre los principales usos propuestos destacan, entre otros, la obtención de energía, la obtención de otros productos mediante diversos procedimientos bioquímicos, la aplicación en suelos agrarios y la utilización tanto en la industria ganadera como en la industria de la alimentación humana. No obstante, en muchos casos los altos costes hacen que sea necesario una elevada inversión económica para el desarrollo y puesta a punto de estas nuevas técnicas haciendo que su expansión esté aún bastante limitada.

1.6.1. Los subproductos de almazara

España es el primer productor y exportador mundial de aceite de oliva (616,3 Mt/año), contando con la mayor superficie de olivar (2.584.564 has) y con el mayor número de olivos (282.696.000). A nivel nacional, el olivar es el segundo cultivo en extensión, después de los cereales. Andalucía es la comunidad con mayor superficie de olivar, con alrededor del 60% de la superficie nacional seguido de Extremadura, según datos de la Agencia para el Aceite de Oliva (AAO, 2013).

Es evidente que la industria oleícola produce importantes beneficios socioeconómicos en las zonas productoras, pero al mismo tiempo genera grandes cantidades de subproductos y residuos potencialmente contaminantes, cuyos volúmenes y características dependen del método utilizado para la extracción de aceite (**Tabla 1.10**).

Tabla 1.10. Composición de los subproductos mayoritarios de la industria oleícola

Subproducto	Características
Alpechín	Residuo líquido constituido por pulpa de oliva, mucílago, pectinas y aceite en emulsión, tiene un pH ácido, una conductividad eléctrica elevada y un contenido importante en potasio, nitrógeno, fósforo, calcio, magnesio y hierro, así como sustancias orgánicas tales como grasas, proteínas, azúcares, ácidos orgánicos, polialcoholes, y un elevado contenido en polifenoles (de 0.9 a 24 g/L), los cuales son potencialmente fitotóxicos (Jung <i>et al.</i> , 2003). Asimismo, los alpechines disminuyen la actividad biológica, debido a su actividad antimicrobiana y son resistentes a la degradación biológica (Cabrera <i>et al.</i> , 1996; Hafidi <i>et al.</i> , 2005).
Orujo	Residuo sólido con un contenido en agua relativamente bajo, constituido mayoritariamente por restos de pulpa y hueso triturado de aceituna. Sus características dependen del método utilizado para la extracción. Los orujos del sistema de tres fases presentan una humedad aproximada del 49% y un contenido graso del 5 al 7%. Los orujos obtenidos por el sistema clásico presentan un contenido graso del 9% y una humedad entre el 25 y 28%, aunque en la actualidad se generan en pequeñas cantidades (Lafka <i>et al.</i> , 2011).
Alperujo	Residuo semisólido formado por los restos de pulpa y hueso triturado de aceituna, junto con el agua de vegetación. Se caracteriza por tener un contenido graso del 3 al 9% y más del 60% de humedad (Molina <i>et al.</i> , 2003; Rodríguez <i>et al.</i> , 2007). Su pH es ligeramente ácido (5,5) y en su composición se incluyen grandes cantidades de materia orgánica (aprox. 909,6 g/kg de alperujo seco). Esta materia orgánica está constituida, mayoritariamente (< 70%), por compuestos relacionados con la fibra alimentaria como hemicelulosas, celulosa y lignina. Otros componentes de la materia orgánica son grasas (10%), proteínas (7%), carbohidratos solubles (12%) y compuestos fenólicos (1,4%). En cuanto a los minerales, el principal es el potasio (18,7 g/kg de alperujo en base seca), presentando también otros minerales como el nitrógeno, carbono, fósforo, hierro, calcio, magnesio, sodio, zinc y manganeso, pero en niveles más bajos (Albuquerque <i>et al.</i> , 2004; 2006a; 2006b). La presencia de metales pesados como el plomo, cadmio, cromo y mercurio es prácticamente nula, con concentraciones inferiores al 1 ppm (Madejón <i>et al.</i> , 1998).

En la actualidad, el alperujo es el principal subproducto que se genera en la extracción de aceite de oliva por el sistema de centrifugación de dos fases. Este sistema, surgió como solución al gran impacto ambiental provocado por el vertido de alpechines en las instalaciones de tres fases. En el sistema de centrifugación de tres fases se obtenían tres salidas a la salida del decanter: el alpechín, el orujo y el mosto oleoso. De manera aproximada, los volúmenes obtenidos de alpechín son en proporción de 1 a 1,2

t/t de aceituna transformada (Casa *et al.*, 2003). Esto estaba ocasionando un gran problema medioambiental debido a la elevada cantidad de residuos que se generaba y a la estacionalidad de este tipo de residuo. El uso de la centrifugación en dos fases permitió obtener rendimientos de extracciones de aceite de oliva similares al de los obtenidos en tres fases, con la ventaja de una menor incorporación de agua. Este sistema conllevó una reducción en la generación de residuos de alrededor del 75%. Además, al haber una menor incorporación de agua se origina una menor pérdida de compuestos fenólicos ya que éstos son muy hidrosolubles, obteniéndose aceites más ricos en este tipo de compuestos. El desarrollo del sistema de dos fases se efectuó durante la campaña oleícola 1991-1992, y rápidamente, fue adaptado por la mayoría de las almazaras españolas desplazando el método de tres fases (Roig *et al.*, 2006).

Independientemente del sistema de extracción, en todas las almazaras, aparecen otros residuos, tales como las hojas de los olivos y los lodos de decantación, de menos importancia en cuanto a volumen, pero que en los últimos años han atraído también el interés de los investigadores, debido a su potencial como fuente de compuestos fenólicos (Şahin y Samli 2013).

1.6.2. Alternativas para la gestión de los residuos

Entre las principales alternativas para el aprovechamiento de los residuos de almazara a nivel industrial se han desarrollado tecnologías para generar biocombustibles y energía eléctrica. También sirven como subproductos para obtener carbón activado, enzimas, aceite, o proteínas para alimentación animal (Azbar *et al.*, 2004) y, pueden asimismo, ser usados como fuente de compuestos bioactivos, como son los polifenoles naturales. Para este tipo de aprovechamientos, se requiere contar e invertir en infraestructuras a nivel industrial y acondicionar los subproductos para su correcto procesamiento.

En el sector agrícola y en zonas con bajo potencial de industrialización, una de las aplicaciones más comunes de los residuos de almazara obtenidos con los sistemas tanto de tres como de dos fases, es su utilización como materia orgánica para la fertilización de cultivos y fuente de nutrientes (Azbar *et al.*, 2004; Pérez *et al.*, 2005). No obstante, en el caso de los alpechines, la aplicación directa al suelo puede originar efectos negativos en algunos cultivos (Hadrami *et al.*, 2004; Mantzavinos y Kakigerakis, 2005), por lo que algunos autores han explicado diferentes técnicas como el tratamiento con

cal, H₂O₂, el compostaje, etc., todas ellas encaminadas a disminuir este efecto negativo (Aktlas *et al.*, 2001; Komilis *et al.*, 2005).

Otra alternativa es la fermentación del alperujo en bio-reactores. Los productos resultantes de la acción microbiana sobre la materia orgánica permiten incrementar sus propiedades nutricionales y obtener un producto que pueda ser usado como alimentación animal y con fines agrícolas (Morillo *et al.*, 2009).

Otra de las aplicaciones para este tipo residuos o subproductos se basa en la obtención del aceite de orujo. Tradicionalmente, el orujo obtenido como subproducto de la extracción de aceite por el sistema de tres fases era secado y utilizado como base para una segunda extracción del aceite residual, el aceite de orujo, usando para ello disolventes orgánicos como el hexano. Posteriormente, se sometía a un proceso de refinación con la finalidad hacerlo apto para el consumo humano. Sin embargo, a consecuencia del elevado porcentaje de agua y de carbohidratos en el alperujo, esta segunda extracción del aceite presenta muchas dificultades. Por un lado, la pasta de alperujo tiende a quedar retenida en las paredes de los hornos, bloqueando la salida de los gases durante la evaporación de los disolventes e incrementando el riesgo de explosión (Arjona *et al.*, 1999). Por otro lado, el elevado porcentaje de humedad de la pasta hace que se tenga que aportar mucha energía para secarla, incrementando de forma considerable los gastos derivados de esta acción. A pesar de estas dificultades, se han desarrollado diferentes instalaciones adaptadas para el trabajo con alperujo y mejorar el grado de extracción del aceite de orujo mediante un mayor grado de automatización del proceso (Krokida *et al.*, 2002; Arjona *et al.*, 2005).

El orujo procedente de la extracción en tres fases y el residuo seco resultante de la extracción del aceite de orujo tiene un alto poder calorífico (400 kcal/kg), por lo que puede ser utilizado como combustible para la cogeneración de energía eléctrica en las orujeras o en las propias almazaras (Caputo *et al.*, 2000). Por otra parte, recientes estudios han demostrado que la digestión anaeróbica del orujo y del alperujo permiten la obtención de biogás (una mezcla de metano, monóxido de carbono, dióxido de carbono y otros gases en menor proporción) debido a su alto contenido en materia orgánica. Esta digestión tiene como ventaja que, por un lado, se produce un combustible, el biogás, que puede ser usado para la generación de energía eléctrica y a la vez se obtiene un residuo sólido estable que tiene aplicaciones agrícolas (Borja *et al.*, 2002; Rincón *et al.*, 2008). Finalmente, la obtención de bioetanol a partir de este tipo de residuos también ha

sido evaluada, en parte, gracias al elevado porcentaje de compuestos ricos en azúcares, como la celulosa y las hemicelulosas (Georgieva y Ahring, 2007)

Por otra parte, también se pueden aprovechar estos subproductos como fuente de compuestos de alto valor añadido. Los residuos de almazara son muy ricos en compuestos fenólicos. De hecho, durante el proceso de extracción del aceite de oliva, la mayor parte de los compuestos fenólicos presentes en las aceitunas (> 97%) quedan retenidos en estos subproductos debido a su alta solubilidad en medio acuoso (Rodis *et al.*, 2002). Esta circunstancia, ha provocado que estos subproductos, en los últimos años, hayan recibido una especial atención, convirtiéndose en productos muy atractivos como fuente natural de compuestos antioxidantes (Visioli *et al.*, 1999; Schierber *et al.*, 2001; Suárez *et al.*, 2009; Şahim *et al.*, 2013). En este sentido, numerosos estudios se han llevado a cabo con el fin de establecer diferentes estrategias para su extracción y aislamiento. Obied *et al.*, (2005) estudiaron la extracción de los compuestos del alperujo usando diferentes tipos de disolventes orgánicos, observando que la mezcla metanol-agua era la que permitía una mayor recuperación de este tipo de compuestos. Siguiendo la misma metodología, Lafka *et al.* (2011) estudiaron el efecto del disolvente (metanol, etanol, propanol, isopropanol y etil acetato), la relación entre disolvente/soluto y el pH sobre la extracción de compuestos fenólicos del orujo obtenido a partir de la extracción de aceite de oliva en tres fases.

Otros autores, en cambio, se han centrado en la obtención de compuestos puros a partir del alperujo para poder comercializarlos como estándares. Así, Balaños *et al.*, (2002) desarrollaron un sistema para purificar el hidroxitirosol, uno de los compuestos fenólicos más característicos del aceite de oliva debido a su poder antioxidante.

No obstante, para la utilización de estos compuestos como aditivos en la industria alimentaria, se debe seguir la normativa existente, evitando el uso de todos aquellos disolventes que no garanticen la protección de la salud y que, por tanto, no están autorizados. Inicialmente, la única Reglamentación existente al respecto, era la Directiva (CEE) 344/88 del Consejo, de 13 de junio de 1988, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimentarios y de sus ingredientes. Esta directiva se modificó en los años posteriores varias veces hasta que finalmente, en 2009, se publicó la versión refundida como Directiva (CE) 32/2009, del Consejo, de 23 de abril de 2009.

Uno de los aspectos más importantes de esta Directiva es la inclusión a la lista de disolventes que pueden ser utilizados respetando las buenas prácticas de fabricación para el tratamiento de materias primas, de productos alimentarios o de componentes de productos alimentarios o de sus ingredientes. Se considera que se respetan las buenas prácticas de fabricación si su empleo sólo produce la aparición de residuos o de derivados y en cantidades técnicamente inevitables y que no suponen riesgos para la salud humana. Estos disolventes son:

- Propano
- Butano
- Acetato de etilo
- Etanol
- Anhídrido carbónico
- Acetona (excepto para el refinado de aceite de orujo de oliva)
- Protóxido de nitrógeno

A su vez, se especifican una serie de disolventes que pueden ser utilizados siempre y cuando los residuos que aparezcan en los productos no superen unos límites establecidos. Entre estos disolventes se encuentran el hexano, acetato de metilo, metiletilacetona, diclorometano, metanol y 2-propanol.

1.6.3. Técnicas de obtención de extractos fenólicos

1.6.3.1. Técnicas tradicionales de extracción y análisis

La extracción de compuestos fenólicos es muy compleja y depende de múltiples factores tales como la naturaleza de la matriz que los contiene, o de la estructura química de los compuestos a separar. Por lo tanto, no existe una estrategia concreta a seguir que sea común para todo tipo de muestras, sino que debe optimizarse para cada caso concreto.

En general las técnicas de extracción de compuestos fenólicos pueden agruparse en dos grandes grupos: extracción líquido-líquido, usando disolventes orgánicos y extracción en fase sólida (SPE). En la extracción líquido-líquido, los compuestos fenólicos se extraen por difusión desde la matriz sólida a la fase líquida. En un primer momento, las partículas de los fragmentos sólidos absorben solvente debido a las fuerzas osmóticas, por capilaridad y por solvatación de los iones de las células. Seguidamente, tiene lugar la difusión de los fenoles desde el interior de las partículas

hacia el exterior (Escribano-Bailón *et al.*, 2003). Por otro lado, la extracción SPE se basa en el uso de cartuchos con un relleno específico que tienen afinidad por los compuestos fenólicos de interés. En este caso, en primer lugar se tienen que activar los cartuchos con tal de potenciar la absorción de los fenoles. Una vez cargada la muestra, se procede a eliminar las impurezas que pudiera contener y, finalmente, se eluyen los compuestos fenólicos usando un solvente que tenga una buena afinidad por ellos y los pueda liberar.

La extracción de los compuestos fenólicos se ve afectada por múltiples factores como:

- Tipo de disolvente: tradicionalmente, el disolvente más usado ha sido el metanol (Obied *et al.*, 2005b). Sin embargo también se han utilizado otros como el etanol, la acetona, el acetato de etilo, el n-butanol, el n-propanol y el isopropanol (Lafka *et al.*, 2011). Hay que tener en cuenta que, en la naturaleza, los compuestos fenólicos, al igual que en el aceite, suelen estar en forma glicosilada. Esto influye en su extracción haciendo que tengan una mayor afinidad por el agua. De ahí que, en general, en los procedimientos de extracción los solventes orgánicos no se utilizan puros sino mezclados con agua. Sin embargo, para la extracción de formas agliconas de baja polaridad como las isoflavonas y las flavonas es necesario el uso de disolventes orgánicos puros (Bradshaw *et al.*, 2001). En general mezclas hidroalcohólicas del 60-80% permiten una buena extracción de los derivados hidrocínámicos, flavonas, flavonoles y catequinas a partir de muestras de frutas y legumbres (Escribano-Bailón *et al.*, 2003).
- pH del medio de extracción: el pH determina el grado de solubilidad de los fenoles en el solvente de extracción. También puede influir en la extracción de los compuestos que sean potencialmente hidrolizables. En general, la adición de ácido, hasta pH 2 o 3, se suele utilizar para la precipitación de proteínas (Coccon *et al.*, 2001).
- Temperatura de extracción: el uso de elevadas temperaturas mejora la eficiencia de extracción. Esto es debido a que las paredes celulares se vuelven más permeables debido a la degradación de los polisacáridos pécticos, incrementándose el coeficiente de difusión y la solubilidad de los compuestos. También disminuye la viscosidad de los solventes, facilitando el paso de los compuestos fenólicos a través del sustrato sólido. Sin embargo, temperaturas

excesivas puede provocar una importante degradación de los compuestos fenólicos. Por lo tanto, no es recomendable trabajar a temperaturas superiores a 25-30 °C (Robards, 2003).

- Número de pasos de extracción y volumen del solvente: la eficacia de la extracción se incrementa con el número de pasos en los que se divide el proceso de extracción. Como ejemplo, se obtuvo un mayor rendimiento cuando se realizaron cuatro extracciones usando 50 mL de solvente, que cuando se efectuó una única extracción con 200 mL (Naczki y Shahidi, 2004).
- Forma y el tamaño de partícula: el tamaño de partícula determina la superficie de contacto del soluto con el solvente de extracción. Esto tiene una influencia directa con el rendimiento de extracción, de modo que, al reducir el tamaño se incrementa de forma significativa la extracción de los compuestos fenólicos (Luthria, 2008).

Los métodos tradicionales para la determinación del contenido total de compuestos fenólicos de los extractos obtenidos se basan en técnicas espectrofotométricas, por medición directa de la absorbancia en el ultravioleta o usando métodos colorimétricos como el Folin-Ciocalteu. Sin embargo, la gran diversidad de compuestos fenólicos que existen hace que el grado de selectividad de estas técnicas no sea del todo adecuado, ya que es difícil trabajar a una longitud de onda óptima para todos los diferentes compuestos fenólicos. Además, estas técnicas son muy sensibles a interferencias, lo cual puede llevar a una sobreestimación de los resultados (Antolovich *et al.*, 2002). Es por ello que para la correcta identificación y cuantificación de estos compuestos bioactivos, las técnicas cromatográficas unidas a uno a más detectores son las más utilizadas en los laboratorios de análisis, siendo las más sensibles y permitiendo identificar cada uno de los fenoles de forma individual. Por un lado, está la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y por el otro, la cromatografía de gases (GC). Ambas técnicas ofrecen buenos resultados. Sin embargo, la necesidad de derivatizar en la GC hace que su uso se vea limitado a los analitos en los que esto es posible.

1.6.3.2. Nuevas tendencias en las técnicas de extracción

Los métodos tradicionales de obtención de extractos fenólicos usando disolventes orgánicos presentan numerosos inconvenientes. En general, se trata de métodos muy largos y laboriosos que consumen una gran cantidad de solvente y cuya selectividad

depende considerablemente de los compuestos fenólicos presentes en la materia prima. Además, se debe tomar en consideración que para la utilización de los extractos en la industria alimentaria es conveniente evitar en la medida de lo posible el uso de disolventes orgánicos, sobre todo de aquellos que puedan presentar algún tipo de toxicidad (King, 2000). Por todo ello, en la actualidad, se están desarrollando nuevos sistemas de extracción que pretenden solucionar estos problemas. Los más destacados son:

- Extracción supercrítica: la extracción supercrítica se basa en el uso de un fluido en condiciones de presión y temperatura por encima de su punto crítico. Bajo estas condiciones, las propiedades del fluido cambian y se sitúan entre las de un gas y un líquido. Así, mientras que su densidad es más parecida a la del líquido, la viscosidad se parece más a la del estado gas y la difusividad presenta valores intermedios entre los dos estados. En general, se considera que el estado supercrítico es aquel en el que el líquido es compresible (Herrero *et al.*, 2006). Debido a las particulares propiedades fisico-químicas de los fluidos supercríticos, su uso presenta ciertas ventajas respecto a los métodos tradicionales de extracción. De esta manera los rendimientos de extracción son mayores que si se usara en estado líquido, en parte, debido al alto valor del coeficiente de difusividad. Entre los solventes usados en forma supercrítica el más usado es el dióxido de carbono, debido a la mayor facilidad que hay para alcanzar su punto crítico (31,3 °C y 72,9 atm). Además, el hecho de que el dióxido de carbono sea gas a temperatura ambiente permite la obtención de extractos libres de residuos. Esta técnica es una de las que más auge ha tenido, usando para extraer compuestos fenólicos de diferentes fuentes como legumbres, especias, plantas aromáticas y frutas (Herrero *et al.*, 2010).
- Extracción con microondas: en la última década han aumentado considerablemente el número de estudios basados en la aplicación de microondas para acelerar la extracción de analitos de diferentes matrices. Las microondas son radiaciones no ionizantes que se caracterizan por producir cambios en la vibración de las moléculas por migración de los iones y rotación de los dipolos sin por ello cambiar su estructura molecular. Esta técnica es muy útil para la extracción de compuestos fenólicos que sean estables térmicamente a partir de muestras sólidas usando para ello mezclas de disolventes polares y no

polares (Mahugo *et al.*, 2009). Con el fin de optimizar el rendimiento de extracción usando esta tecnología se han estudiado diferentes parámetros del proceso como la temperatura, la potencia, el tiempo de extracción, el volumen de solventes y diferentes mezclas de disolventes como acetona-hexano y acetona-metanol. Entre estos parámetros los que han mostrado un mayor impacto son la temperatura y la potencia de trabajo.

- Extracción acelerada con disolventes: esta técnica de extracción consiste en el uso de una celda que contiene la muestra sólida y a la que se introduce el disolvente a elevada presión y temperatura con lo que se favorece la difusión de los compuestos fenólicos en un corto periodo de tiempo y con gran eficiencia. En este caso, a diferencia de la extracción con fluidos supercríticos, las condiciones son inferiores a las del punto crítico. Así, las presiones que se pueden llegar a alcanzar en el interior de las celdas son del orden de las 210 atm y 200 °C (Ramos *et al.*, 2002). La extracción se puede hacer de forma estática (dejando la muestra con el solvente dentro de la celda presurizada durante un periodo de tiempo), dinámica (haciendo pasar el fluido presurizado por la celda continuamente) o estático-dinámica (combinando ambas modalidades) (Japón-Lujan y Luque de Castro, 2007).
- Extracción con agua sub-crítica: las condiciones externas necesarias para alcanzar el punto crítico del agua (374 °C y 218 atm) hacen que no sea factible su uso en condiciones supercríticas con fines extractivos (Li *et al.*, 1993). En cambio, debido a las particulares propiedades de agua, es especialmente indicada para usar en condiciones sub-críticas (es decir, a elevada presión y temperatura pero situándose por debajo del punto crítico con lo que siempre se mantiene en su estado líquido). Así, debido a los cambios que sufre en los valores de la constante dieléctrica, la tensión superficial y la viscosidad hacen que aumente la difusión de los compuestos fenólicos en ella con el que se obtienen grandes rendimientos de extracción. Esta técnica ha sido usado para extraer compuestos fenólicos de plantas aromáticas como el romero y la menta y para la extracción de aceites esenciales (Ozel *et al.*, 2003).
- Extracción asistida acústicamente: Actualmente, los ultrasonidos de potencia se han afianzado como alternativa viable en el proceso de extracción de compuestos fenólicos a partir de una amplia variedad tanto de productos como

de subproductos agroalimentarios. Dado que esta fue la técnica elegida para la extracción de componentes bioactivos a partir de los subproductos generados durante el proceso de elaboración del aceite de oliva, a continuación se exponen los fundamentos y las principales aplicaciones de esta nueva tecnología en el ámbito agroalimentario.

1.7. Utilización de los ultrasonidos de potencia en la industria alimentaria.

La aplicación de los ultrasonidos (US) de potencia, está encontrando un uso creciente en la industria alimentaria, tanto para el análisis como para la modificación de los productos alimentarios. El uso de los US de potencia en el procesamiento, preservación y extracción de alimentos crea nuevas metodologías que a menudo complementan a las técnicas clásicas, y abre nuevas ventanas en la mejora de diferentes procesos como la cristalización, desgasificación, secado, extracción, filtración, congelación, homogeneización, etc. ampliamente utilizados en el campo alimentario.

1.7.1. Ultrasonidos de potencia

La energía acústica es uno de los tipos fundamentales de energía que pueden encontrarse en la naturaleza. Las ondas que la componen no son más que oscilaciones mecánicas en el tiempo y en el espacio que, a diferencia de las ondas electromagnéticas, necesitan de un medio material para su propagación (Cárcel, 2003).

Al igual que cualquier tipo de onda, los ultrasonidos se caracterizan por una serie de parámetros, entre los que principalmente destacan la frecuencia, la intensidad y potencia acústicas, y la atenuación (García Pérez, 2007). La frecuencia (f , Hz) se define como el número de vibraciones o ciclos completados por la onda por unidad de tiempo. Se entiende por la intensidad de una onda acústica (I , W/m^2), la energía media transmitida por unidad de tiempo a través de la unidad de área perpendicular a la dirección de propagación de la onda. La potencia acústica (P , W) es la energía total irradiada por la fuente ultrasónica por unidad de tiempo, y puede calcularse a partir de la intensidad acústica y del área de la superficie radiante. Por su parte, la atenuación se define como la disminución de la intensidad de la onda durante su propagación a través de un determinado medio, al aumentar la distancia a la fuente que la produce. Este fenómeno puede ser consecuencia de la reflexión, dispersión y/o difracción de la onda, así como de la conversión de parte de la energía cinética en calor.

Las ondas acústicas pueden clasificarse en función de su frecuencia (**Figura 1.12**), denominándose ondas subsónicas aquéllas que se encuentran por debajo de los 20 Hz; ondas sónicas, las que presentan frecuencias comprendidas entre 20 Hz y 20 kHz, rango que aproximadamente delimita el campo de audición humano; y ondas ultrasónicas o ultrasonidos, que son aquéllas que superan los 20 kHz de frecuencia (Mason, 1998).

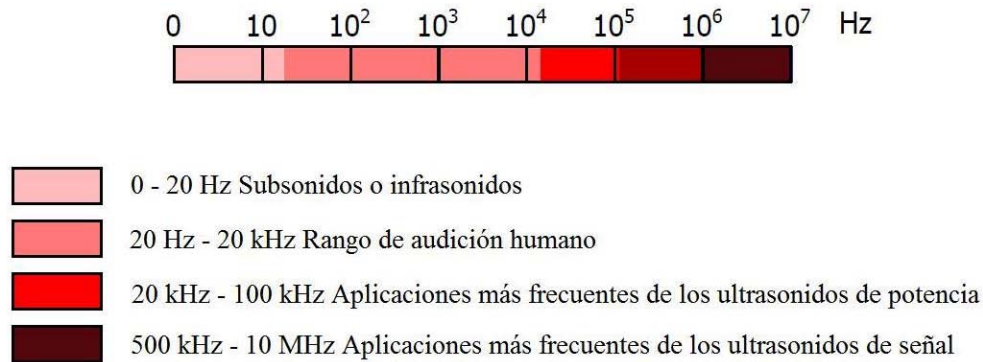


Figura 1.12. Clasificación de las ondas acústicas en función de la frecuencia.

A su vez, los ultrasonidos pueden clasificarse en función de la frecuencia de propagación que a su vez condicionará aplicaciones industriales. A partir de su frecuencia e intensidad se pueden distinguir:

- Ultrasonidos de baja intensidad o señal. Éstos se caracterizan por presentar frecuencias comprendidas entre 500 kHz y 10 MHz, e intensidades inferiores a 1 W/cm². Dado que la energía transmitida al medio por este tipo de ultrasonidos es débil, su aplicación no induce cambios en el sistema. De ahí, su uso en el control de procesos y en el análisis no invasivo de materiales. Ejemplos de ello serían la imagen médica, los sondeos submarinos o la monitorización de la composición y/o propiedades de los alimentos durante su procesado y/o almacenamiento (Cárcel, 2003). Estas aplicaciones diagnósticas se basan en el estudio de la variación de las propiedades de las ondas acústicas (velocidad, atenuación) a su paso por un medio físico concreto (Cárcel *et al.*, 2012).
- Ultrasonidos de alta intensidad o potencia. A diferencia de los de señal, éstos presentan frecuencias que oscilan entre 20 y 500kHz y su intensidad es superior a 1 W/cm². Este tipo de ultrasonidos tiene la capacidad de producir cambios en las propiedades físicas, mecánicas, químicas y/o bioquímicas del material o proceso en el que se aplican, derivando de ello una amplia gama de aplicaciones industriales (Awad *et al.*, 2012).

Los efectos atribuidos a los US pueden ser muy diferentes en función del medio físico sobre el que se apliquen (Cárcel *et al.*, 2012). En el caso de medios líquidos, la mayoría de ellos están asociados al fenómeno de cavitación, que consiste en la formación, crecimiento e implosión de nano/microburbujas de gas en el seno del líquido como consecuencia de las fluctuaciones de presión generadas por el paso de las ondas ultrasónicas (Virot *et al.*, 2010; Shirsath *et al.*, 2012). Cuando los US se propagan a través de un fluido, las moléculas oscilan alrededor de su posición de equilibrio, haciendo que las distancias intermoleculares se modifiquen continuamente siguiendo ciclos alternos de compresión y descompresión. Durante los ciclos de compresión, los ultrasonidos ejercen una presión positiva sobre el líquido y las moléculas tienden a aproximarse. Mientras que durante los ciclos de descompresión, se produce el efecto contrario, generándose una presión negativa que tiende a separarlas. Alcanzado un cierto umbral de intensidad ultrasónica, la disminución de presión durante el ciclo de descompresión puede vencer las fuerzas de atracción entre moléculas colindantes, pudiendo aparecer cavidades en el seno del líquido a partir de núcleos de gas pre-existentes (Esclapez *et al.*, 2011).

El intercambio de gas entre el líquido y las burbujas de cavitación es proporcional al área de transferencia. Durante los ciclos de descompresión o presión negativa, el flujo de gas se produce desde el líquido hacia la burbuja, haciendo que ésta se expanda. No obstante, durante el ciclo de compresión o presión positiva, el flujo de gas tiene lugar en dirección opuesta y la burbuja se contrae. Si el flujo de gas del sistema burbuja-líquido es similar en ambas direcciones, las oscilaciones de tamaño son regulares, apareciendo la denominada cavitación estable. Ésta suele darse cuando la intensidad ultrasónica no es muy elevada y/o cuando las ondas acústicas son de frecuencia alta. No obstante, bajo condiciones de elevada intensidad y baja frecuencia ultrasónicas, la cantidad de gas que gana la burbuja en el ciclo de expansión es mayor que la pérdida durante el ciclo de compresión, apareciendo la conocida como cavitación transitoria. En ella, la burbuja crece progresivamente en cada ciclo hasta que alcanzado el tamaño crítico en resonancia con la frecuencia ultrasónica aplicada, la burbuja implosiona (**Figura 1.13**) (Cárcel, 2003; Patist y Bates, 2008). Ello genera un punto localizado de elevada energía, donde se estima que las condiciones de presión y temperatura alcanzan valores de 1000 atm y 5000 K, respectivamente (Bhaskaracharya *et al.*, 2009).

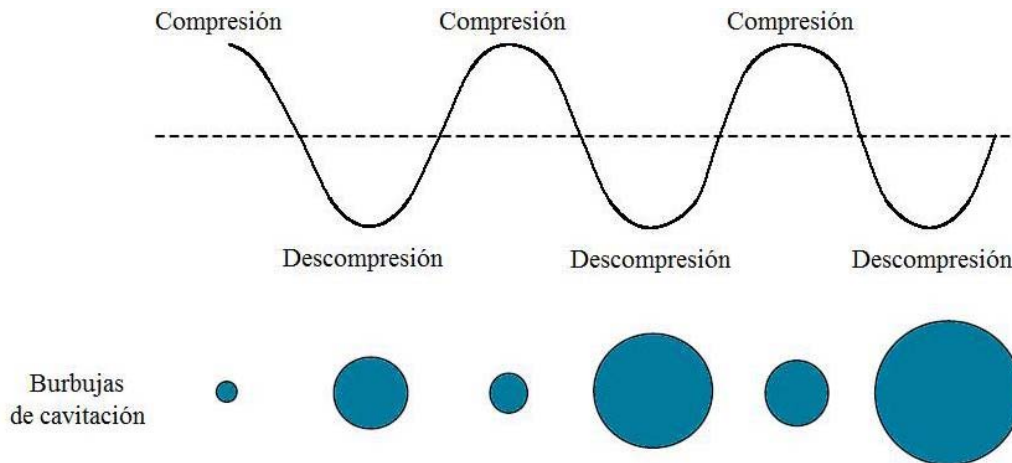


Figura 1.13. Crecimiento de las burbujas de cavitación en el seno de un líquido sobre el que se aplican ultrasonidos de potencia (García-Pérez, 2007).

Además de dichas condiciones extremas, la implosión de las burbujas de cavitación provoca un gran número de efectos mecánicos en el sistema, tales como microcorrientes, turbulencia y colisiones intermoleculares a alta velocidad (Shirsath *et al.*, 2012). En el caso de sistemas sólido-líquido, tiene lugar la formación de microjets (Figura 1.14) como consecuencia de la implosión asimétrica de las burbujas de cavitación en posiciones cercanas a la interfase sólido-líquido. Los microjets pueden alterar de forma significativa las características y estructura del sólido, pues provocan el descamado y erosión de su superficie, así como la formación de microfracturas, con la consecuente dispersión de partículas, el descubierta de nuevas superficies activas y el incremento de transferencia de materia entre las dos fases (Vilkhu *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2011).

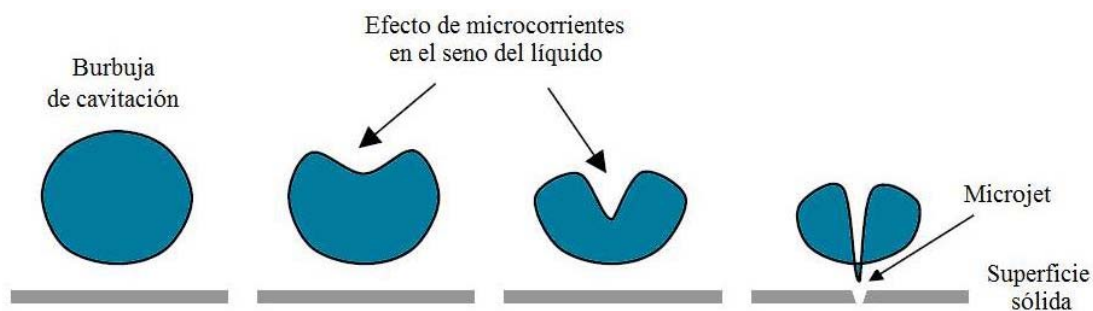


Figura 1.14. Formación de microjets en una interfase sólido-líquido como consecuencia del fenómeno de cavitación producido por la aplicación de ultrasonidos de potencia (González-Centeno, 2013).

La intensidad del fenómeno de cavitación, así como sus efectos, depende de las características del medio y de las variables del proceso (frecuencia e intensidad ultrasónicas y temperatura) (Cárcel *et al.*, 2012).

1.7.1.1. Equipos

El equipo necesario para la aplicación de los US está constituido por tres elementos fundamentales: un generador, un transductor y un emisor (García Pérez, 2007). El generador transforma la señal eléctrica de la red a la frecuencia deseada. El transductor, que suele ser un cuerpo vibrante, es la fuente que genera los ultrasonidos a partir de la señal eléctrica de alta frecuencia que recibe del generador. El emisor, por su parte, es el elemento que transmite la energía acústica generada por el transductor al medio que se desea tratar (Patist y Bates, 2008).

De entre los equipos de aplicación de US en medios acuosos destacan principalmente los baños de ultrasonidos (**Figura 1.15**) y los sistemas tipo sonda (**Figura 1.16**). Los baños de US son posiblemente los sistemas de aplicación de US más utilizados, debido a que se trata de equipos simples, compactos y económicos, con los transductores colocados en la base del recipiente y con el sistema de generación-emisión incluidos en el mismo. Sus principales limitaciones son la poca potencia que, comparados con otros sistemas, suministran al medio; la dificultad en el control de temperatura; y la variación de la intensidad ultrasónica en función de la posición dentro del baño, con lo que resulta de gran importancia controlar este parámetro.

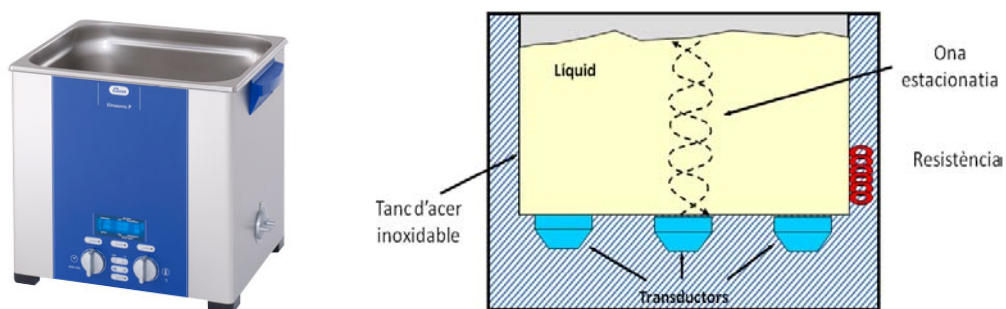


Figura 1.15. Figura y esquema de un tanque de US

En los equipos tipo sonda, se utiliza una sonda metálica como emisor del sistema para aplicar al medio líquido la vibración generada por el transductor. El material utilizado para su fabricación debe tener una alta resistencia a la fatiga y erosión que provoca el fenómeno de cavitación. No obstante, el desgaste y formación de

irregularidades en su superficie es inevitable, siendo necesario el control periódico de la sonda para evitar pérdida de eficacia en la emisión de ultrasonidos.

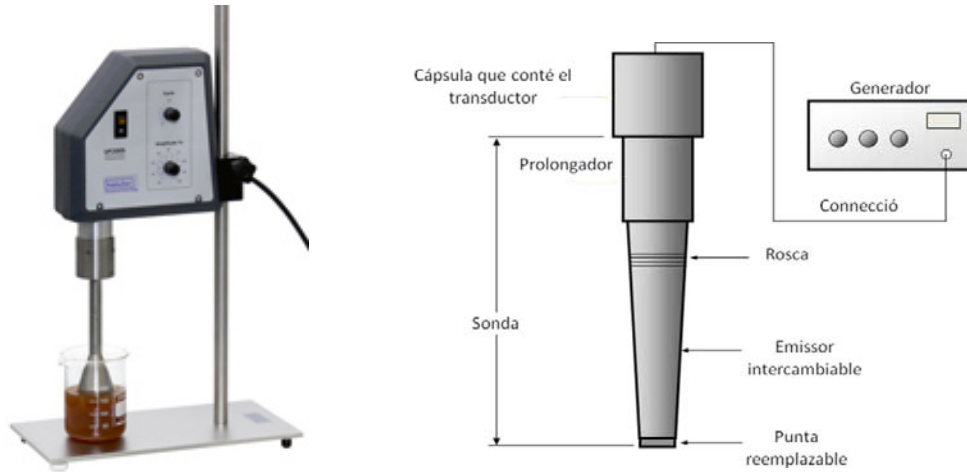


Figura 1.16. Figura y esquema de una sonda de US

Al propagarse los US por un medio, se transmite energía acústica que puede ser disipada en forma de calor debido a los rozamientos producidos entre moléculas y al trabajo realizado al desplazarlas en un medio sujeto a fuerzas de cohesión contrarias al desplazamiento de las mismas (García Pérez, 2007). La absorción de los ultrasonidos y, consecuentemente, el calentamiento del medio, depende de las características viscosas del mismo, así como de la frecuencia y potencia ultrasónicas aplicadas (Cárcel, 2003). Así pues, para evaluar los efectos producidos por la aplicación de US, resulta necesario trabajar bajo condiciones de temperatura controlada, siendo un factor a tener en cuenta en el diseño del sistema y tratamiento experimentales.

Otro aspecto importante, tanto en el uso de baños de US como de equipos tipo sonda, es la caracterización de la intensidad del campo acústico que realmente actúa sobre el sistema, dado que la potencia nominal del equipo no se corresponde con su potencia real de trabajo. Los métodos calorimétricos, basados en la medida de la generación de calor que se produce en un medio al aplicar US, son los más utilizados.

1.7.2. Aplicaciones de los US de potencia en la industria alimentaria

Como consecuencia de los efectos mecánicos derivados del fenómeno de cavitación, los US de potencia se caracterizan por una amplia y potencial aplicabilidad en el campo de la tecnología de alimentos. De entre sus principales aplicaciones destaca su uso en procesos de emulsión, cristalización, congelación, descongelación, secado y/o

filtración. En los trabajos de revisión recientemente publicados por Patist y bates, (2008), Bhaskaracharya *et al.* (2009), Soria *et al.* (2010), Chemat *et al.* (2011), Awad *et al.* (2012) y Chandrapala *et al.* (2012), se incluyen ejemplos de diferentes estudios basados en la aplicación de los US de potencia en operaciones de la industria alimentaria ya mencionadas, así como en procesos de ablandamiento, corte, fermentación, desgasificación, despolimerización, limpieza, pasteurización y esterilización, entre otros.

Otro de los campos en el cual los US de potencia han tenido un papel importante es en los procesos de secado de alimentos (De la Fuente *et al.*, 2006). Los US producen una serie de cambios estructurales en los alimentos (micro-agitación, formación de micro-canales) que facilitan la eliminación del agua, produciendo el secado de los alimentos (Mulet *et al.*, 2003). Este fenómeno hace posible llevar a cabo procesos de secado en condiciones más suaves de temperatura (García-Pérez *et al.*, 2007), obteniéndose alimentos desecados de máxima calidad.

Además, los US de potencia pueden modificar los procesos de cristalización a partir del control de la nucleación y el crecimiento de los cristales en alimentos congelados (Luque de Castro *et al.*, 2007).

La aplicación de forma incontrolada o abusiva de los US de potencia puede provocar efectos perjudiciales o indeseados en la conservación o calidad de los alimentos debido a la formación de radicales libres, que pueden reaccionar y deteriorar los alimentos mediante reacciones de oxidación, provocando que este pierda, en gran medida, tanto sus atributos nutritivos como sensoriales.

Si esta tecnología se aplica de forma controlada, por ejemplo mediante pulsos ultrasónicos, es capaz de reducir la intensidad de las implosiones de las burbujas de aire, de esta manera pueden obtenerse resultados interesantes y aplicables para la desgasificación de diferentes líquidos (Carcel *et al.*, 2012).

No obstante, una de las mayores y más importantes aplicaciones de los US de potencia en la industria alimentaria es su utilización en procesos de extracción sólido-líquido para la obtención de componentes bioactivos de origen vegetal (Vilkhu *et al.*, 2008).

1.7.3. Extracción sólido-líquido de compuestos bioactivos: uso de US de potencia

La extracción sólido-líquido es una de las operaciones unitarias más ampliamente utilizadas en la industria alimentaria y, entre otros fines, se aplica para la recuperación de diferentes compuestos bioactivos retenidos en la matriz de productos naturales (Pinelo *et al.*, 2006b). En las últimas décadas, ha adquirido un papel determinante en el aislamiento de compuestos fenólicos de origen vegetal para su posterior utilización en la preparación de suplementos dietéticos, ingredientes funcionales y/o aditivos para productos alimentarios, farmacéuticos y cosméticos (Cacace y Mazza, 2003).

El proceso de extracción sólido-líquido es una operación heterogénea y multicomponente, para la que no existe una metodología universal capaz de recuperar todos los compuestos bioactivos de interés (Naczki y Shahidi, 2004) y cuyo rendimiento se basa en las condiciones experimentales utilizadas y en las características del material de partida (Pinelo *et al.*, 2005).

La extracción sólido-líquido es un proceso de transferencia de materia mediante el cual el compuesto de interés pasa desde la matriz del sólido hasta el seno de la fase líquida. Dicho mecanismo está subdividido en dos etapas: una primera de lavado, en la que tiene lugar una rápida transferencia de los compuestos desde la superficie del sólido al disolvente; y una segunda etapa de transferencia desde el interior del sólido mediante difusión, que resulta ser más lenta como consecuencia de la resistencia natural que ofrece la estructura de los tejidos de origen vegetal a la penetración de líquidos (Sturzoiu *et al.*, 2011; Cissé *et al.*, 2012). Así pues, en la mayoría de sistemas de extracción de la industria agroalimentaria, se asume que la segunda etapa del mecanismo de transferencia de materia es el paso limitante del proceso (Cacace y Mazza, 2003; Hojnik *et al.*, 2008; Virost *et al.*, 2010; Shirsath *et al.*, 2012).

En las últimas décadas, la investigación e innovación tecnológica en este campo ha desarrollado toda una serie de técnicas, de carácter más ecológico y sostenible que la extracción convencional, que permiten mejorar la recuperación de los compuestos bioactivos presentes en los tejidos de origen vegetal (Ghafoor *et al.*, 2009b). Entre estas metodologías destacan la extracción asistida por US de potencia, la extracción con fluidos supercríticos, la extracción asistida por microondas o la extracción acelerada con disolventes presurizados, entre otras. Todas estas metodologías se caracterizan por la reducción del tiempo de extracción, del consumo de disolvente y de la energía, así como

por el incremento del rendimiento del proceso y la mejora de la calidad de los extractos (Wang y Weller, 2006).

De entre ellas, la extracción asistida por ultrasonidos (EAU) ha sido la técnica más ampliamente estudiada tanto a nivel de laboratorio como a escala industrial, debido probablemente a que su equipo instrumental es relativamente barato y de fácil manejo (Cheung *et al.*, 2013). Además, los US pueden ser utilizados con prácticamente cualquier disolvente y permiten la extracción de compuestos termolábiles a bajas temperaturas (Wang y Weller, 2006).

1.7.3.1. Proceso de extracción sólido-líquido asistido acústicamente

Tal y como se ha indicado anteriormente, la extracción convencional presenta ciertas limitaciones en cuanto al tiempo y a la temperatura de trabajo, al consumo de energía y al volumen de disolvente utilizado. Sin embargo, la asistencia mediante US permite mejorar el proceso, así como acelerarlo, gracias a los efectos derivados del fenómeno de cavitación (Esclapez *et al.*, 2011).

Según Mason *et al.* (2011), son cuatro los mecanismos interconectados a través de los cuales los ultrasonidos de potencia incrementan la eficacia del proceso de extracción:

- rotura de las paredes celulares: como consecuencia de la formación de microjets a raíz de la implosión asimétrica de las burbujas de cavitación en la zona próxima a la interfase sólido-líquido. Ello aumenta la permeabilidad del tejido vegetal, libera el material intracelular y reduce el tamaño de partícula, incrementando progresivamente la superficie sólida en contacto con el disolvente de extracción;
- incremento de la solubilidad de los analitos: provocada por el incremento localizado de la temperatura en la zona de implosión de las burbujas de cavitación;
- mejora de la penetración del disolvente en la matriz del soluto: como consecuencia del aumento de presión localizado, así como de la rotura y erosión de la superficie celular originadas por los microjets;
- mejora de la difusión: debido a la continua renovación de la capa de disolvente en contacto con la superficie del sólido provocada por los US de potencia.

La conjunción de todos estos mecanismos resulta en un aumento considerable de la transferencia de materia desde la matriz del sólido vegetal hasta el seno del disolvente, reduciendo el tiempo necesario con respecto a la extracción convencional.

La influencia de variables tales como el tipo de disolvente, la temperatura de trabajo, el tiempo de extracción, el tamaño de partícula o el ratio sólido-líquido, han sido las variables más estudiadas en procesos de extracción asistidos por US de potencia. En este sentido y a modo de ejemplo, cabe destacar el trabajo de Ahmad-Qasem *et al.* (2013), en el cual se evaluó el efecto de la superficie de la sonda de US de potencia, la temperatura y la potencia ultrasónica aplicada, en la extracción de compuestos fenólicos a partir de hojas de olivo, llegando a la conclusión que la EAU fue más eficiente en comparación con la extracción convencional.

1.8. Optimización de procesos: metodología de superficie de respuesta

En los últimos años, la metodología de superficies de respuesta (RSM) ha sido amplia y satisfactoriamente aplicada para el desarrollo y optimización de un gran número de procesos relacionados con la industria agroalimentaria (Karacabey y Mazza, 2010). La RSM comprende un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas basadas en el ajuste de los datos experimentales a modelos empíricos (Bezerra *et al.*, 2008).

Se trata de una herramienta estadística multivariable de modelización y optimización, que se aplica a aquellos procesos en los que una o varias respuestas están condicionadas por varios factores y sus interacciones (Bas y Boyaci, 2007). La RSM permite construir un modelo de tipo polinómico que describe el comportamiento de la base de datos, sin necesidad de realizar experimentalmente todas las combinaciones posibles de las variables en estudio. Los objetivos principales de la RSM radican en: i) estimar el efecto de las variables independientes del proceso y de sus interacciones sobre las respuestas; ii) determinar la combinación de factores que origina una respuesta óptima del sistema; y iii) proporcionar un modelo matemático multivariable para realizar previsiones estadísticas (Ku y Mun, 2008; Rodríguez-González *et al.*, 2012).

La aplicación de la RSM conlleva una serie de etapas (Bas y Boyaci, 2007; Bezerra *et al.*, 2008):

- estudio preliminar en el que se determinan las variables independientes con mayor influencia en el sistema y se delimitan sus niveles experimentales de acuerdo con el objetivo del estudio;

- selección y ejecución del diseño experimental;
- modelización matemática de los datos experimentales de acuerdo con una función polinómica multivariable;
- evaluación del ajuste del modelo;
- representación de las superficies de respuesta y cálculo de las condiciones óptimas para alcanzar el mayor rendimiento del proceso.

La ecuación matemática a la que se ajustan los datos experimentales en la RSM consiste en una función polinómica de segundo orden:

$$[1.1] \quad Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2$$

Donde Y es la respuesta predicha; X_i y X_j , las variables independientes; β_0 , la constante del modelo; y β_i , β_{ii} y β_{ij} , los coeficientes de regresión lineal, cuadrática y de interacción del modelo, respectivamente.

Para estimar los parámetros de la ecuación anterior y así poder representar las correspondientes superficies de respuesta del sistema, los diseños experimentales más frecuentes son el de Box-Behnken y el diseño de composición central (**Tabla 1.11**), que difieren con respecto al número de niveles experimentales de cada variable independiente considerada y respecto al número de experimentos realizados. No obstante, ambos se caracterizan por requerir niveles experimentales equidistantes de las variables en estudio (Bezerra *et al.*, 2008).

Tabla 1.11. Diseños experimentales de RSM más utilizados en los procesos de extracción de compuestos bioactivos en la industria agroalimentaria.

Modelo	Nº de experimentos	Compuestos bioactivos extraídos	Referencia bibliográfica
Box- Behnken	$N = 2k(k - 1) + m$	Compuestos fenolicos flavonoides, polisacáridos, antocianos, carotenoides, cafeína, clorofilas.	Yang <i>et al.</i> (2010), Chen <i>et al.</i> (2011), Park <i>et al.</i> (2012), Rodríguez-González <i>et al.</i> , (2014), Minjares-Fuentes <i>et al.</i> (2014)
Composición Central	$N = k^2 + 2k + m$	Compuestos fenolicos, resvaratrol, antocianos, flavonoides	Ballard <i>et al.</i> (2009), Chaffoor <i>et al.</i> (2009 ^a ;2009b), Gan <i>et al.</i> (2011), Sha <i>et al.</i> (2011). Tabaraki <i>et al.</i> (2011).

N, nº de experimentos; k, nº de variables independientes del sistema; m, nº de repeticiones del punto central del diseño

OBJETIVO

2. OBJETIVOS

Actualmente el aceite de oliva virgen extra es un alimento de referencia dentro de la reconocida *Dieta Mediterránea*. Dicha dieta y dentro de ella el aceite de oliva, está considerado como uno de los alimentos responsables de la prevención de diferentes enfermedades de origen cardiovascular así como de ciertos tipos de cáncer. Todas estas circunstancias han hecho que aumente de forma considerable el interés en torno a este alimento, no solo desde el aspecto de la obtención de un aceite de oliva cada vez de mejor calidad y de una conservación del mismo más eficiente, sino también en aspectos tan relevantes como pueden ser la revalorización y el aprovechamiento de los subproductos derivados de su elaboración.

En este contexto, los objetivos generales marcados en el presente trabajo consistieron en **(i) evaluar la influencia de las características agroclimáticas sobre la calidad del aceite de oliva, (ii) analizar nuevas estrategias que permitan una mejor conservación del mismo, y, finalmente, (iii) estudiar el proceso de extracción de compuestos antioxidantes del orujo de almazara mediante la asistencia de ultrasonidos (US) de potencia.**

Para la consecución de estos objetivos generales se plantearon los siguientes objetivos concretos:

- Determinar la importancia del efecto de la variedad y el grado de madurez de las aceitunas, así como del entorno agroclimático sobre las características físico-químicas y sensoriales del aceite de oliva.
 - o Caracterizar y evaluar los aceites de oliva elaborados a partir de las tres variedades de aceituna autorizadas por la DO “Oli de Mallorca” (*arbequina*, *picual* y *empeltre*) en función del grado de madurez de estas (verde, envero y maduro).
 - o Analizar el efecto que imprimen las condiciones agroclimáticas de la zona así como el grado de madurez de la aceituna sobre las características físico-químicas del aceite de oliva elaborado a partir de la variedad *arbequina*.
- Establecer la metodología o procedimiento más adecuado para la conservación de las características físico-químicas y sensoriales del aceite de oliva.

- Analizar el efecto de la aplicación de un pretratamiento con US de potencia sobre los principales parámetros de calidad del aceite de oliva virgen extra.
 - Evaluar el efecto de la ausencia/presencia de luz sobre la calidad del aceite de oliva virgen extra durante el período de almacenamiento.
 - Evaluar el efecto de uso de una atmósfera inerte sobre la calidad del aceite de oliva virgen extra durante el período de almacenamiento.
 - Evaluar el efecto de la temperatura sobre la calidad del aceite de oliva durante el período de almacenamiento.
 - Y finalmente, evaluar el efecto de la aplicación de un pretratamiento con US, con y sin la combinación de las demás metodologías (ausencia de luz, atmosfera modificada y baja temperatura), sobre la calidad del aceite de oliva virgen extra durante el período de almacenamiento.
- Estudiar el proceso de extracción de compuestos antioxidantes obtenidos a partir de residuos de almazara mediante asistencia acústica, haciendo uso de una sonda de ultrasónicos.
- Evaluar el efecto de diferentes variables implicadas en el proceso, en concreto la potencia de US, el ratio disolvente/soluto, y el tiempo de extracción.

El desarrollo de este proyecto de tesis doctoral se ha dirigido a un sector clave dentro de la industria agroalimentaria de las Islas Baleares, como es la industria oleícola, la cual ha visto reconocido su producto, el aceite de oliva, mediante la máxima indicación de calidad como es la Denominación de Origen. La elección de la temática del aceite de oliva también se ha visto motivada por el considerable aumento experimentado, tanto en datos de producción como en número de elaboradores, durante los últimos años. Mediante los resultados y las conclusiones derivadas de este proyecto, se pretende ofrecer, al sector oleícola balear, las herramientas y los conocimientos científicos necesarios que permitan aumentar la calidad global del proceso de producción del aceite de oliva, en todas sus facetas: elaboración, conservación y revalorización de los subproductos generados. Este aumento de la calidad permitiría, sin duda, aumentar la competitividad de este importante sector de la industria agroalimentaria de las Islas Baleares.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

A continuación se describen las materias primas, la metodología y los equipos utilizados, los diseños experimentales propuestos y el tratamiento estadístico aplicado durante el desarrollo de la presente tesis doctoral.

3.1. Materia prima

Para la consecución de los objetivos planteados, se utilizaron muestras de suelo, aceitunas (a partir de las cuales se elaboraron los diferentes aceites de oliva monovarietales utilizados), así como el residuo seco de almazara (orujo). En concreto, se ha trabajado con tres variedades de aceitunas (*arbequina* [Arb], *picual* [Pic] y *empeltre* [Emp]).

Los residuos o subproductos de almazara analizados fueron el orujo seco procedente de la extracción del aceite en continuo de tres fases.

3.1.1. Suelo

Las muestras de suelo consistieron en fracciones superficiales representativas de cada olivar, todas a una profundidad de 0 – 20 cm. (**Tabla 3.1**).

Tabla 3.1. Muestras de suelo

Código de muestra	Origen*
S-Arb1	Olivar 1 (Algaida)
S-Arb2	Olivar 2 (Campanet)
S-Arb3	Olivar 3 (Cas Concos)

**Olivares inscritos dentro de la DO "Oli de Mallorca"*

3.1.2. Aceitunas

Las muestras de aceitunas (*Olea europaea* L.) consideradas se detallan en la **Tabla 3.2**. Todas ellas se recogieron manualmente (rasquetas) en diferentes plantaciones de Mallorca, en función de su grado de maduración (**Figura 3.1**). Una vez recolectadas, se elaboró el aceite (mediante el sistema Abencor) el mismo día de la recolección, el aceite obtenido se conservó en botellas de vidrio de color ámbar dentro de una cámara termostatzada (12 ± 2 °C) hasta su posterior análisis.

Tabla 3.2. Muestras de aceituna (*Olea europaea* L.)

Código de muestra	Variedad	Origen
Arb1-RI1 Arb1-RI2 Arb1-RI3	arbequina	Olivar 1 (Algaida)
Arb2-RI1 Arb2-RI2 Arb2-RI3	arbequina	Olivar 2 (Campanet)
Arb3-RI3 Arb3-RI3 Arb3-RI3	arbequina	Olivar 3 (Cas Concos)
Pic1-RI1 Pic1-RI2 Pic1-RI3	picual	Olivar 1 (Algaida)
Emp1-RI1 Emp1-RI2 Emp1-RI3	empeltre	Olivar 3 (Cas Concos)

RI1, RI2 y RI3, corresponde a los diferentes estados de maduración. Todas las muestras corresponden a la cosecha de 2012. Todos los olivares están inscritos en el registro del consejo regulador de la DO "Oli de Mallorca".



Figura 3.1- Aceituna *arbequina* según el grado de maduración seleccionado

3.1.3. Aceite de oliva

Para la realización de este estudio, se utilizaron dos tipos de aceite de oliva en función de su procedencia y del tipo de investigación a realizar.

Por una parte, como se ha mencionado anteriormente, se utilizó el aceite de oliva procedente de las aceitunas descritas en el apartado 3.1.2, el cual se extrajo mediante el

sistema Abencor. Se siguió la misma codificación que se asignó a cada una de las muestras de aceituna (**Tabla 3.2**).

El segundo tipo de aceite de oliva utilizado en este trabajo fue elaborado en la almazara de la Cooperativa “Sant Bartomeu” de Sóller. Almazara inscrita en el registro de Almazaras del Consejo Regulador de la DO “Oli de Mallorca”, la cual elaboró el aceite mediante un sistema de extracción en continuo de tres fases. En la **Tabla 3.3** se muestra la codificación, así como la variedad y origen de estos aceites de oliva.

Tabla 3.3. Muestras de aceite de oliva

Código de muestra	Variedad	Origen
Emp	empeltre	Sóller
Arb	arbequina	Cas Concos

3.1.4. Orujo de almazara

Para realizar este estudio se utilizó el residuo sólido de almazara (orujo), procedente de la variedad *arbequina* (Cooperativa “Sant Bartomeu” de Sóller), y obtenido a partir de un proceso de extracción de aceite de oliva en tres fases. Una vez en el laboratorio, las muestras de orujo se homogeneizaron y se conservaron en frío (2 – 4 °C) hasta su posterior análisis.

3.2. Metodología

3.2.1. Sistemas de muestreo

3.2.1.1. Muestreo del suelo

En el caso de las muestras de suelo, para evitar interferencias con abonos y fertilizantes, se realizó un muestreo sistemático en el período de recolección de la aceituna (noviembre-diciembre). Para obtener una muestra representativa de suelo de la parcela, se consideraron de 20 a 30 puntos de muestreo uniformemente distribuidos a lo largo de toda la superficie del olivar, descartando tanto las hileras colindantes de la parcela como los olivos ubicados de cada hilera, con el fin de evitar posibles desviaciones del comportamiento general del olivar (**Figura 3.2**). En dichos puntos, se tomaron, con ayuda de una barrena, muestras individuales superficiales (profundidad de 0 – 20 cm) hasta un peso total de 10 a 15 kg por olivar.

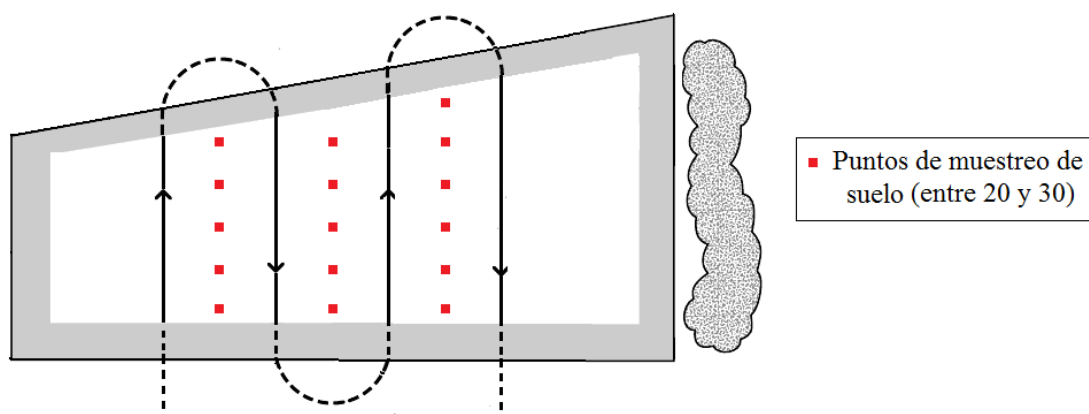


Figura 3.2. Diagrama de muestreo de suelo en el olivar

3.2.1.2. Muestreo y recogida de aceituna.

Para cada una de las variedades de aceituna objeto de estudio (*arbequina*, *picual* y *empeltre*), se tomó una muestra representativa de cada olivar. Para ello, el muestreo se realizó de manera uniforme en toda superficie, descartando, al igual que en el caso del muestreo del suelo, las hileras colindantes de la parcela. (**Figura 3.3**).

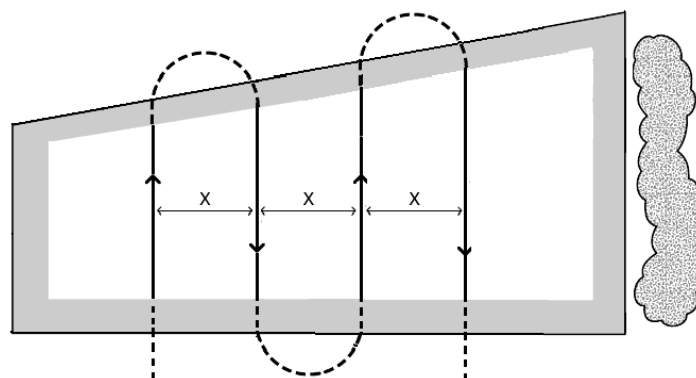


Figura 3.3. Diagrama de muestreo de aceituna en el olivar.
(x = carriles muestreados)

Delimitada la zona de muestreo, en un mismo carril de olivos, se recogieron muestras de aceitunas cada tres o cuatro olivos, realizando un barrido del carril en forma de zig-zag. Dicha operación se repitió en un total de 2 a 4 carriles no consecutivos, en función de la superficie total del olivar. En total se recogieron un mínimo de 10 kg de aceitunas por variedad y grado de maduración. Posteriormente, fueron depositadas en cajas de plástico perforadas que permitían la ventilación, evitando el aplastamiento y el inicio de procesos biológicos por la microflora presente, para así mantener la calidad de los frutos hasta su llegada al laboratorio. Los lotes de aceitunas se conservaron en cámaras frigoríficas (4 °C) para evitar el deterioro metabólico, además las cajas se

separaron para favorecer el paso del aire entre ellas y así mejorar la ventilación. Todas las aceitunas fueron elaboradas en un periodo máximo de 24 h.

3.2.2. Elaboración del aceite de oliva. Sistema Abencor

Para la elaboración del aceite de oliva se ha utilizado el sistema Abencor serie 100 (MC2 Ingenierías y Sistemas, Sevilla, Estaña) (**Figura 3.4**), que consiste en reproducir, a nivel de laboratorio, la extracción de aceite de oliva mediante un sistema de tres fases. Este sistema consta de un molino de martillos, una termobatidora y una centrífuga de pastas.



Figura 3.4. Extracción del aceite de oliva mediante el sistema Abencor

El molino de martillos está construido de acero inoxidable y gira a una velocidad de 3000 rpm. La termobatidora consta de un baño de agua en su parte inferior, cuya temperatura está regulada mediante un termostato, y en la parte superior un sistema de paletas de acero inoxidable que giran a 50 rpm y que permite el batido simultáneo de hasta ocho muestras de pasta de aceituna. La centrífuga de pastas es de tipo “olla”, está construida de acero inoxidable y gira a 3500 rpm.

El procedimiento experimental utilizado para la extracción del aceite de oliva virgen mediante este sistema, consiste en molturar las aceitunas sanas en el molino de martillos. Posteriormente, se homogeneiza la pasta obtenida y se procede al batido de la misma en los cazos de acero inoxidable (700 g de pasta en cada uno) durante 10 minutos a 28 °C. A continuación, se añaden 100 mL de agua caliente y se continua

batiendo durante 30 minutos más. En el caso de pastas acuosas (normalmente procedente de aceitunas muy verdes) se añade microtalco natural en una cantidad adecuada (1,5 - 2,0 %) para romper la emulsión que pudiera formarse.

Terminado el batido, se somete la pasta a centrifugación y se recoge el mosto oleoso en una probeta graduada (1000 mL).

Una vez separadas, las aguas de vegetación, el aceite de oliva se recoge y se filtra con unos filtros de papel. El aceite filtrado se recoge en una botella de vidrio oscuro verde y se almacena en nevera a 12 °C hasta el momento de su análisis.

El rendimiento graso del proceso de extracción se determinó según el procedimiento descrito por Martínez *et al.* (1975). Una vez separado por decantación el aceite de oliva dentro de la probeta, se anota el volumen de aceite.

Su cálculo se obtiene aplicando la siguiente fórmula:

$$[3.1] \quad \text{Rendimiento (\%)} = \frac{91,5 \cdot V}{P}$$

Donde V, es el volumen de aceite obtenido (mL) y P es la cantidad de pasta de aceituna utilizada (g).

La determinación se realizó 7 veces. Se tomó como resultado la media aritmética de todas las medidas.

3.3. Diseño experimental

En la presente tesis doctoral se plantearon tres líneas de investigación. La primera de ellas, se centró en el estudio de la caracterización de los aceites de oliva vírgenes extra procedente de las variedades *arbequina*, *picual* y *empeltre*, todas ellas autorizadas por la DO “Oli de Mallorca”, elaborados a partir de aceitunas que se encontraban en diferentes grados de madurez y de diferente procedencia geográfica.

Una vez caracterizado el aceite de oliva, se llevó a cabo una segunda etapa en la cual se abordó el estudio de diferentes metodologías y estrategias para la conservación del aceite de oliva. Estrategias basadas en el uso de atmósfera inerte, ausencia de luz, disminución de la temperatura, y como técnica innovadora, de la cual no tenemos constancia que se haya aplicado anteriormente, se utilizaron US de potencia para la eliminación del oxígeno presente en la matriz del aceite. Esta segunda línea de trabajo se propuso con el objetivo de evaluar nuevos tratamientos de conservación que permitan

mantener el mayor tiempo posible, las cualidades tanto físico-químicas como sensoriales del aceite de oliva.

Por último, la tercera línea de trabajo se planificó con la intención de diseñar un procedimiento que permita aprovechar los subproductos de la industria oleícola como fuente de compuestos bioactivos, en particular, compuestos fenólicos, de gran interés para la industria alimentaria, farmacéutica y cosmética. En concreto, se evaluó la aplicación de US de potencia como tecnología emergente para mejorar el proceso de extracción de dichos componentes bioactivos presentes en el orujo de almazara.

Así pues, para la consecución de los objetivos planteados en cada una de las etapas descritas se propusieron los siguientes diseños experimentales.

3.3.1. Influencia de la variedad, el grado de maduración y la procedencia geográfica sobre las características físico-químicas y sensoriales de aceites de oliva virgen extra.

3.3.1.1. Efecto de la variedad y del grado de maduración de las aceitunas sobre la calidad del aceite de oliva

En el estudio, se utilizaron las tres variedades de aceituna autorizadas por la DO “Oli de Mallorca” (*arbequina*, *picual* y *empeltre*), recogidas en diferentes olivares de la Isla de Mallorca y en diferentes grados de maduración (**ver Tabla 3.2**). Para el estudio de la caracterización del aceite de oliva en función de la variedad y del grado de maduración, se utilizaron las muestras (*Arb1*, *Pic1* y *Empl*, a los correspondientes grados de maduración RI1, RI2 y RI3).

Las muestras se recogieron mediante el sistema de ordeño, y el aceite de oliva se extrajo mediante el sistema ABENCOR, en un plazo no superior a las 24 horas después de la recolección. Posteriormente, dicho aceite de oliva se conservó en oscuridad en una cámara termostaticada a 12 °C.

Finalmente, se evaluaron las propiedades físico-químicas y sensoriales de cada una de las muestras de aceite, con el propósito de compararlas y así poder determinar el efecto de la variedad y del grado de maduración del fruto en la calidad final del aceite de oliva.

3.3.1.2. Efecto de la procedencia geográfica y del estado de maduración de las aceitunas sobre la calidad del aceite de oliva

En este trabajo, se han utilizado el aceite monovarietal de la variedad *arbequina*, procedente de tres zonas bien diferenciadas de Mallorca, como son Algaida (Olivar 1), Campanet (Olivar 2) y Cas Concos (Olivar 3) (**Figura 3.5**).

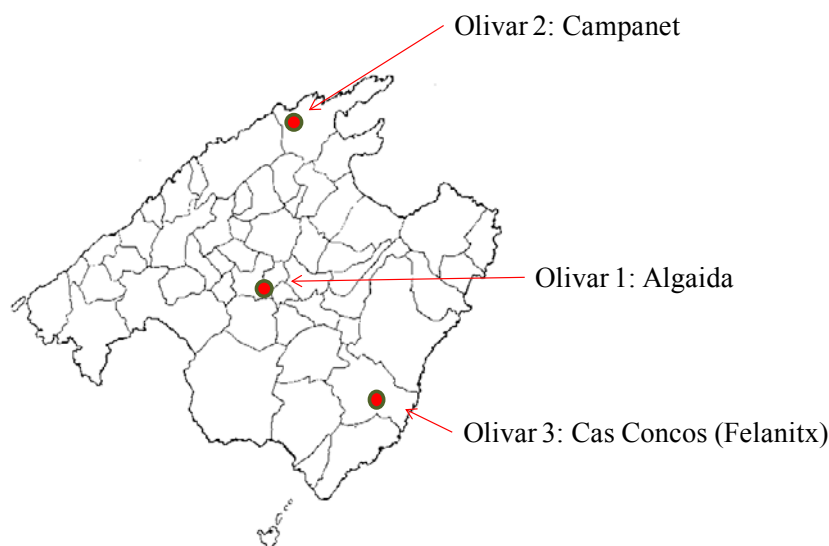


Figura 3.5. Localización de los olivares objeto de estudio.

Para conseguir el objetivo propuesto en este estudio, se evaluaron las características físico-químicas de los aceites de oliva de la variedad *arbequina*, procedentes de diferentes emplazamientos de la Isla de Mallorca y recogida a diferentes grados de madurez, con la finalidad de demostrar que los efectos agroclimáticos, conjuntamente con el grado de madurez de la aceituna afectan, de manera significativa en las características del aceite de oliva.

3.3.2. Evaluación de diferentes metodologías de conservación del aceite de oliva virgen extra

Para este estudio, se utilizaron dos tipos de muestras de aceite de oliva virgen extra monovarietales, una procedente de la variedad *arbequina* (*Arb*) y una segunda muestra elaborada a partir de la variedad *empeltre* (*Emp*) (**Tabla 3.3**). En la **Figura 3.6**, se presenta, de forma esquematizada, la planificación experimental llevada a cabo para la realización del estudio de conservación.

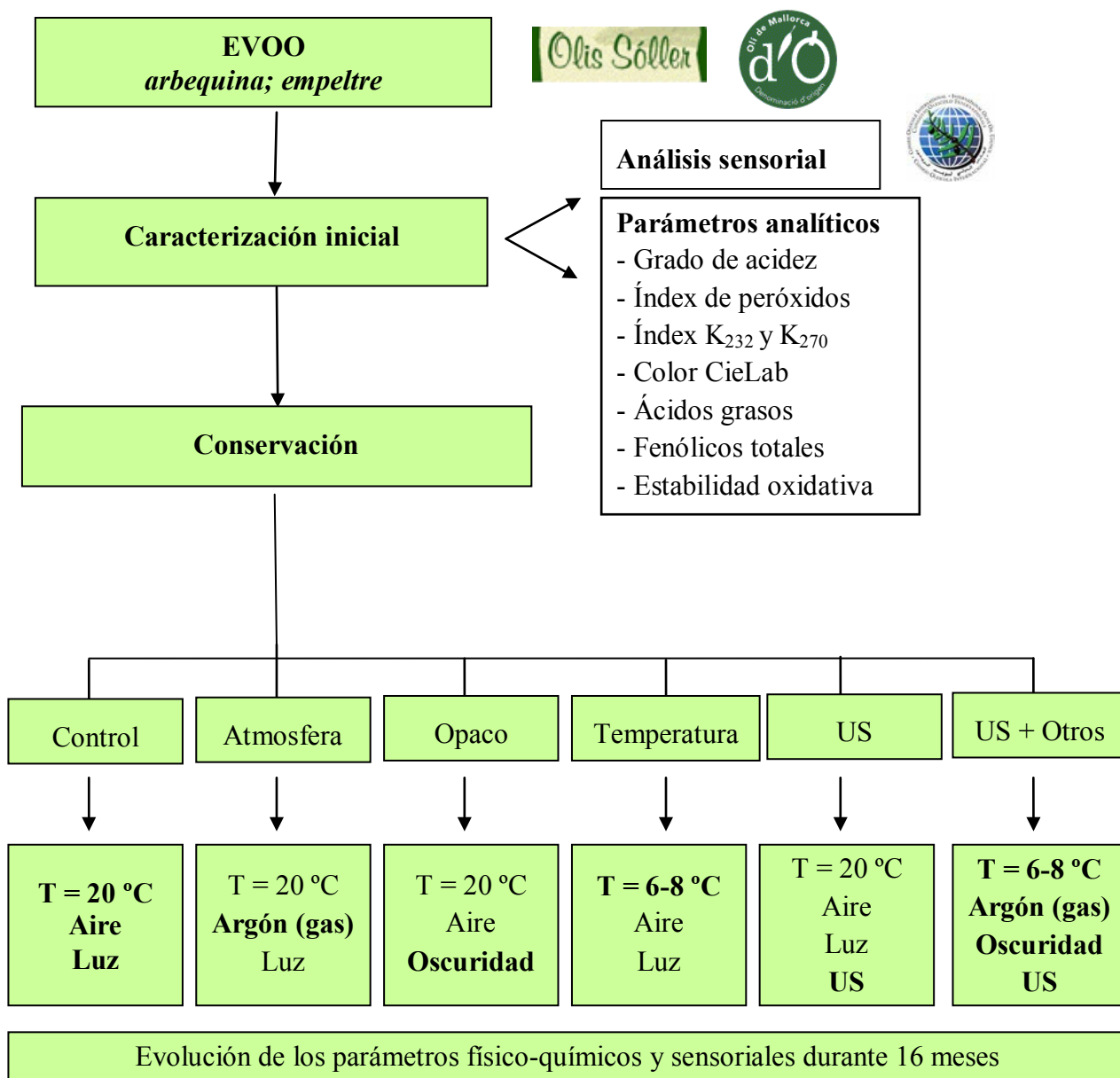


Figura 3.6. Planificación experimental correspondiente al estudio de las metodologías de conservación para el aceite de oliva de las variedades *arbequina* y *empeltre*.

Una vez elaborado, el aceite de oliva se envasó, sin filtrar, en botellas comerciales de cristal verde oscuro (250 mL). Una vez en el laboratorio, se procedió a la codificación y aplicación de la metodología correspondiente a las diferentes condiciones de conservación utilizadas:

- Control: esta muestra pretende simular el aceite de oliva que un consumidor habitual puede encontrar en los establecimientos de venta o simular la conservación en la despensa del hogar. Para ello, las muestras se mantuvieron en

cámara termostatzada a 20 ± 2 °C evitando cambios bruscos de temperatura durante el período de almacenamiento.

- Atmósfera: la muestra fue conservada en atmósfera inerte. Esto se consiguió desplazando el aire presente en el espacio de cabeza de la botella con argón. La temperatura de almacenamiento fue de 20 °C.
- Oscuridad: la muestra fue conservada dentro de botellas recubiertas con varias capas de papel de aluminio para garantizar una total opacidad. La temperatura de almacenamiento fue de 20 °C.
- Temperatura: dado que el aceite de oliva no es más que zumo de fruta, esta muestra se conservó a temperatura de refrigeración (4 - 6 °C).
- Ultrasonidos (US): esta muestra fue pre-tratada con US de potencia según la metodología descrita en la patente nº P25827ES00 (Femenia *et al.*, 2011).
- Ultrasonidos + O tras (US + O tras): Esta muestra fue pre-tratada con US de potencia según la metodología descrita en la patente nº P25827ES00 (Femenia *et al.*, 2011), una vez tratada se conservó a temperatura de refrigeración (4 - 6 °C), en atmosfera modificada (Ar) y ausencia de luz.

Las muestras *Control*, *Atmosfera*, *Temperatura* y *US*, se conservaron en presencia de luz. Los ciclos de luz de 12 horas se llevaron a cabo mediante una lámpara fluorescente compacta en espiral de 11W de potencia, 595 de lumen (flujo lumínico), clase A de luz diurna.

Las diferentes muestras fueron sometidas a un análisis de los principales parámetros fisico-químicos y sensoriales a intervalos de dos meses durante un período de 16 meses con el fin de determinar la influencia de las diferentes variables de conservación.

3.3.3. Extracción sólido-líquido de compuestos bioactivos asistida mediante ultrasonidos de potencia

3.3.3.1. Equipo extractor: sonda de ultrasonidos de potencia

El equipo consistió en un procesador de ultrasonidos UP400S (Hielscher Ultrasound Technology, Alemania) acoplado a una sonda de 22 mm de diámetro (**Figura 3.7**).

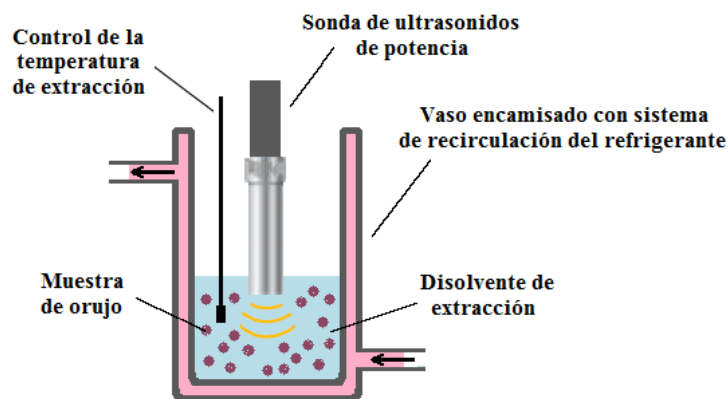


Figura 3.7. Equipo extractor con la sonda de ultrasonidos (González-Centeno, 2013).

Esta sonda de US transforma la corriente eléctrica (voltaje 200-240 V) en ultrasonidos. Este aparato tiene una potencia de 400W y opera a una frecuencia de 55 ± 5 Hz.

3.3.3.2. Determinación de la potencia de ultrasonidos. Estudio calorimétrico.

Con el objetivo de establecer la potencia de ultrasonidos (W), se procedió a realizar una calibración del sistema mediante un estudio calorimétrico. Esta metodología consiste en la determinación del incremento de temperatura del disolvente de extracción que tiene lugar durante los primeros instantes de la aplicación de los US (Raso *et al.*, 1999), en ausencia de muestra y sin termostatación del sistema. La temperatura del medio se registró cada segundo durante los cinco primeros minutos de aplicación de los ultrasonidos, mediante dos sondas termopar tipo K conectadas a un equipo de adquisición de datos HP Data Logger 34970A (Hewlett-Packard, España). La operación se repitió tres veces para cada set de condiciones experimentales. El cálculo de la potencia ultrasónica se realizó de acuerdo con la ecuación [3.12] a partir de la curva temperatura-tiempo determinada experimentalmente.

$$[3.2] \quad P(W) = m_{disolvente} \cdot C_{e\ disolvente} \cdot \frac{\Delta T}{\Delta t}$$

Donde: m y c_e son, respectivamente, la masa y el calor específico del disolvente, mientras que ΔT hace referencia al incremento de temperatura (K) durante un intervalo de tiempo Δt (s).

3.3.3.3. Estudio del efecto de la potencia de ultrasonidos y relación disolvente/soluto sobre el proceso de extracción

El principal objetivo de este estudio consistió en examinar el efecto de la potencia de ultrasonidos, el grado de dilución de la muestra, así como del tiempo de extracción, sobre la recuperación de los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante del orujo de almazara tras someterlo a un proceso de extracción asistido mediante US de potencia (Figura 3.8). Para la realización de este estudio se utilizó una muestra de orujo de la variedad *arbequina* (muestra *Or-Arb*).

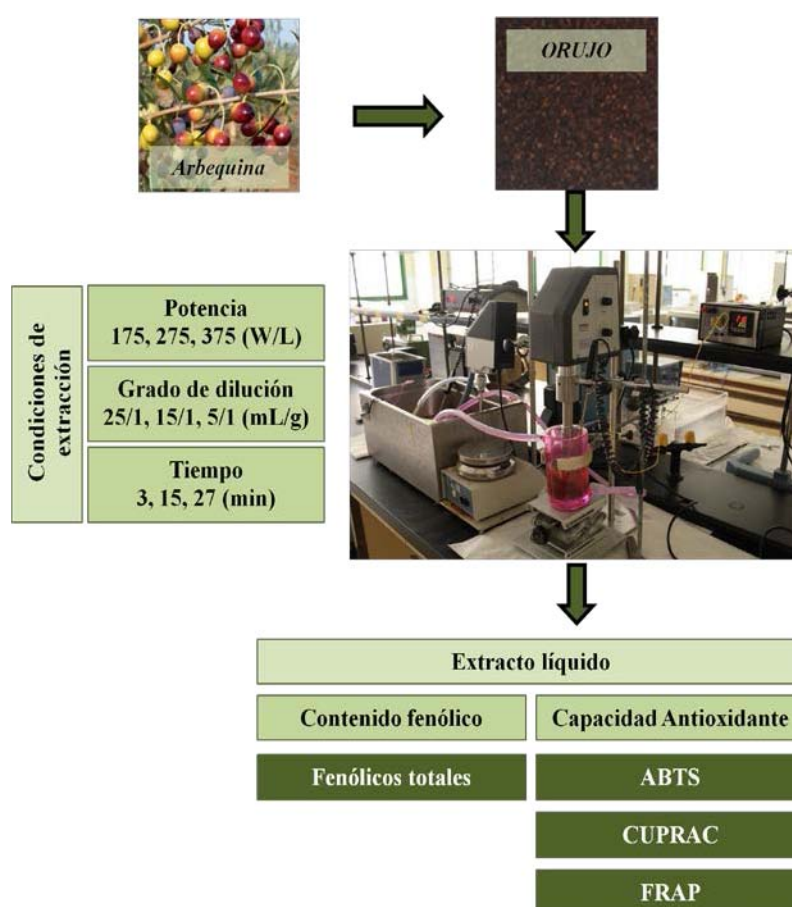


Figura 3.8. Esquema correspondiente al estudio del efecto de la potencia de ultrasonidos, el grado de dilución de la muestra y el tiempo de extracción sobre el proceso de extracción sólido-líquido de compuestos bioactivos del orujo de almazara.

Condiciones de extracción

El orujo de almazara procedente de la extracción realizada con un sistema de tres fases (tamaño de partícula inferior a 5 mm) se sometió a un proceso de extracción

sólido-líquido haciendo uso del equipo extractor con la sonda de ultrasonidos (**Figura 3.7**). Se utilizó etanol 50% (v/v) como disolvente de extracción ($V_{\text{Total}} = 200 \text{ mL}$). La extracción se llevó a cabo en un vaso encamisado, con recirculación de refrigerante para asegurar el control de la temperatura durante todo el proceso a $20 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Las extracciones se realizaron bajo diferentes condiciones de potencia de ultrasonidos (entendida como densidad volumétrica de potencia, 175, 275, 375 W/L) y tiempo de extracción (3, 15 y 25 min)

Una vez finalizada la extracción, se determinó el contenido en fenólicos totales, así como la capacidad antioxidante del extracto líquido (determinada a partir de los métodos ABTS, CUPRAC y FRAP), previa filtración del mismo (PTPE, $0,45 \text{ }\mu\text{m}$).

Diseño de Box-Behnken

El tratamiento de los datos experimentales se realizó mediante la aplicación de la metodología de superficie de respuesta (RSM). En este contexto, se aplicó un diseño Box-Behnken (BBD) (Box and Behnken, 1960) para evaluar el efecto de la potencia de ultrasonidos (X_1), el grado de dilución de la muestra (X_2) y el tiempo de extracción (X_3), sobre el patrón de respuesta de las muestras en términos de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante. Los tres niveles equidistantes de las tres variables independientes (**Tabla 3.4**), se codificaron de acuerdo a la ecuación [3.3].

$$[3.3] \quad x_i = \frac{(X_i - X_0)}{\Delta X} \quad i = 1,2,3$$

Donde x_i y X_i son, respectivamente, los valores codificados y experimentales de la variable i ; X_0 es el valor experimental de dicha variable en el punto central; ΔX , es la distancia entre los valores experimentales.

Tabla 3.4. Valores experimentales y codificados de las variedades independientes utilizados en el diseño de Box-Behnken.

Valores codificados	Valores experimentales		
	Potencia US (W/L)	Grado de dilución (mL/g)	Tiempo de extracción (min)
-1	175	25	3
0	275	15	15
1	375	5	27

El diseño completo consistió en 17 experiencias que se realizaron aleatoriamente para minimizar el error experimental (**Tabla 3.5**). Las experiencias realizadas utilizando las condiciones experimentales del punto central (275 W/L, 15 mL/g, 15 min) se llevaron a cabo por quintuplicado.

Tabla 3.5. Condiciones de extracción del diseño Box-Behnken

Experiencia	Potencia US (W/L)	Grado de dilución (mL/g)	Tiempo de extracción (min)
1	375	25	15
2	375	15	27
3	375	5	1
4	275	15	15
5	275	15	15
6	275	5	3
7	275	25	27
8	275	15	15
9	135	25	15
10	135	5	15
11	375	15	3
12	275	15	15
13	175	15	3
14	275	15	15
15	175	15	27
16	275	5	27
17	275	25	3

El modelo matemático utilizado para predecir la respuesta de cada variable dependiente se basó en una ecuación polinómica de segundo grado (ecuación [1.1])

$$[1.1] \quad Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j$$

Donde Y es la respuesta predicha para cada una de las variables independientes (fenólicos totales y capacidad antioxidante): X_1 , X_2 , y X_3 corresponden a las variables independientes; β_0 es la constante del modelo; y β_i , β_{ii} y β_{ij} son, respectivamente, los coeficientes de regresión lineal, cuadrática y de interacción del modelo.

3.4. Análisis químicos

3.4.1. Parámetros agronómicos: Índice de madurez

Este parámetro agronómico indica el estado de maduración del fruto en función de la coloración que presenta durante su desarrollo en el olivo. Se considera como período de maduración el tiempo transcurrido desde la aparición de las manchas violáceas hasta que adquiere la coloración definitiva de la piel (Humanes y Civantos, 1992). El período de maduración no es homogéneo, y depende principalmente de las condiciones climáticas, de las características varietales y de los sistemas de producción.

A medida que la aceituna evoluciona en el árbol, la coloración de su piel se va modificando. En primer lugar el color verde intenso se transforma en amarillento. A continuación, empiezan a aparecer unas manchas violáceas por el ápice que terminan por ocupar toda la piel tomando el fruto un tono violáceo o morado, que se va oscureciendo hasta llegar al color negro o al característico de la variedad, ya que existen determinadas variedades como la *blanqueta*, las cuales, en su estado de plena madurez, no llegan al color negro quedándose en un color morado oscuro. Una vez que se ha pasado por el estado de color violeta, la pulpa también adquiere un color violáceo o morado desde el exterior hacia el interior, hasta que llega al hueso. En este momento se considera que ha terminado el proceso de maduración.

En todas las variedades, estas transformaciones no tienen lugar en todos los frutos al mismo tiempo, produciéndose una maduración escalonada, en mayor o menor medida, dependiendo de la variedad.

El método seguido en este trabajo para establecer el índice de madurez de los frutos fue el propuesto por Uceda y Frias (1975), que consiste en clasificar la aceituna en ocho estadios atendiendo al color de la piel y de la pulpa. Para determinarlo se eligieron aleatoriamente 100 frutos para cada muestra. Estos frutos se clasifican en las siguientes categorías:

- Grupo 0: Piel verde intensa.
- Grupo 1: Piel verde amarillenta.
- Grupo 2: Piel verde con manchas rojizas (inicio del envero).
- Grupo 3: Piel rojiza o morada (terminación del envero).
- Grupo 4: Piel negra con pulpa blanca.
- Grupo 5: Piel negra con menos de la mitad de la pulpa morada.

- Grupo 6: Piel negra con la mitad o más de la pulpa morada.
- Grupo 7: Piel negra con toda la pulpa morada.

El índice de madurez (RI) se obtuvo multiplicando el número de aceitunas (N_i) incluidas en cada grupo por el número del grupo (i) correspondiente, sumando los valores obtenidos ($\sum N_i * i$) y dividiendo por el número de frutos totales (normalmente 100).

$$[3.4] \quad RI = \frac{\sum N_i * i}{100}$$

3.4.2. Parámetros de calidad

Para la determinación de los parámetros generales que definen la calidad del aceite de oliva, se ha seguido el Reglamento (CEE) 2568/91 de la comisión de 11 de julio de 1991, y posteriores modificaciones, relativa a las características de los aceites de oliva y los correspondientes métodos de análisis.

3.4.2.1. Grado de acidez

El grado de acidez (GA) de un aceite, o acidez libre, es el contenido en ácidos grasos libres presentes en el aceite, expresado como tanto por ciento en peso de ácido oleico. Se determina mediante valoración de la muestra disuelta previamente en éter etílico-etanol (1:1, v/v), con disolución etanólica de hidróxido potásico (0,1 ó 0,5 N, según sea la acidez prevista de la muestra) y utilizando fenolftaleína como indicador (Reglamento (CEE) 2568/91, Anexo II).

El GA se determina mediante la siguiente expresión matemática:

$$[3.5] \quad GA = \frac{V * N * 282,27}{10 * P}$$

Donde V, es el volumen de disolución de KOH utilizado en la valoración (mL); N, es la normalidad de la disolución de KOH y P es el peso de muestra de aceite (g)

Las determinaciones se realizaron por triplicado. Tomando como resultado la media aritmética de las medidas.

3.4.2.2. Índice de Peróxidos

El índice de peróxidos (IP) aporta información sobre el estado de oxidación del aceite y hace referencia a la cantidad de peróxidos en la muestra que ocasionan la oxidación de yoduro potásico en las condiciones descritas (Reglamento CEE 2568/91 anexo II).

Para su determinación, la muestra problema, disuelta en ácido acético glacial y cloroformo, se trató con una solución de yoduro potásico sobresaturado. El yodo liberado se valora con una solución valorada de tiosulfato sódico (0,002 ó 0,01 N en función de la muestra) utilizando almidón como indicador.

El IP del aceite se calcula a partir de la expresión:

$$[3.6] \quad IP = \frac{V * N * 1000}{P}$$

Donde V, es el volumen de disolución de tiosulfato empleado en la valoración (mL); N, es la normalidad exacta de la disolución de tiosulfato sódico empleada y P, es el peso de la muestra de aceite (g).

Las determinaciones se realizaron por triplicado. Tomando como resultado la media aritmética de las medidas.

3.4.2.3. Prueba espectrofotométrica en el ultravioleta

Los ácidos grasos poliinsaturados son sensibles a las oxidaciones autocatalíticas originando en primer lugar hidroperóxidos, poco estables, que en su estructura contienen dobles o triples enlaces conjugados los cuales absorben a una longitud de onda de 232 nm. Estos compuestos evolucionan con el tiempo dando lugar a componentes de tipo carboxilo (aldehídos y cetonas) que absorben a una longitud de 270 nm.

Los coeficientes de extinción de las muestras disueltas en isooctano se determinaron de acuerdo con el Reglamento (CEE) 2568/91, utilizando un espectrofotómetro UV/Vis (Varian Cary 300 Bio, Australia) (**Figura 3.9**) para determinar la absorbancia.



Figura 3.9. Espectrofotómetro UV-Visible, Cary 300 Bio.

La determinación se hizo a partir de 0,25 g de la muestra de aceite introducidos en un matraz aforado de 25 mL, enrasando con isooctano, el cual se utilizó como blanco..

El coeficiente de extinción a una longitud de onda λ (232 ó 270 nm) se calculó a partir de la siguiente expresión:

$$[3.7] \quad K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{C * e}$$

Donde E_{λ} , es la extinción media en el espectrofotómetro a dicha longitud de onda (232 ó 270); C, es la concentración de la disolución de aceite (g/100mL) y e , es el paso óptico de la cubeta (cm).

Las determinación se realizó por triplicado. Tomando como resultado la media aritmética de las medidas.

3.4.2.4. Análisis sensorial

El análisis sensorial de las muestras de aceite fue realizado por el Panel Oficial de Cata de Aceite de Oliva de Catalunya, llevando a cabo un análisis descriptivo en el que se evaluaron tanto los diferentes atributos positivos como los posibles defectos organolépticos de las muestras de aceite de oliva analizadas, siguiendo la metodología descrita según el Reglamento (CE) 640/2008 de la Comisión, de 4 de julio de 2008. En la **Figura 3.10** se muestra el esquema de la hoja de análisis, la cual el catador debe rellenar según la intensidad de los defectos o atributos del aceite de oliva.

HOJA DE PERFIL DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN

INTENSIDAD DE PERCEPCIÓN DE LOS DEFECTOS

Atrojado/Borras	<div style="position: absolute; right: 0; top: -5px;">➔</div>
Moho-Humedad-Tierra	<div style="position: absolute; right: 0; top: -5px;">➔</div>
Avinado-Avinagrado-Acido-Agrío	<div style="position: absolute; right: 0; top: -5px;">➔</div>
Metálico	<div style="position: absolute; right: 0; top: -5px;">➔</div>
Rancio	<div style="position: absolute; right: 0; top: -5px;">➔</div>
Otros (cuáles)	<div style="position: absolute; right: 0; top: -5px;">➔</div>

INTENSIDAD DE PERCEPCIÓN DE LOS ATRIBUTOS POSITIVOS:

Frutado	<div style="position: absolute; right: 0; top: -5px;">➔</div>
Amargo	<div style="position: absolute; left: 50%; top: -5px; transform: translate(-50%, -50%);">verde maduro</div> <div style="position: absolute; right: 0; top: -5px;">➔</div>
Picante	<div style="position: absolute; right: 0; top: -5px;">➔</div>

Nombre del catador:

Código de la muestra:

Fecha:

Observaciones

Figura 3.10. Hoja reglamentaria para realizar la cata de aceites

3.4.3. Determinación de los ácidos grasos

La determinación de los ácidos grasos se llevó a cabo a partir de la hidrólisis de los triglicéridos y la transesterificación de los ácidos grasos obtenidos para dar lugar a los ésteres metílicos correspondientes. Posteriormente, se procedió a la separación de los ésteres metílicos formados mediante cromatografía de gases (GC) utilizando una columna capilar. La composición en ácidos grasos del aceite de oliva se expresó como el porcentaje del área de sus ésteres metílicos.

La transmetilación de los ácidos grasos se llevó a cabo según el procedimiento descrito por el Reglamento (CEE) 2568/91, Anexo X. Dicho procedimiento consiste en pesar 0,25 g de muestra de aceite en un tubo de vidrio con rosca (Pirex), al cual se le

añaden 500 μL de hidróxido de potasio en metanol 2M y 5 mL de éter de petróleo. Se agita vigorosamente durante 2 minutos en “vortex” y se deja reposar durante una hora. Transcurrido este tiempo, se traspasa la parte superior de la solución a los viales del cromatógrafo,

Para la separación, se utilizó una columna capilar HP-INNOWAX (Crosslinked Polyethylene Glycol) de 30 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y 0,05 μm de espesor de fase, instalada en el cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 7890A) (**Figura 3.11**) equipado con un detector de ionización de llama (FID), conectado a un integrador del programa HP 3368 Chem Station.



Figura 3.11. Cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A.

Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron las siguientes.

- Temperatura del detector: 250 °C
- Temperatura del inyector: 250 °C
- Programa o rampa de temperatura del horno: 120 °C durante 5 min, aumento de la temperatura a razón de 10 °C/min hasta 180 °C, estable durante 30 min. Aumento nuevamente a razón de 10 °C/min hasta llegar a 210 °C y se mantiene constante durante 20 min (tiempo total 65 min).
- Flujo de gas portador (helio): 15 psi
- Split: 1,5:100
- Volumen de inyección 1 μL

La identificación de cada uno de los ésteres metílicos se realizó comparando los tiempos de retención con una solución patrón formada por cada uno de los ésteres metílicos de los ácidos grasos puros.

El contenido de cada uno de los ésteres metílicos correspondientes a los ácidos grasos (AG_i) se expresa como porcentaje del total, calculándose de acuerdo con la siguiente expresión:

$$[3.8] \quad AG_i = \frac{A_i}{A_T} \times 100$$

Donde A_i es el área del pico correspondiente al éster metílico de ácido grasos “i” y A_T es el área total correspondiente a la suma de todos los ésteres metílicos.

3.4.4. Determinación de las coordenadas de color (CIELab)

El espacio CIELab es un sistema de coordenadas cartesiano definido por tres coordenadas L^* , a^* y b^* . La coordenada L^* recibe el nombre de claridad o luminosidad y puede tomar valores entre 0 y 100 (100 corresponde al color blanco y 0 al negro). Las coordenadas colorimétricas a^* y b^* forman un plano perpendicular a la luminosidad. La coordenada a^* define la desviación del punto acromático correspondiente a la luminosidad hacia el rojo ($a^* > 0$) y hacia el verde ($a^* < 0$). Análogamente, la coordenada b^* define la desviación hacia el amarillo ($b^* > 0$) y hacia el azul ($b^* < 0$) como aparece en la **Figura 3.12**

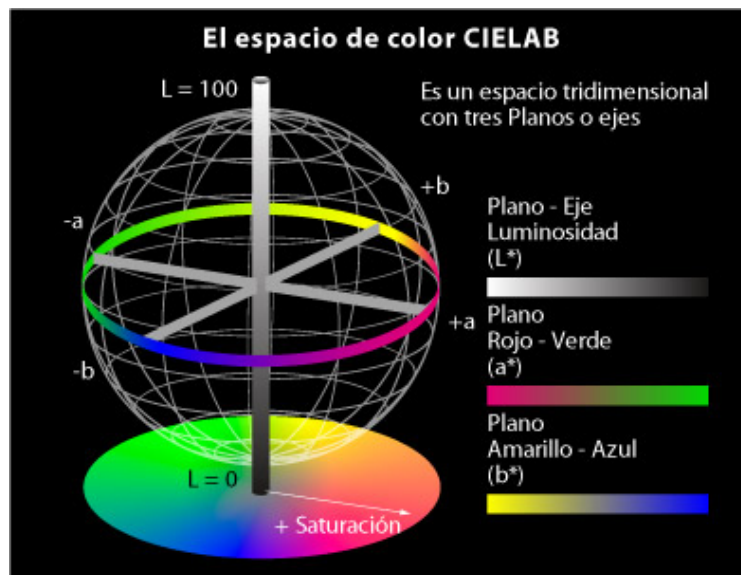


Figura 3.12. Diagrama de las coordenadas de color en el espacio CIELab.

El conjunto a^* y b^* , recibe el nombre de cromaticidad y junto con la luminosidad o claridad definen el color de un estímulo. Teniendo en cuenta las magnitudes de cromaticidad, se pueden definir otras dos parámetros, el tono del color (h^*) y el croma o saturación (C^*).

$$[3.9] \quad h^* = \arctg \frac{b^*}{c^*}$$

$$[3.10] \quad C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

El parámetro h^* varia de 0° a 360° y para estímulos acromáticos ($a^* = 0$, $b^* = 0$) es una magnitud no definida. El Croma, C^* tiene un valor de 0 para un estímulo acromático y, por lo general, no pasa de 150; aunque puede superar este valor para estímulos monocromáticos.

Además, para determinar la variación del color entre dos muestras, puede utilizarse la expresión:

$$[3.11] \quad \Delta E = \sqrt{(L^* - L'^*)^2 + (a^* - a'^*)^2 + (b^* - b'^*)^2}$$

Donde ΔE representa la variación de color; L'^* , a'^* y b'^* corresponden a las coordenadas de color de la muestra control y, L^* , a^* y b^* las coordenadas de color de una muestra determinada.

Para la determinación de las coordenadas de color que definen el espacio CIELab, se utilizó un colorímetro Minolta CM-5 (**Figura 3.13**). El cual, mediante un adaptador de cubetas, para espectrofotometría, de 1 cm de espesor, es capaz de determinar el color de líquidos. Para ello se deposita la muestra de aceite de oliva dentro de una cubeta de plástico de 1 cm y se lee directamente los valores de L^* , a^* y b^* .



Figura 3.13. Colorímetro Minolta CM-5.

3.4.5. Estabilidad oxidativa. Método Rancimat

La estabilidad oxidativa de un aceite de oliva se define como el tiempo necesario para que una muestra de aceite empiece a mostrar síntomas de rancidez. Dicha estabilidad depende de las características propias de cada muestra de aceite de oliva, como pueden ser el grado de insaturaciones de los ácidos grasos, el estado de oxidación,

el contenido en compuestos antioxidantes, etc. Además, este parámetro puede variar en función de las condiciones ambientales, es decir, la temperatura, la presencia de luz y el acceso del aceite al oxígeno.

Para la realización del ensayo de estabilidad oxidativa se utilizó un equipo Rancimat 743 (Metrohm, Herisau, Switzerland) (**Figura 3.14**) en el cual tiene lugar el proceso de oxidación con saturación de oxígeno y a temperatura elevada. La determinación de la estabilidad oxidativa, medida en horas (período de inducción), se calcula como el tiempo que transcurre desde el inicio de la prueba hasta la formación de compuestos volátiles polares como consecuencia del inicio de la oxidación secundaria de las grasas, denominado como “periodo de inducción”. La medida proporcionada por este equipo se basa en la detección conductimétrica de los productos de descomposición de los hidroperóxidos, principalmente ácidos orgánicos de cadena corta.



Figura 3.14. Equipo para determinar la estabilidad oxidativa. Modelo Rancimat 743

El aparato consta de dos bloques de calefacción, que pueden alcanzar temperaturas de hasta 220°C, para acelerar el proceso se introduce un flujo de aire a través del aceite. Este aire, a la vez que proporciona el oxígeno necesario para la oxidación, arrastra a los compuestos volátiles formados durante el proceso y los conduce a un recipiente que contiene agua (60 mL) y una célula que determina la conductividad del agua. Cuando se inicia la descomposición de los hidroperóxidos, se desprenden una serie de compuestos volátiles, que son retenidos en el agua desionizada dando lugar a un aumento de la conductividad. El punto de inflexión de la curva de conductividad, denominada curva de oxidación, define el periodo de inducción del proceso de oxidación de la muestra.

Para la determinación de la estabilidad oxidativa se utilizó la metodología propuesta por Gutiérrez (1989). Se pesan 3,0 g de muestra de aceite a la cual se le hace pasar un flujo de aire de 10 l/h a 100 °C. El resultado de la estabilidad oxidativa se expresa como el tiempo de inducción (h). Las determinaciones se realizaron por duplicado, tomándose como resultado la media aritmética de las medidas.

3.4.6. Caracterización de la fracción fenólica y de la capacidad antioxidante

3.4.6.1. Extracción de la fracción fenólica

La extracción de la fracción fenólica se realizó de forma diferente dependiendo del tipo de muestra.

a) Muestras de aceite de oliva

La extracción fenólica del aceite de oliva se llevó a cabo siguiendo la metodología descrita por Pirisi *et al.* (2000). Para cada muestra de aceite de oliva se hicieron dos extracciones en paralelo (2 g de aceite cada una) (**Figura 3.15**), las cuales al final de la extracción se recogieron como un mismo extracto, de este modo se favorece la extracción líquido-líquido de los compuestos fenólicos ya que existe una mejor agitación y contacto entre el disolvente extractor y la muestra de aceite.

Se pesaron alrededor de 2 gramos de muestra de aceite de oliva en un tubo de centrífuga con tapón rosca ("Pirex"), al cual se le añadieron 1 mL de n-hexano y 2 mL de una mezcla metanol-agua (60:40 v/v). Toda la mezcla se agitó vigorosamente mediante vortex durante 2 min y se centrifugó 5 min a 3000 rpm. Se recogió la fase metanólica en otro tubo de centrífuga y la extracción se repitió tres veces. Al tubo de centrífuga en el cual se recogieron las tres extracciones metanólicas, se añadió 1 mL de n-hexano para lavar el extracto metanólico, se agitó durante 1 min en vortex y se centrifugó 5 min a 3000 rpm desechando el n-hexano. Posteriormente, se recogieron las dos extracciones fenólicas de cada muestra de aceite de oliva y se llevaron a sequedad a baja presión mediante rotavapor (temperatura inferior a 35 °C). La muestra seca se redisolvió con 1 mL de metanol-agua (50:50 v/v). Se utilizaron 0,5 mL del extracto fenólico, sin filtrar, para la determinación de los compuestos fenólicos totales y para la determinación de la capacidad antioxidante, mientras que los 0,5 mL restantes se filtraron con micro-filtros de fibra de nylon de 20 µm, para la caracterización fenólica mediante cromatografía líquida (HPLC-MS-DAD). Los extractos fenólicos se conservaron a (-4°C) hasta su posterior análisis.

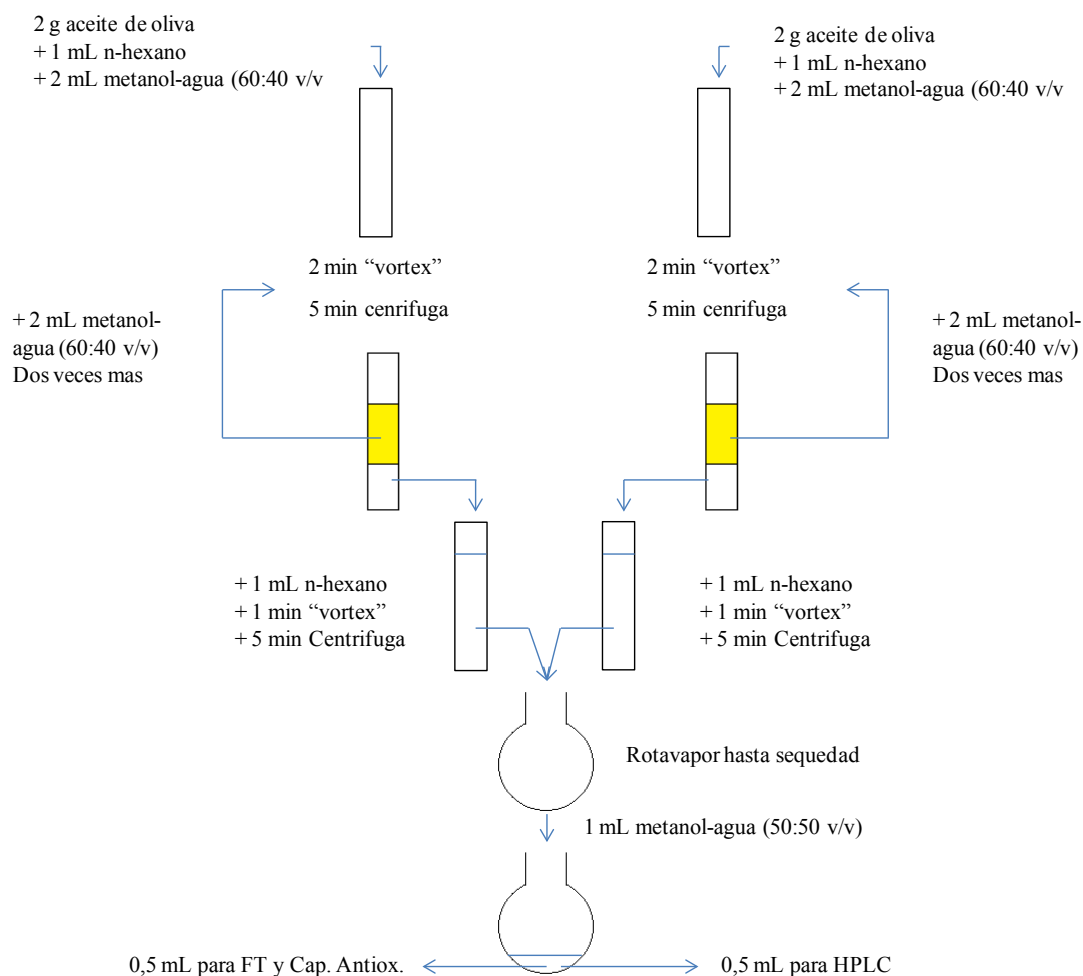


Figura 3.15. Esquema de la extracción de la fracción fenólica del aceite de oliva.

b) Muestras de subproductos de almazara

La extracción fenólica de las muestras de orujo de almazara (*Or-Arb*) se llevó a cabo siguiendo las condiciones experimentales presentadas en el diseño de Box-Behnken (**Tabla 3.5**). Los extractos acuosos obtenidos se sometieron a un análisis tanto del contenido en fenoles totales, como de la capacidad antioxidante.

3.4.6.2. Fenólicos totales

El contenido total de compuestos fenólicos (FT) de las muestras se determinó a partir del método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi (1965), con ciertas modificaciones para ser adaptado al análisis en microplacas.

En cada pozo de la microplaca (NUNC, Thermo Scientific, Dinamarca) se depositaron 95 μL de agua destilada, 10 μL de la solución-muestra, seguidos de 5 μL del reactivo de Folin-Ciocalteu y 80 μL de Na_2CO_3 7,5 % (w/v). Para la incubación de

la mezcla durante 1 hora a 25 °C y la posterior lectura de su absorbancia a 725 nm, las microplacas se situaron en un espectrofotómetro UV/Vis (MultiSkan Spectrum, Thermo Scientific, Finlandia) (**Figura 3.16**). El contenido en fenoles totales se calculó a partir de una calibración con ácido cafeico (CA) (50-600 ppm). Todos los resultados se calcularon como la media de seis determinaciones, expresando los resultados en mg de ácido cafeico/kg de aceite de oliva.



Figura 3.16. Espectrofotómetro UV/Vis (MultiSkan Spectrum. Thermo Scientific

3.4.6.3. Perfil fenólico. HPLC

La identificación y cuantificación de los diferentes compuestos fenólicos presentes en las muestras de aceite de oliva se llevó a cabo mediante HPLC, utilizando un equipo HP1100 Series (Agilent Technologies, Palo Alto, CA), equipado con un sistema de bomba binario, un desgasificador, un muestreador automático, un conjunto de diodos UV/VIS (DAD) y un detector espectrofotómetro de masas (MSD, Mass Spectrometer Detector) (**Figura 3.17**). Para la separación de los compuestos fenólicos se utilizó una columna Luma C18 (Phenomenex, Torrance, CA) con un tamaño de partícula de 5 μm y 25 cm de longitud y 3 mm de espesor. Se utilizaron dos fases móviles para la cromatografía; por un lado se utilizó una mezcla agua/ácido fórmico (99,5:0,5 v/v) como fase móvil A, y acetonitrilo como fase móvil B. Ambas fases se filtraron con un filtro de nylon de 0,2 μm . El caudal de la fase móvil se fijó en 0,5 mL/min. Las longitudes de onda del detector ultravioleta se fijaron a 280 nm para los ácidos fenólicos, alcoholes y secoiridoides, y a 345 nm para los flavonoles. El volumen de inyección de muestra fue de 10 μL . Los análisis se llevaron a cabo a 30 °C. La evolución del gradiente de la fase móvil se llevó a cabo de acuerdo con el trabajo de Rotondi *et al.*, (2004). Los análisis de las masas se llevaron a cabo utilizando un ionizador en electrospray (API-ES), operando en negativo y usando las siguientes especificaciones: flujo de gas seco 9 L/min, presión de nebulización 50 psi, temperatura

del gas seco de 350 °C. Se realizaron cuatro repeticiones para cada muestra y los resultados se expresaron en mUA (área bajo el pico).



Figura 3.17. HPLC HP1100 Series.

La identificación y la cuantificación de los picos principales se realizó a través de un calibrado con los siguientes estándares externos: tirosol, hidroxitirosol, ácido galico, ácido p-cumárico, oleuropeina y apigenina. Los resultados se expresaron en mg analito/kg de aceite de oliva.

3.4.6.4. Capacidad Antioxidante

A la fracción polifenólica se le atribuye una importante capacidad antioxidante que incluye, desde un punto de vista químico, múltiples y muy diversos mecanismos de actuación. Debido a ello, ninguna metodología analítica es capaz por sí sola de cuantificarla, recomendándose siempre el uso de diferentes técnicas para determinar la capacidad antioxidante de las muestras de una forma más global (Pellegrini *et al.*, 2003).

En el presente trabajo se han considerado un total de tres técnicas espectrofotométricas ABTS, CUPRAC y FRAP, basadas en un mecanismo de transferencia de electrones. Para todas las determinaciones de capacidad antioxidante se utilizó un lector de microplacas MultisKan Spectrum UV/Vis (Thermo Scientific, Finlandia). Los resultados se calcularon como valor medio de seis determinaciones.

ABTS

La evaluación de la capacidad antioxidante mediante el método ABTS (*ácido 2,2'-Azinobis(3-etilBenzoTiazolina-6-Sulfónico)*) se basó en la metodología inicialmente

descrita por Re *et al.*, (1999), con ciertas modificaciones para adaptarla al análisis en microplacas (González-Centeno *et al.*, 2012). El radical ABTS[•] se preparó mezclando volúmenes equivalentes (1:1) de disoluciones acuosas de ABTS 7 mM y K₂S₂O₈ 2.45 mM. Dicha solución madre se dejó reaccionar durante 12 – 16 h a 23 ± 1 °C en oscuridad, para ser utilizada en las próximas 48 h, conservada bajo las mismas condiciones de temperatura y luminosidad. En el momento del análisis, 8 mL de la solución madre de ABTS se diluyeron con EtOH/H₂O (25:75, v/v) hasta un volumen final de 100 mL para obtener un reactivo ABTS con absorbancia de 1.00 ± 0.02 unidades a 734 nm.

Se incubaron las soluciones-muestra y el reactivo ABTS (190 µL en cada pocillo) en microplacas de 96 pocillos, a 25 °C durante 20 min. Posteriormente, se realizó una lectura de absorbancia del blanco de reactivo a 734 nm (A₀) y se procedió a iniciar la reacción (**Figura 3.18**) añadiendo 10 µL de la solución-muestra a cada pocillo. La mezcla se incubó a la misma temperatura durante 30 min, tras los cuales la disminución de la absorbancia se midió a la misma longitud de onda (A_f). Para el cálculo de la capacidad antioxidante, la diferencia entre las absorbancias A₀ y A_f se correlacionó con un calibrado de trolox (análogo hidrosoluble de la vitamina E), cuyas soluciones estándar se prepararon en el rango de concentración 0 – 0.8 mM (r² = 0.995), utilizando EtOH/H₂O (25:75, v/v) como disolvente.

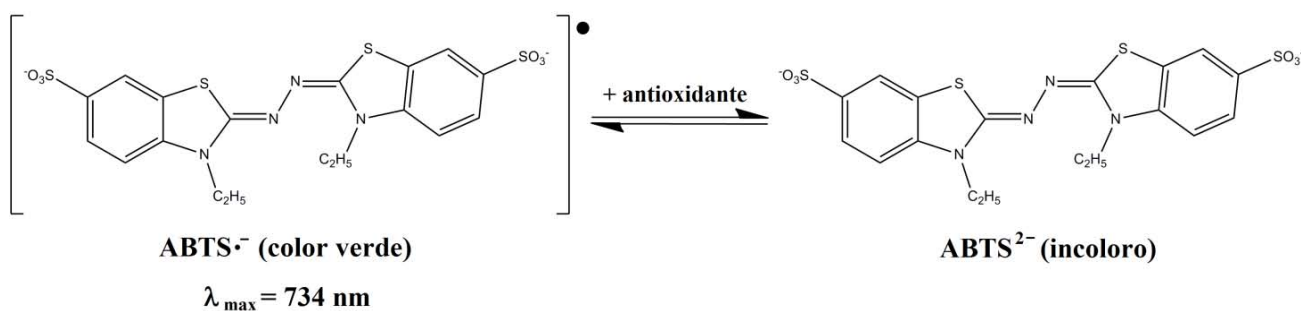


Figura 3.18. Principio químico del método ABTS (adaptado de Huang *et al.*, 2005).

CUPRAC

La medida de la capacidad antioxidante de las muestras a través del método CUPRAC (*CUPric Reducing Antioxidant Capacity*) se basó en una versión modificada del procedimiento experimental propuesto por Apak *et al.*, (2004) para su evaluación en microplacas (González-Centeno *et al.*, 2012). El reactivo CUPRAC se preparó el mismo día del análisis a partir de volúmenes equivalentes (1:1:1) de una disolución acuosa de

Cu (II) 10 mM, de una solución de neocuproína 7.5 mM en EtOH 96% y de tampón acetato de amonio (1 M, pH 7).

El protocolo y condiciones experimentales, así como los cálculos para la evaluación de la capacidad antioxidante a través del método CUPRAC, fueron los descritos para el caso del ABTS. No obstante, el incremento en la absorbancia se midió a 450 nm (**Figura 3.19**) y la calibración con trolox se preparó a concentraciones comprendidas entre 0 – 1.3 mM ($r^2 = 0.996$).

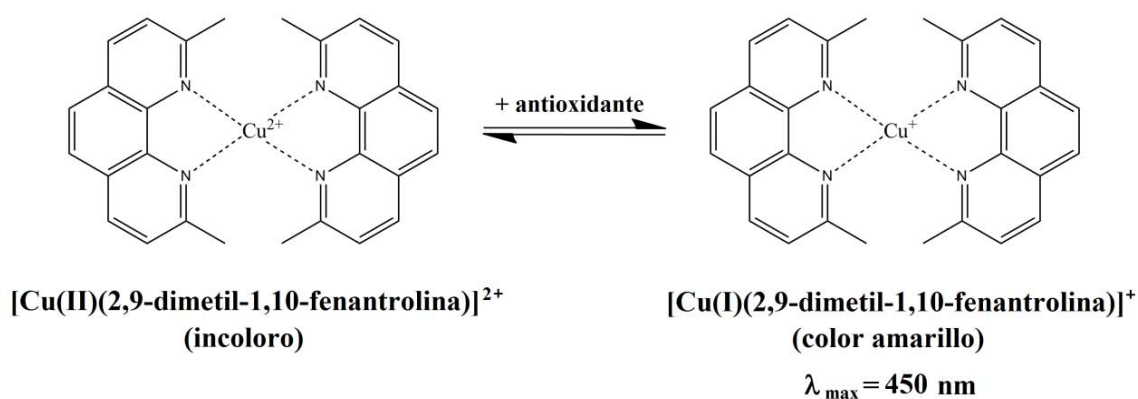


Figura 3.19. Principio químico del método CUPRAC (adaptado de Huang *et al.*, (2005).

FRAP

Para la determinación de la capacidad antioxidante mediante el método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) se modificó la versión original de (Benzie and Strain, 1996), también con el objetivo de adaptarla al análisis en microplacas (González-Centeno *et al.*, 2012).

El reactivo FRAP (**Figura 3.20**), preparado el mismo día del análisis, se obtuvo a partir de la mezcla de una solución de TPTZ 0.01 M en HCl 0,04 M, una disolución acuosa de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,02 M y otra de tampón acetato (pH 3,6, preparado con 3.1 g CH_3COONa y 16 mL de CH_3COOH glacial por 1 L de solución tampón) en un relación 1:1:10.

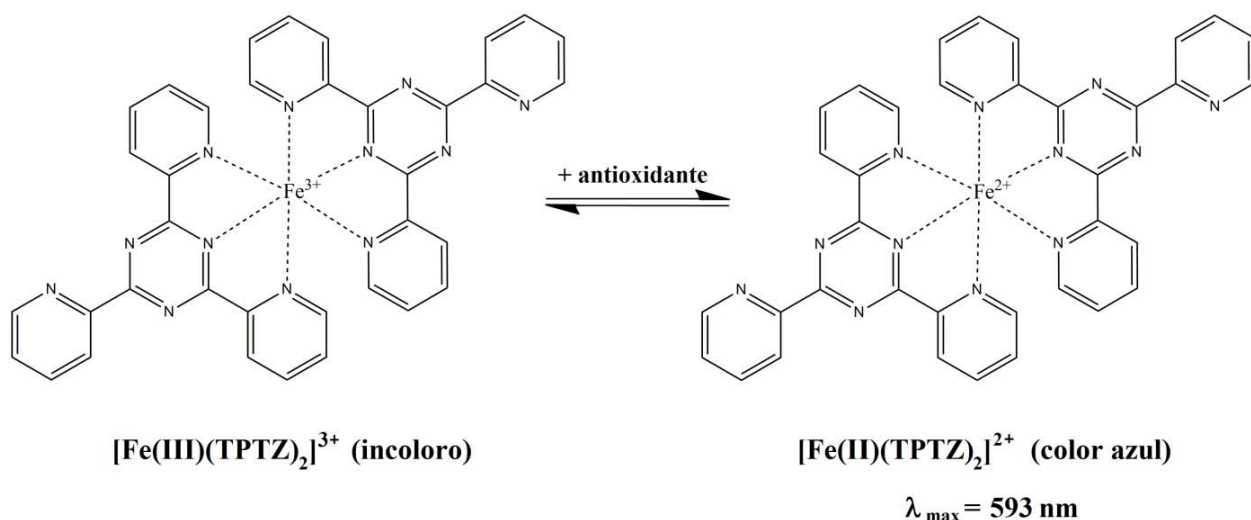


Figura 3.20. Principio químico del método FRAP (adaptado de Huang *et al.*(2005).

El protocolo y las condiciones experimentales, así como los cálculos para la evaluación de la capacidad antioxidante a través del método FRAP, fueron los mismos que para las técnicas ABTS y CUPRAC. Sin embargo, en este caso la longitud de onda utilizada para medir el incremento en la absorbancia fue de 593 nm y el calibrado de trólox se preparó en el rango de concentraciones comprendido entre 0 – 1.6 mM ($r^2 = 0.996$).

3.4.8. Análisis de textura y fertilidad de los suelos

Los análisis de textura y fertilidad del suelo se llevaron a cabo en el Instituto de Biología Animal de Baleares S.A. (IBABSA, Palma, Illes Balears, España) de acuerdo con los Métodos Oficiales de Análisis de Suelos y Aguas para Riego (MAPA, 1994). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

3.4.8.1. Textura

La textura del suelo viene definida por la proporción en que se encuentran distribuidas las partículas elementales que pueden constituir un sustrato, que según su tamaño o porosidad pueden clasificarse en tres grupos básicos: arenas ($0.050 < x < 2.000 \text{ mm}$), limos ($0.002 < x < 0.050 \text{ mm}$) y arcillas ($x < 0.002 \text{ mm}$) (USDA, 1999). En base a ello, se determinó el porcentaje de arenas, limos y arcillas de las muestras de suelo en estudio (**Figura 3.21**).

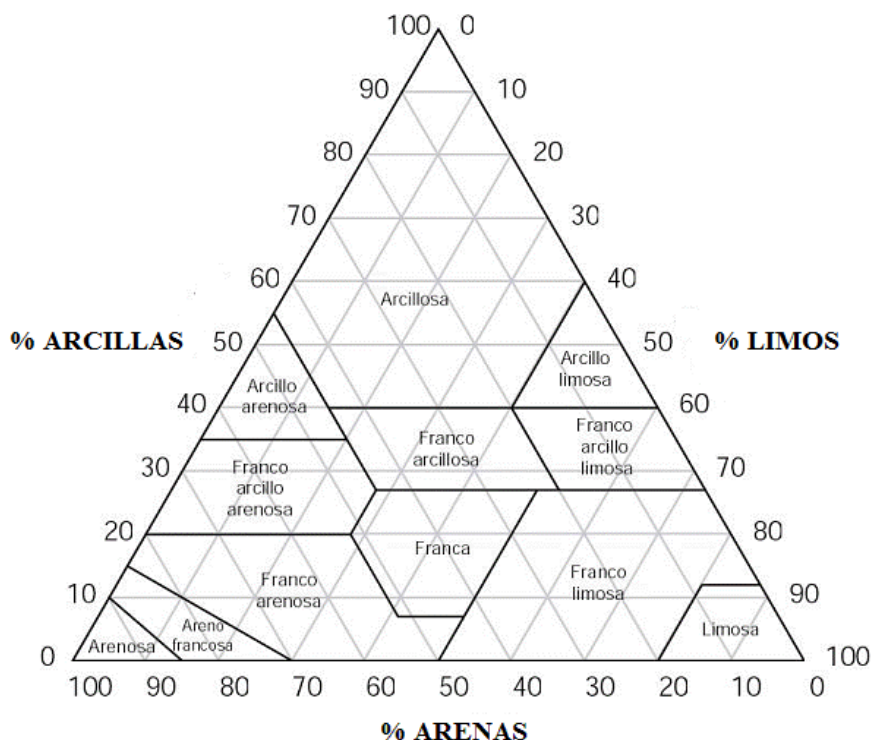


Figura 3.21. Textura del suelo. Clasificación USDA.

3.4.8.2. Fertilidad

Humedad

La humedad del sustrato se determinó gravimétricamente por desecación a 105 °C hasta peso constante (MAPA, 1994).

pH

El pH de las muestras de suelo se determinó con ayuda de un pH-metro (Crison, España) a partir de una relación suelo/H₂O 1:2.5 (w/v) (MAPA, 1994).

Conductividad

La determinación de la conductividad del suelo se llevó a cabo a 25 °C a partir de una relación suelo/H₂O 1:5 (w/v), expresando los resultados en dS/m (MAPA, 1994).

Materia orgánica oxidable

La materia orgánica oxidable del suelo se analizó mediante el método de Walkley-Black, consistente en una valoración de la muestra con sulfato ferroso (MAPA, 1994).

Nitrógeno total

Par la determinación del nitrógeno total (N_{total}) se utilizó el método Kjeldahl (MAPA, 1994).

Carbonatos y caliza activa

Tanto el contenido de carbonatos como el de caliza activa se determinaron mediante el calcímetro de Bernard (MAPA, 1994). Los resultados de ambos parámetros se presentaron como porcentajes (%).

Fósforo asimilable

El fósforo asimilable, íntimamente ligado a otros factores del suelo como el pH, la materia orgánica y la cal activa, se midió espectrofotométricamente de acuerdo con el método Olsen-Watanable (MAPA, 1994).

Potasio intercambiable

El potasio intercambiable se analizó mediante espectrometría de absorción atómica (MAPA, 1994).

3.5. Tratamiento estadístico

Todos los resultados experimentales se han presentado como la media \pm desviación estándar de las n mediciones realizadas. El estudio de la variabilidad de las muestras respecto a los diferentes parámetros analizados se llevó a cabo con la ayuda del paquete estadístico Minitab (versión 16.1.1, Minitab Inc. State. College, PA, EE.UU), se utilizaron los parámetros de los tests paramétricos ANOVA y Tukey para evaluar, respectivamente, la existencia de diferencias significativas. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

El análisis multivariable de los datos, comprendiendo un análisis de componentes principales (ACP) y un análisis discriminante (AD), se llevaron a cabo con el software Matlab (versión R2009a. The MathWorks Inc., EE.UU).

Por otra parte, para el análisis de datos, el cálculo de predicción de las respuestas, la representación gráfica y la modelización, en el estudio basado en la RSM, se utilizó el software STATISTICA (versión 7.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, EE.UU.). Los parámetros matemáticos de cada modelo se calcularon mediante un análisis de regresión a partir de los datos del BBD. Para determinar la calidad y capacidad de simulación del modelo se examinó la falta de ajuste (LOF), el coeficiente de determinación (r^2) y el valor del test de Fisher (F -value) proporcionado en el análisis de varianza (ANOVA). Tanto el modelo como los coeficientes de regresión se consideraron significativos cuando $p < 0.05$. Las condiciones óptimas de extracción, considerando los factores de respuesta tanto individualmente como de forma conjunta, se calcularon con ayuda del software Minitab (versión 16.1.1, Minitab Inc., State College, PA, EE.UU.).

Para evaluar la correlación entre los valores experimentales (X_{exp}) y los calculados por los modelos matemáticos propuestos (X_{calc}) y, consecuentemente, la calidad del ajuste de los mismos, se utilizaron los parámetros estadísticos ‘adequate precision’ (AP, ecuación [3.12]), error relativo medio (ERM, ecuación [3.13]) y/o porcentaje de varianza explicada (VAR, ecuación [3.14]) (Noordin *et al.*, 2004; Bas y Boyaci, 2007; Eim, 2012; González-Centeno, 2013):

$$[3.12] \quad AP = \frac{X_{calc}^{max} - X_{calc}^{min}}{\sqrt{\frac{P \cdot \sigma^2}{n}}} > 4$$

$$[3.13] \quad ERM = \frac{\sum_{i=1}^n \left(\frac{|X_{exp} - X_{calc}|}{X_{exp}} \right)}{n} \times 100$$

$$[3.14] \quad VAR = \left(1 - \frac{S_{exp}^2}{S_{calc}^2} \right) \times 100$$

Donde n es el número de experiencias; P es el número de términos estadísticamente significativos del modelo matemático (incluyendo la constante del modelo); σ^2 es el valor MS del residuo en el ANOVA; S_{exp} , la desviación estándar de los valores experimentales; y S_{calc} , la desviación estándar de los valores calculados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se presentan los resultados experimentales obtenidos en la presente tesis doctoral.

4.1. Influencia de la variedad, el grado de madurez y la procedencia geográfica de las aceitunas sobre la calidad del aceite de oliva producido

El objetivo de esta primera línea de trabajo fue estudiar la influencia de variables agronómicas tales como la variedad y el grado de maduración de las aceitunas, así como las características geoclimáticas de la plantación de olivos sobre los principales parámetros físico-químicos y sensoriales del aceite de oliva.

Para entender mejor el grado de significación de las variables mencionadas sobre la calidad del aceite de oliva, el estudio se ha realizado en dos etapas. En la primera de ellas se estudia la influencia de la variedad de aceituna y su grado de madurez sobre las características físico-químicas y sensoriales del aceite de oliva, mientras que en una segunda fase se evalúan los efectos agroclimáticos del olivar y el grado de madurez de las aceitunas sobre las características físico-químicas del aceite de oliva.

4.1.1. Influencia de la variedad y grado de madurez (RI)

Para la ejecución de dicho estudio, se utilizaron aceitunas de variedades *arbequina* (*Arb1*), *picual* (*Pic1*) y *empeltre* (*Emp1*) descritas en el apartado 3.1.2 de la sección materiales y métodos. Tanto los valores del RI, como las fechas de recolección de los frutos, así como los rendimientos de extracción del aceite obtenidos mediante el sistema Abencor, se muestran en la **Tabla 4.1**.

Los valores correspondientes al grado de maduración de las aceitunas presentaron valores similares para las tres variedades de aceituna, permitiendo la comparación entre resultados de los diferentes análisis realizados.

En relación con la evolución del rendimiento graso, se observó, en general, un aumento a lo largo de la maduración de la aceituna, con valores que van del 16,3% al 20,9% en el caso de la variedad *arbequina*, del 14,2% al 22,4% para la variedad *picual* y del 14,3% al 17,2% para la variedad *empeltre*.

Tabla 4.1. Contenido en aceite de las diferentes variedades de aceituna en función del grado de madurez

Código de muestra	Fecha de recolección	RI	Contenido en aceite (g/100 g aceituna)
<i>Arb1-RI1</i>	15/10/2012	1,31	16,34 ± 0,97b
<i>Arb1-RI2</i>	02/11/2012	2,27	17,31 ± 1,17b
<i>Arb1-RI3</i>	27/11/2012	5,07	20,91 ± 1,36a
<i>Pic1-RI1</i>	15/10/2012	1,01	14,21 ± 1,40b
<i>Pic1-RI2</i>	02/11/2012	2,14	16,25 ± 1,37b
<i>Pic1-RI3</i>	11/12/2012	5,13	22,37 ± 2,20a
<i>Emp1-RI1</i>	12/10/2012	1,14	14,32 ± 0,68c
<i>Emp1-RI2</i>	25/10/2012	2,93	15,26 ± 0,56b
<i>Emp1-RI3</i>	07/11/2012	5,54	17,16 ± 1,56a

Para cada variedad de aceituna, dentro de cada columna, las letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre variables

Son muchos los autores que han observado un aumento en el contenido graso de las aceitunas a medida que avanza el estado de maduración del fruto. La explicación más aceptada se basa en que a medida que la aceituna madura, coincidiendo con la pigmentación púrpura de las aceitunas, se produce una pérdida de humedad, traduciéndose en un incremento de su contenido graso (Benito *et al.*, 2009; 2013).

4.1.1.1. Parámetros de calidad

Los parámetros que permiten evaluar la calidad del aceite de oliva (grado de acidez (GA), índice de peróxidos (IP) y coeficientes de extinción específica K_{232} y K_{270}), vienen definidos y legislados mediante el Reglamento CEE 2568/91. En función del valor de dichos parámetros, el aceite de oliva se clasifica en aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva virgen o aceite de oliva lampante, siendo este último no comercializable.

Tal y como puede observarse en la **Tabla 4.2**, los valores de los parámetros de calidad obtenidos para las variedades estudiadas, permite que todos los aceites elaborados, excepto el aceite de la variedad *empeltre* en el estado de maduración RI-3, puedan clasificarse dentro de la categoría de aceite de oliva virgen extra (EVOO), de acuerdo con la normativa anteriormente mencionada.

Hay que destacar que los parámetros que definen la calidad del aceite de oliva no están relacionados con la variedad de aceituna. Sin embargo, se detectó una clara relación con el estado de la misma, así como con las buenas prácticas utilizadas durante el proceso de extracción del aceite de oliva.

Tabla 4.2. Parámetros de calidad de los diferentes aceites monovarietales en función del grado de madurez de las aceitunas.

	Índice de madurez			EVOO*
	RI-1	RI-2	RI-3	
GA (% C18:1)				$\leq 0,8\%$
<i>Arb1</i>	$0,18 \pm 0,01b$	$0,25 \pm 0,01a$	$0,23 \pm 0,01a$	
<i>Pic1</i>	$0,19 \pm 0,02a$	$0,22 \pm 0,03a$	$0,19 \pm 0,01a$	
<i>Emp1</i>	$0,36 \pm 0,03b$	$0,39 \pm 0,01b$	$0,55 \pm 0,03a$	
IP (meq O₂/kg aceite)				≤ 20
<i>Arb1</i>	$10,28 \pm 0,41a$	$3,39 \pm 0,28b$	$3,77 \pm 0,10b$	
<i>Pic1</i>	$6,22 \pm 0,73a$	$5,00 \pm 0,27a$	$6,34 \pm 1,05a$	
<i>Emp1</i>	$5,62 \pm 0,85c$	$7,14 \pm 0,24b$	$10,70 \pm 0,49a$	
K₂₃₂				$\leq 2,5$
<i>Arb1</i>	$1,60 \pm 0,17a$	$1,46 \pm 0,02a$	$1,85 \pm 0,13a$	
<i>Pic1</i>	$1,50 \pm 0,04b$	$1,69 \pm 0,00a$	$0,95 \pm 0,01c$	
<i>Emp1</i>	$1,68 \pm 0,12a$	$1,65 \pm 0,12a$	$1,81 \pm 0,03a$	
K₂₇₀				$\leq 0,22$
<i>Arb1</i>	$0,15 \pm 0,01b$	$0,11 \pm 0,01b$	$0,20 \pm 0,01a$	
<i>Pic1</i>	$0,10 \pm 0,01b$	$0,16 \pm 0,01a$	$0,08 \pm 0,00b$	
<i>Emp1</i>	$0,17 \pm 0,01b$	$0,22 \pm 0,02a$	$0,21 \pm 0,02a$	

Para cada variedad de aceituna, las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes grados de maduración.

*Valores máximos para la categoría aceite de oliva virgen extra (EVOO) según el reglamento (CEE) 2568/91.

a) Grado de Acidez (GA)

Gran parte de las propiedades del aceite de oliva y de los fenómenos que en él ocurren depende de su GA. De ahí que este parámetro sea comúnmente utilizado como indicador de calidad al estar directamente relacionado con el grado de deterioro oxidativo del aceite (Bendini *et al.*, 2009). Como se desprende de los resultados expuestos en la **Tabla 4.2**, independientemente del grado de madurez considerado, todos los aceites objeto de estudio presentaron valores inferiores al 0,8% ácido oleico.

Considerando el efecto del estado de maduración de las aceitunas, se observó como un ligero incremento del GA acompañó al proceso de maduración del fruto, excepto para la variedad *picual*, en la cual no se detectaron diferencias significativas entre los diferentes estados de maduración. Se considera que a medida que avanza el grado de madurez de la aceituna, se obtienen aceites con valores de GA más elevados como consecuencia del incremento de la actividad endógena de las lipasas, provocando daños en los tejidos de las aceitunas (Martínez *et al.*, 1973; Salvador *et al.*, 2001; Baccouri *et al.*, 2007). En este contexto, resultados similares fueron publicados por García *et al.*, (1996) quienes indicaron un aumento del GA en aceites de la variedad *arbequina*, a medida que aumentaba el ciclo de maduración del fruto. Este mismo comportamiento ha sido descrito por Gutiérrez *et al.*, (1999) y Salvador *et al.*, (2001) para las variedades *picual* y *hojiblanca*, respectivamente.

b) Índice de peróxidos (IP)

El IP, al igual que el GA, es un indicador del grado de oxidación del aceite de oliva. La primera oxidación de los lípidos da lugar a la aparición de los hidroperóxidos, los cuales son susceptibles a una posterior oxidación en otros componentes que pueden afectar al aroma y al sabor del aceite y, por tanto, a la calidad sensorial de los aceites de oliva (Bendini *et al.*, 2009).

Cabe destacar, que en todos los casos, los aceites se clasificaron dentro de la categoría virgen extra, con valores del IP inferiores a los 20 meq O₂/kg de aceite (Reglamento CEE 2568/91 y modificaciones). El hecho de que todos los valores estuvieran por debajo de los 11 meq O₂/kg de aceite, indica la existencia de un nivel de oxidación bajo en todas las muestras estudiadas.

La evolución de este parámetro en función del estado de madurez del fruto (**Tabla 4.2**) siguió tendencias dispares entre las diferentes variedades estudiadas. Por un lado, en los aceites procedentes de la variedad *picual* no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) a medida que avanzaba la madurez de la aceituna. En cambio, en el caso del aceite de la variedad *arbequina*, el IP disminuyó a medida que aumentaba el ciclo de maduración. Resultados similares han sido observados por investigadores como Baccouri *et al.* (2008), los cuales observaron una disminución del IP al final del proceso de maduración para la variedad *Chétoui*. Sin embargo, para el aceite de la variedad *empeltre*, la tendencia fue un aumento del IP conforme avanzaba el ciclo de maduración del fruto. En este sentido, Vekiari *et al.*, (2010) señalaron que la oxidación

se inicia en el fruto y aumenta lentamente durante la maduración. Este aumento puede ser atribuido al aumento de la actividad de la lipoxigenasa durante la maduración del fruto (Salvador *et al.*, 2001b).

c) Coeficiente de extinción específico K_{232}

La determinación del coeficiente de extinción específico K_{232} aporta información sobre la calidad del aceite de oliva, concretamente sobre la presencia de compuestos de oxidación primaria como peróxidos e hidroperóxidos y, a su vez, es un indicador de la conjugación de los ácidos grasos poli-insaturados (Benito *et al.*, 2013). La normativa europea (Reglamento (CEE) 2568/91) define como límite un valor igual o inferior a 2,5 para la categoría virgen extra. En la **Tabla 4.2** se observa que, independientemente del estado de madurez del fruto, todos los aceites estudiados presentaron valores muy inferiores al límite legislado.

La evolución del coeficiente K_{232} , en función del grado de madurez, presenta dos tendencias en función de las variedades de aceituna estudiadas, por una parte, los aceites procedentes de las variedades *arbequina* y *empeltre*, no presentaron cambios significativos ($p < 0,05$) entre los distintos grados de madurez, en cambio para la variedad *picual*, se observó una ligera disminución al final del ciclo de maduración de la aceituna (**Tabla 4.2**). En general, estos resultados están en consonancia con el estudio realizado por Rotondi *et al.*, (2004), en el cual no se observaron cambios significativos en el valor de K_{232} en aceites elaborados a partir de aceitunas de diferente grado de madurez (de un grado de maduración de 2,38 hasta 5,11) para la variedad italiana *Nostrana di Briseghella*. En un trabajo similar realizado por Youssef *et al.*, (2010), tampoco se observaron diferencias significativas en aceites elaborados a partir de la variedad *Chétoui* en estados de madurez de 1,48 hasta 5,47. Por otra parte, Jiménez *et al.*, (2013) describieron una ligera disminución a medida que avanzó el grado de madurez de las aceitunas para las variedades *picual* y *picudo*.

d) Coeficiente de extinción específico K_{270}

El coeficiente de extinción específico K_{270} , también aporta información sobre el estado de oxidación del aceite de oliva, pero en este caso se relaciona con la presencia de compuestos de oxidación secundaria, tales como aldehídos y cetonas (Benito *et al.*, 2013). Según la normativa vigente, dicho parámetro debe presentar un valor máximo de 0,22 para la categoría virgen extra (Reglamento CEE 2568/91).

Al igual que en el caso K_{232} , se observaron tendencias dispares entre variedades y grados de maduración (**Tabla 4.2**). Por una parte, no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre aceites procedentes de aceitunas verdes (RI-1) y maduras (RI-3) en la variedad *picual*. Sin embargo, se observó un ligero aumento ($p > 0,05$) en el caso de las variedades *arbequina* y *empeltre* a medida que avanzó la maduración de la aceituna. Llegando, en el caso del aceite procedente de aceitunas maduras de la variedad *empeltre* a rozar el límite para la categoría virgen extra. Según la bibliografía existe una gran disparidad en la evolución de dicho parámetro. Mientras García *et al.*, (1996) observaron un incremento del valor de K_{270} a medida que aumentaba el grado de madurez en la variedad *arbequina* del bajo Aragón. Rotondi *et al.*, (2004) no observaron diferencias significativas entre aceites procedentes de aceitunas verdes y maduras correspondientes a la variedad *Nostrana de Brisighella*. Además, Youssef *et al.*, (2010), observaron como el valor de K_{270} disminuía a medida que avanzaba el grado de madurez en aceites procedentes de aceitunas de la variedad *Chétoui*.

4.1.1.2. Perfil de ácidos grasos

Los ácidos grasos constituyen una de las fracciones más importantes de los lípidos saponificables. La composición de éstos está directamente relacionada con la vida útil del aceite de oliva y, presentan cierta influencia tanto varietal como con el grado de maduración de la aceituna (Aparicio *et al.*, 2002; Rotondi *et al.*, 2004; Benito *et al.*, 2013).

En este trabajo se identificaron los ácidos: palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3) y araquídico (C20:0) (**Tabla 4.3**). En general, los componentes mayoritarios fueron el ácido oleico, seguido del ácido palmítico, el ácido linoleico y, en menor proporción, los ácidos esteárico, palmitoleico y araquídico.

Tabla 4.3. Perfil de ácidos grasos de aceites elaborados a partir de aceitunas de las variedades *arbequina*, *picual* y *empeltre* en diferente estado de madurez.

Muestra	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	MUFA/PUFA
<i>Arb-RI1</i>	16,60 ± 0,01b	1,40 ± 0,01b	2,06 ± 0,00a	67,65 ± 0,03a	10,99 ± 0,01b	0,53 ± 0,00a	0,42 ± 0,01a	6,02
<i>Arb-RI2</i>	16,89 ± 0,04a	1,61 ± 0,00a	2,31 ± 0,00a	66,59 ± 0,12a	11,16 ± 0,02b	0,57 ± 0,00a	0,43 ± 0,00a	5,84
<i>Arb-RI3</i>	14,25 ± 0,04c	1,04 ± 0,03c	2,02 ± 0,17a	68,87 ± 1,81a	12,60 ± 0,33a	0,48 ± 0,03b	0,40 ± 0,06a	5,37
<i>Pic-RI1</i>	13,41 ± 0,15a	1,03 ± 0,01a	1,94 ± 0,92a	79,64 ± 0,73a	2,73 ± 0,02b	0,58 ± 0,01ab	0,38 ± 0,01b	24,46
<i>Pic-RI2</i>	12,28 ± 0,03a	1,05 ± 0,05a	3,57 ± 0,09a	78,87 ± 0,26a	2,86 ± 0,04b	0,67 ± 0,07a	0,45 ± 0,06a	22,74
<i>Pic-RI3</i>	11,45 ± 0,01b	0,79 ± 0,04b	3,14 ± 0,17a	80,26 ± 0,11a	3,18 ± 0,02a	0,53 ± 0,04b	0,42 ± 0,02ab	21,91
<i>Emp-RI1</i>	16,81 ± 0,01a	1,28 ± 0,00a	2,33 ± 0,00b	65,57 ± 0,01b	12,35 ± 0,00c	0,89 ± 0,00a	0,43 ± 0,00a	5,07
<i>Emp-RI2</i>	15,67 ± 0,01b	1,12 ± 0,00b	2,72 ± 0,00a	65,72 ± 0,02a	13,04 ± 0,01b	0,93 ± 0,00a	0,46 ± 0,00a	4,81
<i>Emp-RI3</i>	14,34 ± 0,04c	0,64 ± 0,05c	2,24 ± 0,02c	64,76 ± 0,01c	16,16 ± 0,03a	0,95 ± 0,04a	0,47 ± 0,02a	3,85

Los resultados se expresan en % del total de la fracción de ácidos grasos.. Para cada ácido graso, dentro de cada columna, letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras con diferente grado de madurez.

La evolución del perfil de ácidos grasos para las tres variedades estudiadas en función del grado de madurez de la aceituna se muestran en la **Tabla 4.3**. no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los porcentajes de ácidos grasos como el oleico, el estearico, el linolénico y el araquídico durante el proceso de maduración del fruto. Sin embargo, los ácidos grasos palmítico, palmitoleico y linoleico mostraron una influencia significativa con el grado de maduración. Resultados similares fueron observados por Youssef *et al.*, (2010) y Benito *et al.*, (2013) al estudiar el efecto del grado de maduración en aceites procedentes de la variedad *chétoui* y *arbequina*, respectivamente.

En el caso del ácido palmítico, se observó una clara disminución a medida que aumentó el índice de madurez de la aceituna. En la variedad *arbequina*, este disminuyó del 16,60% al 14,25%; en el caso del aceite de la variedad *picual*, varió del 13,41% al 11,45%; mientras que para la variedad *empeltre*, dicha disminución fue del 16,81% al 14,34%, para el RI1 y RI3, respectivamente. Gutiérrez *et al.*, (1999) explicó dicho descenso como un efecto de dilución del ácido palmítico. Concretamente, el porcentaje absoluto de ácido palmítico permanece constante, pero el contenido de ácidos grasos en el aceite aumenta como consecuencia de la activa biosíntesis de triglicéridos a medida que avanza el estado de madurez de la aceituna. En cuanto al ácido palmitoleico también se experimentó una disminución significativa ($p < 0,05$) a medida que avanzó el grado de madurez en todas la variedades estudiadas. Por otra parte, el ácido linoleico presentó un ligero aumento a medida que aumentó el grado de madurez del fruto, independientemente de la variedad estudiada. En general, estos resultados están en concordancia con otros trabajos, tales como los de Salvador *et al.*, (2001), Baccouri *et al.*, (2008), Oueslati *et al.*, (2009) y Benito *et al.*, (2013), en los cuales explican los cambios que experimentan los ácidos grasos, en función del grado de madurez, como consecuencia de la actividad enzimática de la enzima oleato desaturasa.

Otro parámetro interesante, que permite estudiar el efecto de la maduración de la aceituna sobre el perfil ácido del aceite de oliva, es la relación entre el contenido total de ácidos grasos mono- y poli-insaturados (MUFA/PUFA) (Youssef *et al.*, 2009). También es interesante, en algunos casos, evaluar la relación existente entre el ácido oleico y el ácido linoleico (C18:1/C18:2) (Rotondi *et al.*, 2004). De las tres variedades de aceituna estudiadas, independientemente de su índice de madurez, la variedad *picual* fue la que presentó los porcentajes más elevados de ácidos grasos mono-insaturados, así

como los valores más bajos de poli-insaturados, lo que se tradujo en la relación más elevada de MUFA/PUFA. Esto es debido principalmente a los altos porcentajes de ácido oleico, principal ácido graso que contribuye al sumatorio de mono-insaturados, y también a los valores más reducidos de los ácidos linoleico y linolénico, contribuyentes del sumatorio de ácidos poli-insaturados. Además, y por las mismas razones anteriormente indicadas, calculando el ratio MUFA/PUFA (**Tabla 4.3**) se detectó que la variedad *picual* presentó un ratio del orden de cuatro veces mayor que el obtenido para las variedades *arbequina* y *empeltre*, lo cual significa que el aceite procedente de la variedad *picual* presenta, una mayor estabilidad oxidativa en comparación con los aceites elaborados a partir de las variedades *arbequina* y *empeltre* (Youssef *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta el estado de madurez del fruto, se observó que la relación MUFA/PUFA disminuyó a medida que aumentó el grado de maduración del fruto. Este comportamiento podría explicarse a partir de la transformación del ácido oleico en ácido linoléico provocada por la actividad de la enzima desaturasa oleato (Gutiérrez *et al.*, 1999; Benito *et al.*, 2013).

4.1.1.3. Color

Las diferentes tonalidades de color de muchos alimentos son debidas a la presencia de diferentes pigmentos. En el caso del aceite de oliva, estos pigmentos son mayoritariamente carotenos y clorofilas (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1991; Meléndez-Martínez *et al.*, 2007; Moyano *et al.*, 2008), que pueden ser determinados mediante diferentes técnicas analíticas, especialmente cromatográficas, así como también mediante espectrofotometría en el visible. Las medidas de transmitancia y absorbancia permiten que el color sea cuantificado mediante el cálculo de las coordenadas colorimétricas del espacio CieLab (L^* , a^* , b^*) (Moyano *et al.*, 2008).

En la **Tabla 4.4** se reúnen los valores de las diferentes coordenadas de color correspondientes a los aceites de las diferentes variedades elaborados en función del grado de madurez de las aceitunas. Independientemente del estado de madurez del fruto, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes aceites, confirmando el carácter varietal del color (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1991).

Para una misma variedad de aceituna, a lo largo de su ciclo de maduración entre el estado verde (RI1) y el maduro (RI3), los aceites procedentes de las tres variedades objeto de estudio presentaron una disminución del parámetro L^* (**Tabla 4.4**). Así, para

aceites procedentes de la variedad *arbequina*, el valor medio de L* disminuyó de 92,8, para aceites elaborados a partir de aceitunas en estado verde, hasta 58,4 para aceites obtenidos a partir de aceitunas maduras. De igual forma, para la variedad *picual*, esta disminución fue de 90,07 a 71,87, y para la variedad *empeltre* de 91,21 a 70,66.

Según la bibliografía no existe una tendencia clara en la evolución de la coordenada L* a medida que avanza el estado de madurez de la aceituna. Mientras autores como Criado *et al.*, (2007), al estudiar dicha coordenada colorimétrica en aceite procedente de la variedad *arbequina*, observaron un incremento del orden de 24,8 unidades desde un aceite elaborado con aceitunas verdes a otro elaborado con aceitunas negras. Por otra parte, autores como Minguéz-Mosquera *et al.*, (1991) en estudios de la calidad del aceite de oliva en función del estado de madurez de las aceitunas, encontraron disminuciones o incrementos de la coordenada L* dependiendo de la variedad estudiada. En particular, observaron un aumento en 5 unidades para la variedad *hojiblanca* frente a disminuciones del orden de 1,5 unidades para aceites procedentes de la variedad *lechín*, a igual índice de madurez.

Tabla 4.4. Coordenadas de color (CieLab*) de aceites elaborados a partir de aceitunas de las variedades *arbequina*, *picual* y *empeltre* en diferente estado de madurez.

Muestra	L*	a*	b*	C*
Arb-RI-1	92,82 ± 0,35b;x	-9,26 ± 0,13b;x	79,18 ± 2,29a;x	79,72 ± 2,29a;x
Arb-RI-2	97,73 ± 0,46a;x	-8,98 ± 0,01b;y	59,39 ± 0,86b;y	60,07 ± 0,86b;y
Arb-RI-3	58,43 ± 1,12c;y	-4,02 ± 0,18a;y	27,66 ± 1,35c;y	27,94 ± 1,36c;y
Pic-RI-1	90,07 ± 0,21a;z	-11,12 ± 0,12c;z	77,87 ± 1,41a;x	78,66 ± 1,41a;x
Pic-RI-2	86,51 ± 0,04a;z	-5,50 ± 0,09b;x	56,84 ± 0,98b;y	57,10 ± 0,99b;y
Pic-RI-3	71,87 ± 1,67b;x	-4,15 ± 0,04a;y	45,28 ± 2,02c;x	45,48 ± 2,02c;x
Emp-RI-1	91,21 ± 0,09a;y	-10,41 ± 0,03c;y	78,10 ± 0,19a;x	78,78 ± 0,18a;x
Emp-RI-2	91,06 ± 1,07a;y	-9,25 ± 0,15b;y	77,92 ± 3,73a;x	78,47 ± 3,73a;x
Emp-RI-3	70,66 ± 0,63b;x	-3,09 ± 0,01a;x	26,33 ± 0,23b;y	26,51 ± 0,23b;y

a-c Diferentes letras para una misma variedad indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los aceites elaborados con aceitunas de diferente grado de madurez.

x-z Diferentes letras para un mismo grado de madurez indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre diferentes variedades de aceituna.

En cuanto a la evolución de la coordenada a*, se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) a medida que aumentó el estado de maduración de las aceitunas.

En concreto, para la variedad *arbequina*, la coordenada a^* aumentó desde -9,25, para el estado de madurez RI-1, a -4,02 para el grado de madurez RI-2, mientras que para la variedad *picual*, dicho aumento fue desde -11,12 a -4,15, y para la variedad *empeltre* desde -10,41 a -3,09. Dichos aumentos de la coordenada a^* se reflejaron en una disminución del color verde de los aceites. Otros autores han observado tendencias similares en aceites procedentes de la variedad *arbequina* al estudiar el efecto del grado de madurez de la aceituna (Criado *et al.*, 2007)

Al analizar la coordenada b^* , se detectó un descenso significativo de la misma a medida que avanzaba el grado de madurez del fruto. De modo que, para aceites procedentes de la variedad *arbequina* los valores medios disminuyeron desde 79,18, para el aceite elaborado a partir de aceitunas verdes, hasta valores de 27,66 para los obtenidos de aceitunas maduras; para la variedad *picual* este descenso fue desde 77,87 hasta 45,28 y para la variedad *empeltre* desde 79,10 hasta 26,33. Similares tendencias fueron citadas por Mínguez-Mosquera *et al.*, (1991) y Criado *et al.*, (2007). Los aceites elaborados a partir de frutos maduros presentaron tonalidades menos amarillentas que los aceites elaborados a partir de aceitunas verdes, lo cual implica una disminución del valor de la coordenada b^* .

Otro parámetro interesante, para estudiar la evolución del color es el croma (C^*) que determina la variación en la saturación de color. Teniendo en consideración los valores expuestos en la tabla **Tabla 4.4**, este parámetro presentó una disminución significativa ($p < 0,05$) en todas las variedades a medida que aumentaba el grado de madurez de las aceitunas. Esto se tradujo en una pérdida de saturación del color a medida que el aceite procedía de aceitunas más maduras, o lo que es lo mismo, aceites con colores menos intensos. Idénticos resultados fueron observados en el trabajo de Criado *et al.*, (2007), al estudiar el efecto de la maduración de la aceituna de la variedad *arbequina* sobre la calidad del aceite obtenido..

4.1.1.4. Compuestos fenólicos

La cantidad de compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen extra es un factor importante cuando se evalúa la calidad del mismo. La presencia de estos compuestos mejora la resistencia a la oxidación, siendo además los compuestos responsables del sabor amargo y picante del aceite (Bendini *et al.*, 2007; 2009).

a) Fenólicos totales (FT)

La presencia de antioxidantes naturales en el aceite de oliva modifica notablemente la resistencia que éste puede ofrecer al proceso de autooxidación. Dentro de estos antioxidantes naturales se encuentran los compuestos fenólicos.

En la **Figura 4.1** se muestra la evolución del contenido en FT en aceites elaborados a partir de aceitunas de diferentes variedades y en diferentes estados de madurez. Se observaron variaciones del contenido de FT en función del índice de madurez aunque sin mostrar una tendencia clara. Las variedades *arbequina* y *picual*, presentaron el valor más elevado de FT para grado de madurez RI2, después del cual se produjo una disminución para aceites elaborados con aceitunas más maduras (RI3). Diferentes autores han observado tendencias similares, aceites con índices de madurez intermedios presentaron un contenido en FT superior al de aceites elaborados con aceitunas más maduras, en este sentido cabe destacar los estudios de Salvador *et al.*, (2001) y el de Youssef *et al.*, (2009) en los cuales se observó esta misma tendencia al estudiar el efecto del estado de madurez de aceites de oliva, procedentes de las variedades *conicabra* y *chétoui*, sobre el contenido en FT.

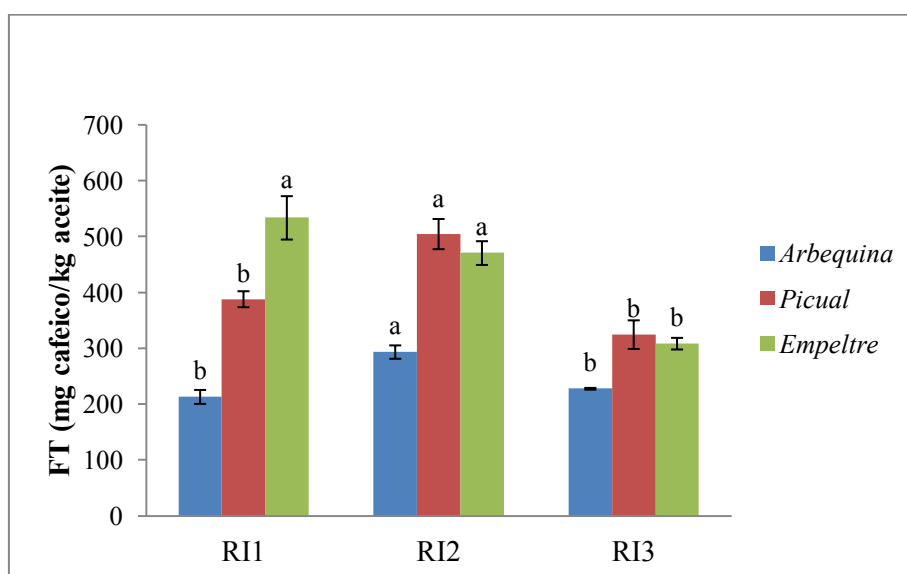


Figura 4.1. Fenólicos totales en aceites elaborados a partir de aceitunas de las variedades *arbequina*, *picual* y *empeltre* en diferente estado de madurez.

* Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre aceites elaborados con aceitunas de diferente grados de maduración.

En el caso de la variedad *empeltre*, se presenció un descenso del contenido en FT a medida que el aceite de oliva provenía de aceitunas más maduras, pasando de 530

ppm para las muestras elaboradas con aceitunas del grado RI1, hasta los 310 ppm para el aceite elaborado con aceitunas en el estado de madurez RI3. Estudios previos han descrito un descenso general del contenido en FT a medida que avanza la maduración de la aceituna. Por ejemplo, en el trabajo de Beltran *et al.*, (2005) se detectó un descenso aproximado del 20% en el contenido de FT a medida que el grado de madurez RI avanzó de 0,5 a 5,0 unidades para la variedad *hojiblanca*. Descensos del orden del 50 % en el contenido en FT también fueron observados en aceitunas de diferentes variedades tunecinas a medida que el índice RI avanzó de 1 a 6 unidades (Baccouri *et al.*, 2007).

b) Perfil fenólico

El análisis del perfil fenólico, llevado a cabo mediante HPLC-MS, mostró que los aceites de oliva virgen extra estudiados presentaron concentraciones altas en secoiridoides agliconas (SID) tales como la oleuropeína aglicona, los cuales derivan de la oleuropeína (Baccouri *et al.*, 2008; Ortega-García *et al.*, 2010), así como elevadas concentraciones en luteolina aglicona. En cambio, se detectaron bajos niveles de acoholes fenólicos, ácidos fenólicos y ácidos cináricos.

En la **Tabla 4.5** se muestran los perfiles fenólicos de los aceites de oliva elaborados con aceitunas de las variedades *arbequina*, *picual* y *empeltre* en diferentes estados de madurez.

Tomando en consideración la oleuropeína aglicona, la variedad *empeltre* fue la que presentó los niveles más elevados, sin que se observaran diferencias significativas en la concentración de este compuesto en los estados de madurez RI1 y RI2 pero sí un ligero descenso para las muestras RI3. El descenso en los niveles de SID al final del estado de madurez del fruto ha sido observado por otros autores; Rotondi *et al.*, (2004) y Baccouri *et al.*, (2008) para la variedades italianas *Nostrana di Brisighella* y *chemlali*, respectivamente. Estos autores atribuyeron la degradación de la oleuropeína a la enzima esterasa. La oleuropeína es el principal compuesto fenólico presente en la aceituna sin madurar, y su degradación conduce a la formación de otros compuestos tanto de naturaleza fenólica como no-fenólica (Amiot *et al.*, 1986).

Tabla 4.5. Perfil fenólico de aceites de oliva elaborados a partir de aceitunas de las variedades *arbequina*, *picual* y *empeltre* en diferente estado de madurez

Compuestos fenólicos										
	Hidroxitirosol ^a	Tirosol ^b	ácido cafeico ^c	<i>p</i> -Coumárico ^d	Oleuropeína ^e	Oleuropeína aglicona ^e	Luteolina ^f	Pinoresinol ^g	Luteolina aglicona ^e	Apigenina ^f
<i>Arbequina</i>										
RI1	1,53 ± 0,01c	1,86 ± 0,03b	0,35 ± 0,01a	0,27 ± 0,05a	8,31 ± 1,01a	237,34 ± 6,17b	7,51 ± 0,49a	37,37 ± 3,82a	156,62 ± 6,01a	3,35 ± 0,04a
RI2	7,26 ± 0,70b	1,92 ± 0,56b	0,23 ± 0,10a	0,19 ± 0,08a	9,04 ± 0,77a	328,46 ± 12,44a	7,83 ± 0,04a	27,25 ± 3,56b	74,17 ± 8,05b	2,06 ± 0,01b
RI3	26,63 ± 1,27a	11,79 ± 1,64a	0,30 ± 0,01a	nd ± 0,00a	10,48 ± 3,81a	172,84 ± 9,13c	9,75 ± 0,46a	31,24 ± 1,56b	127,94 ± 6,96a	3,12 ± 0,19a
<i>Picual</i>										
RI1	2,97 ± 0,53b	3,06 ± 0,26a	0,37 ± 0,09a	0,50 ± 0,03a	19,09 ± 1,33b	286,16 ± 16,67b	4,88 ± 0,21a	88,41 ± 9,56b	124,77 ± 7,88a	6,26 ± 0,85a
RI2	4,99 ± 0,05a	3,42 ± 0,16a	0,16 ± 0,05b	0,05 ± 0,04b	88,53 ± 9,42a	424,19 ± 22,29a	6,50 ± 3,56a	152,66 ± 10,74a	158,70 ± 5,53a	2,01 ± 1,27b
RI3	2,19 ± 0,28b	2,54 ± 0,16a	0,16 ± 0,04b	0,05 ± 0,02b	20,27 ± 0,90b	310,16 ± 19,74ab	5,58 ± 0,05a	69,63 ± 1,73b	85,00 ± 5,58b	2,04 ± 0,10b
<i>Empeltre</i>										
RI1	3,38 ± 0,05a	3,64 ± 0,32a	0,29 ± 0,03b	0,00 ± 0,03a	158,45 ± 19,34a	567,76 ± 34,99a	9,82 ± 1,70a	101,10 ± 7,57a	352,81 ± 13,79a	8,06 ± 1,27a
RI2	3,98 ± 0,48a	3,24 ± 0,27a	nd ± 0,00c	nd ± 0,00a	146,90 ± 16,95a	537,27 ± 23,97a	4,00 ± 0,16b	108,45 ± 6,11a	135,50 ± 11,13b	3,88 ± 0,23b
RI3	1,24 ± 0,10c	3,91 ± 0,10a	0,48 ± 0,02a	0,04 ± 0,00a	89,71 ± 8,36b	414,58 ± 26,16b	3,07 ± 0,69b	46,00 ± 0,66b	150,30 ± 0,36b	2,13 ± 0,37c

^a mg de hidroxitirosol / kg aceite (280 nm); ^b mg tirosol / kg aceite (280 nm); ^c mg ácido cafeico/kg aceite (330 nm); ^d *p*-coumarico/kg aceite (330 nm); ^e mg oleuropeína/kg aceite (280 nm); ^f mg apigenina/kg aceite (454 nm); ^g mg pinoresinol/kg aceite (280 nm). nd = no detectado.

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre aceites de una misma variedad elaborados con aceitunas de diferente grado de madurez

Los aceites de las variedades *arbequina* y *picual* manifestaron un incremento en la concentración de oleuropeína aglicona desde el primer al segundo grado de madurez, observando un máximo en el estado de madurez RI2, con valores medios de 328,48 y 424,29 mg oleuropeína/kg aceite para las variedades *arbequina* y *picual*, respectivamente. Para el aceite de estas variedades, correspondiente al estado de madurez RI3, se observó una disminución en la concentración de este compuesto. Este comportamiento ha sido observado por Baccouri *et al.*, (2008), quienes observaron un incremento en el contenido de oleuropeína aglicona en aceites procedentes de la variedad *chétoui*, a medida que el grado de madurez aumentó de 0,5 a 4,9 unidades, a partir del cual, presentaron una clara disminución de la concentración de oleuropeína aglicona.

Otro compuesto importante presente en los aceites de oliva estudiados fue la Luteolina aglicona,. Tal y como puede observarse, para las variedades *picual* y *empeltre*, este compuesto experimentó un descenso a medida que el aceite provenía de aceitunas más maduras, sin embargo para el aceite procedente de la variedad *arbequina*, no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los estados de madurez RI1 y RI3 (**Tabla 4.5**)

Los compuestos derivados de un monofenol tales como el tirosol y el hidroxitirosol, presentaron diferentes tendencias en función de la variedad de aceituna estudiada. En el caso de la variedad *arbequina*, experimento un incremento progresivo en la concentración de hidroxitirosol a medida que el grado de madurez de las aceitunas aumentaba. Por su parte, en el caso del tirosol, no se evidenciaron diferencias significativas entre los aceites procedentes de aceitunas en los estados de madurez RI1 y RI2. Sin embargo, se observó un aumento de este último compuesto en aceites elaborados con aceitunas más maduras (RI3). La explicación más extendida sobre el aumento de este tipo de compuestos, a medida que avanza el estado de madurez de las aceitunas, se basa en el aumento de la degradación e hidrólisis de los compuestos polifenólicos. Baccouri *et al.*, (2008) detectó la misma tendencia al estudiar el efecto de la maduración de la aceituna (RI 0,5 – 5,5) sobre la calidad del aceite de oliva procedente de las variedades *chétoui* y *chemlali*. No obstante, las variedades *picual* y *empeltre* no presentaron el mismo comportamiento (**Tabla 4.5**). La variedad *picual* no exhibió diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los estados de madurez RI1 y RI3 en las concentraciones de hidroxitirosol y tirosol. Para la variedad *empeltre*, la

concentración de hidroxitirosol permaneció prácticamente constante en los estados de madurez RI1 y RI2, mientras que para el estado RI3 se produjo un significativo descenso; por su parte, el tirosol, no se exhibió diferencias significativas entre los tres grados de madurez analizados.

En el caso de los flavonoles se determinaron la luteolina y la apigenina (**Tabla 4.5**). La luteolina, no mostró diferencias significativas a medida que avanzó el grado de madurez de las aceitunas en las variedades *arbequina* y *picual*, sin embargo para la variedad *empeltre*, sí se observó un descenso significativo ($p < 0,05$) desde el estado de madurez RI1 al RI2, permaneciendo casi constante hasta el final del estudio. En el caso de la apigenina, no se observaron diferencias significativas entre los estados de madurez RI1 y RI3 para la variedad *arbequina*, y sí un descenso significativo a medida que el aceite procedía de aceitunas más maduras para las variedades *picual* y *empeltre*.

4.1.1.5. Capacidad antioxidante

Debido a los múltiples y variados mecanismos y a la gran variedad de compuestos químicos implicados en la capacidad antioxidante de una muestra de origen vegetal, ninguna metodología analítica es capaz de determinar dicho potencial en su totalidad (Antolovich *et al.*, 2002; González-Centeno *et al.*, 2012). Por ello y con el objeto de proporcionar una visión más global de la capacidad antioxidante de los diferentes aceites en función del estado de madurez de la aceituna, se utilizaron tres técnicas analíticas para su evaluación; en concreto los métodos ABTS, CUPRAC y FRAP.

Los resultados experimentales obtenidos correspondiente a la capacidad antioxidante medida con las diferentes metodologías de los aceites objeto de estudio se presentan en la **Tabla 4.6**.

a) ABTS

Para los aceites obtenidos a partir de las aceitunas de las variedades *arbequina* y *picual*, la capacidad antioxidante medida mediante el método ABTS, presentó su valor más elevado para el estado de madurez RI2 con valores medios de 298,15 y 418,01 mM trolox/kg aceite para las variedades *arbequina* y *picual*, respectivamente (**Tabla 4.6**). De forma análoga a lo observado con los FT, se produjo un descenso en la capacidad antioxidante (ABTS) para el aceite elaborado con aceitunas más maduras, exhibiendo valores de 228,2 mM de trolox/kg aceite en el caso de la variedad *arbequina* (*Arb-RI3*) y de 295,0 mM trolox/kg aceite para la variedad *picual* (*Pic-RI3*). En el caso de la

variedad *empeltre*, no se observaron diferencias significativas entre los estados de madurez RI1 y RI2. En cambio, al igual que ocurrió en el caso de los FT, se observó un ligero descenso en el estado de madurez RI3. En general, el aceite de la variedad *empeltre* fue el que presentó, en todo momento, los valores más elevados de la capacidad antioxidante determinada según el método ABTS, independientemente del estado de madurez de las aceitunas.

b) CUPRAC

Los resultados de la capacidad antioxidante de los diferentes aceites determinada según el método CUPRAC (**Tabla 4.6**) siguieron un comportamiento muy similar al descrito para el método ABTS. Los aceites de las variedades *arbequina* y *picual* presentaron un pico en la capacidad antioxidante para el estado de madurez RI2, mientras que la variedad *empeltre*, no presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) en los dos primeros estados de madurez estudiados (RI1 y RI2), y un ligero descenso en el aceite procedente de aceitunas maduras (RI3).

Tabla 4.6. Capacidad antioxidante de aceites de oliva elaborados a partir de aceitunas de las variedades *arbequina*, *picual* y *empeltre* en diferente estado de madurez.

Muestra	Grado de madurez		
	RI-1	RI-2	RI-3
<i>Arbequina</i>			
ABTS	224,81 ± 10,15b	298,15 ± 10,10a	228,18 ± 0,17b
CUPRAC	548,72 ± 29,80b	598,53 ± 21,76a	564,19 ± 9,80b
FRAP	162,41 ± 28,69a	176,99 ± 18,47a	153,69 ± 22,86a
<i>Picual</i>			
ABTS	280,73 ± 14,13b	419,01 ± 43,89a	295,00 ± 0,17b
CUPRAC	788,43 ± 66,60b	1254,91 ± 109,08a	830,27 ± 46,19b
FRAP	241,31 ± 9,34a	369,37 ± 33,23b	213,25 ± 30,09a
<i>Empeltre</i>			
ABTS	504,91 ± 10,76a	483,11 ± 42,70a	353,53 ± 18,59b
CUPRAC	1593,71 ± 33,10a	1551,85 ± 83,04a	951,58 ± 23,94b
FRAP	341,28 ± 29,06b	448,15 ± 27,09a	205,55 ± 8,70c

Capacidad Antioxidante expresada por mM trolox/kg aceite. Para una misma variedad, diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grados de maduración

c) FRAP

Los aceites de la variedad *arbequina*, no mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los valores de la capacidad antioxidante determinada mediante el método FRAP (Tabla 4.6). Sin embargo, las variedades *picual* y *empeltre*, presentaron un aumento significativo ($p < 0,05$) en los valores de capacidad antioxidante desde el primer al segundo estado de madurez considerado. A partir del RI2 se observó un descenso en la capacidad antioxidante de los aceites procedentes de aceitunas maduras (RI3). Al igual que en el caso del método ABTS y CUPRAC, los aceites procedentes de la variedad *empeltre*, fueron los que presentaron mayores valores de capacidad antioxidante, determinada mediante el método de FRAP, independientemente del estado de madurez de las aceitunas.

4.1.1.6. Estabilidad oxidativa

La determinación de la estabilidad oxidativa de los aceites es una determinación muy importante, ya que, a pesar de no ser considerado como un parámetro de calidad, proporciona información muy valiosa sobre la vida útil del aceite. La estabilidad oxidativa se evalúa mediante el tiempo de inducción (es decir, el período de tiempo hasta que el aceite alcanza el punto crítico de oxidación) que se corresponde con una degradación sensorial del aceite como consecuencia de una aceleración repentina del proceso oxidativo (Martínez-Nieto *et al.*, 2010). La medida de la estabilidad oxidativa se realiza por el método de Rancimat, que nos indica la resistencia del producto para iniciar el proceso de oxidación, producido mediante reacciones que transcurren por un mecanismo de radicales libres (Aparicio *et al.*, 1999).

La resistencia al deterioro oxidativo se atribuye principalmente a dos factores: (a) la composición en ácidos grasos, que en el caso del aceite de oliva, se caracteriza por una elevada cantidad de ácidos grasos monoinsaturados (Aparicio *et al.*, 1999; Salvador *et al.*, 1999), y (b) a la mezcla de compuestos de elevada actividad antioxidante que está constituida principalmente por tocoferoles y polifenoles, aunque también son importantes las clorofilas y los carotenos (Bendini *et al.*, 2007; Martínez-Nieto *et al.*, 2010).

A consecuencia de la relación directa entre la estabilidad oxidativa, el contenido en compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante, las muestras analizadas en este estudio presentaron una tendencia o evolución similar a la observada en el caso de los

FT. En la **Figura 4.2**, se muestra la evolución de la estabilidad oxidativa de los diferentes aceites procedentes de distintas variedades y en función del estado de madurez de éstas.

La variedad *arbequina*, tal y como era de esperar, según su contenido en FT y su capacidad antioxidante, fue la variedad que presentó menor estabilidad oxidativa en comparación con las variedades *picual* y *empeltre*, independientemente del grado de madurez considerado (**Figura 4.2**). Al igual que en el caso de los FT, el aceite procedente de aceitunas semimaduras (RI2) fue el que presentó el valor más elevado de estabilidad oxidativa situándose en torno a las 70 h (**Figura 4.2**), disminuyendo hasta las 60 h en el estado de madurez más avanzado (RI3). La variedad *picual*, exhibió una tendencia similar a la variedad *arbequina*, observándose un aumento desde 125,5 h en el estado de madurez RI1 hasta las 141,8 h para el estado de madurez RI2. A partir del cual no presentó cambios significativos ($p < 0,05$) cuando aumento el grado de madurez (RI3).

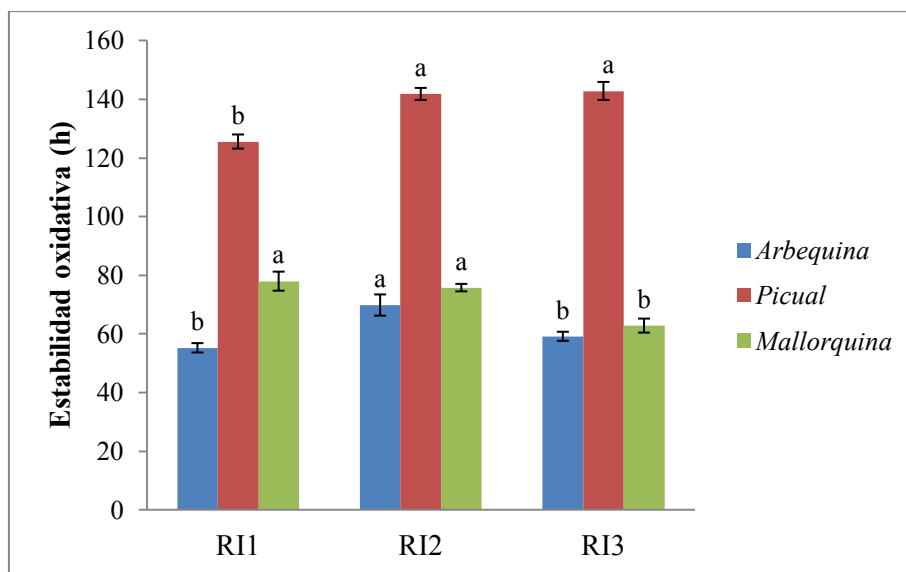


Figura 4.2. Estabilidad oxidativa de aceites de oliva elaborados a partir de aceitunas de las variedades *arbequina*, *picual* y *empeltre* en diferente estado de madurez

Para cada variedad de aceituna las letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los aceites correspondientes a los diferentes grados de maduración.

Resultados similares fueron publicados por Baccouri *et al.*, (2008) y Youssef *et al.*, (2009) al estudiar el efecto de la maduración sobre la calidad del aceite de la variedad *chétoui*, observando un pico en la estabilidad oxidativa cuando el aceite

provenía de aceitunas cuyo grado de madurez estaba comprendido entre las 3 y las 4 unidades.

La variedad *empeltre*, no mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los estados de maduración RI1 y RI2, con valores de 77,9 h y 76,8 h, respectivamente. Sin embargo sí se apreció un ligero descenso para el estado RI3 con un valor de 62,8 h. Otros autores han observado esta tendencia en la estabilidad oxidativa en función del grado de madurez en aceites de las variedades *lechin* y *blanqueta*, para las cuales, la estabilidad permaneció constante hasta la etapa en envero (mitad verde-mitad morada) y a partir de ésta, la estabilidad oxidativa de los aceites procedentes de aceitunas más maduras fue disminuyendo (García *et al.*, 1996).

4.1.1.7. Análisis sensorial

El panel de cata elaboró un análisis descriptivo para cada uno de los aceites elaborados, detallando no solo la intensidad de los diferentes atributos positivos, sino también los posibles defectos sensoriales.

La puntuación media del análisis organoléptico, referente a los atributos positivos, fue elaborado siguiendo el Reglamento (CEE) 640/2008. Los valores de dichos análisis se reflejan en las **Figuras 4.3, 4.4 y 4.5** para las variedades *arbequina*, *picual* y *empeltre*, respectivamente.

Los gráficos revelaron que los aceites extraídos de aceitunas recolectadas en el estado de maduración RI1, son los que presentan, en general, niveles más elevados de los atributos frutado, verde hoja, amargo y picante. Además, estos atributos son, a su vez, los que presentan una mayor variabilidad en cuanto a su intensidad en función del estado de madurez de las aceitunas.

a) Variedad arbequina

Para la variedad *arbequina* (**Figura 4.3**), destacó por el atributo *frutado* con el valor más elevado del conjunto de todos los atributos positivos. Sole *et al.*, (1997), afirman que el *frutado* es el atributo que más influye en la puntuación final de las muestras. No se observaron diferencias significativas en la intensidad del *frutado* a medida que avanzó el grado de maduración de los frutos, obteniendo valores de intensidad de $5,8 \pm 0,3$ para el grado de madurez RI1, $4,8 \pm 0,4$ para el estado de madurez RI2 y $5,4 \pm 0,1$ para el estado de RI3. En otros trabajos se ha demostrado como

este atributo perdía intensidad a medida que aumentaba el grado de madurez de las aceitunas de variedades como *Nostrana di Brisighella* (Rotondi *et al.*, 2004) o *arbequina* (Benito *et al.*, 2013).

El atributo *verde hoja* presentó una tendencia similar y no se observaron diferencias entre los diferentes estados de maduración del fruto. Los valores oscilaron entre $3,9 \pm 0,4$ para el estado de madurez RI1 y $3,3 \pm 0,3$ para el estado de madurez RI3.

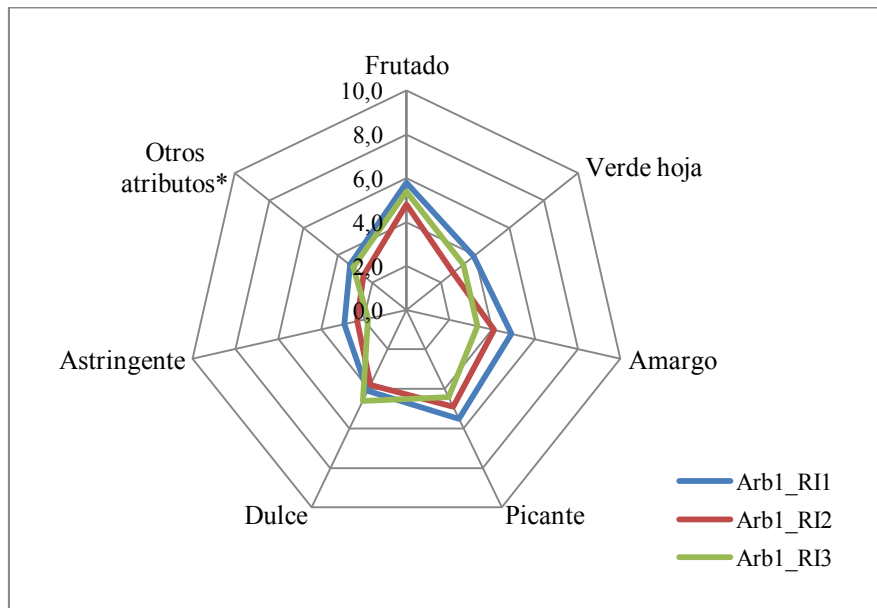


Figura 4.3. Evolución de los atributos positivos de los aceites elaborados a partir de aceitunas de la variedad *arbequina* de diferentes grado de madurez.

*Alcachofa, almendra, nueces, tomatara e hinojo.

La variedad *arbequina* presentó una disminución en la intensidad del atributo *amargo* a medida que avanzó el estado de madurez de la aceituna, con valores de $4,9 \pm 0,3$ para el aceite procedente de aceituna verdes (RI1), de $4,1 \pm 0,1$ para aceitunas en envero (RI2) y de $3,3 \pm 0,3$ para aceitunas maduras (RI3). Esta misma tendencia ha sido observada por otros autores en el estudio de la evolución de los atributos sensoriales de aceites elaborados a partir de la variedad Italiana *Nostrana di Brisighella*, en función de su estado del madurez (Rotondi *et al.*, 2004). Hermoso *et al.*, (1991) y Beltran *et al.*, (2007), observaron como los atributos positivos de los aceites se ven fuertemente influenciados por el estado de maduración del fruto, obteniéndose aceites menos amargos ó más dulces cuando éstos proceden de frutos más maduros, disminuyendo los valores medios del atributo amargo durante el proceso de maduración.

El atributo *picante* presentó una tendencia similar con valores de $5,5 \pm 0,2$; $4,9 \pm 0,2$ y $4,4 \pm 0,1$ para las muestras *Arb1-RI1*, *Arb1-RI2* y *Arb1-RI3*, respectivamente.

Varios autores han relacionado los atributos *amargo* y *picante* con la presencia de compuestos fenólicos. Estas sensaciones pueden persistir en boca largos períodos de tiempo después de la degustación, mostrando un claro efecto varietal en términos de intensidad y persistencia (Servilli *et al.*, 2002; Bendini *et al.*, 2009; Benito *et al.*, 2013).

El atributo *dulce* siguió una evolución inversa a los atributos *frutado*, *amargo* y *picante*. A medida que disminuyó la intensidad de estos atributos, aumentó la sensación de dulzor en el aceite de oliva (**Figura 4.3**). Para la variedad *arbequina*, el atributo *dulce* aumentó desde $3,8 \pm 0,4$ para el estado de maduración RI2, hasta $4,6 \pm 0,2$ para el estado de maduración RI3.

En el caso del atributo *astringencia*, a diferencia del atributo dulce, se observó un ligero descenso en su intensidad a medida que el aceite fue elaborado a partir de aceitunas más maduras. La intensidad de este atributo varió desde $2,9 \pm 0,4$ para el aceite *Arb-RI1* hasta $1,8 \pm 0,2$ para el aceite *Arb-RI3*.

Además de los atributos descritos en el Reglamento CEE 640/2008, la variedad *arbequina*, manifestó *otros atributos* que recordaban a la alcachofa, la almendra, las nueces, la tomatera o el hinojo. En este caso, no se observaron diferencias significativas con el aumento del grado de madurez de las aceitunas.

Finalmente, cabe destacar que en ninguno de los aceites analizados de la variedad *arbequina* se detectó defecto organoléptico alguno, haciendo posible, siguiendo este criterio, la clasificación del aceite como aceite de oliva virgen extra (CEE 2568/91).

b) Variedad picual

La evolución del análisis sensorial de los diferentes aceites procedentes de aceitunas de la variedad *picual* en distintos estados de madurez se exponen en la **Figura 4.4**.

El atributo positivo predominante, al igual que para la variedad *arbequina*, fue el *frutado* con intensidades medias próximas a 6,8, sin apreciarse diferencias significativas entre los aceites correspondientes a los diferentes estados de madurez de las aceitunas.

Otros atributos relevantes de los aceites de la variedad *picual*, fueron el *amargo* y el *picante*. El atributo *amargo* manifestó una tendencia similar al comportamiento de los

FT en función del estado de madurez de las aceitunas; observándose un incremento en su intensidad desde el aceite extraído a partir de aceitunas verdes (*Pic1-RI1*) hasta los elaborados a partir de aceitunas más maduras (*Pic1-RI2* y *Pic1-RI3*), las cuales no mostraron diferencias significativas entre ellos. El atributo *picante*, tal y como puede apreciarse en la **Figura 4.4**, no reflejó diferencias significativas entre las intensidades de los aceites en avanzado grado de madurez RI1 y RI2, y sí una discreta disminución en los obtenidos con aceitunas maduras (RI3).

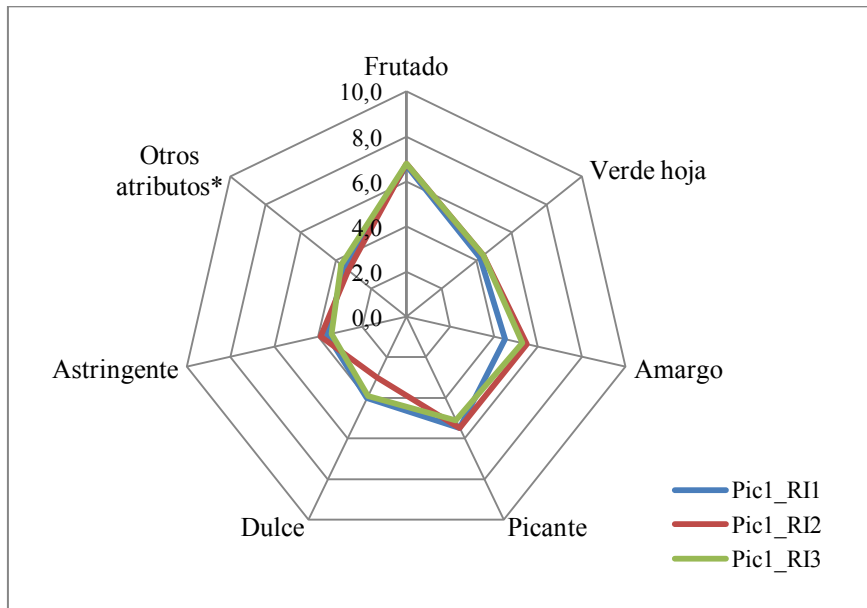


Figura 4.4. Evolución de los atributos positivos de aceites de la variedad picual elaborados a partir de aceitunas de diferente grado de madurez.

**alcachofa, tomatera, almendra, almendra verde, nueces y menta.*

El atributo positivo *dulce*, al igual que en el caso de la variedad *arbequina*, mostró una tendencia inversa a la del atributo *amargo*, siendo el aceite con el contenido de FT más elevado *Pic1-RI2*, el que presentó una menor intensidad de dicho atributo.

Para los atributos *verde hoja*, *astringente* y *otros atributos*, no se observaron diferencias significativas a medida que avanzó el estado de madurez de las aceitunas.

Finalmente, e igual que en el caso de la variedad *arbequina*, tampoco se detectaron defectos organolépticos en ninguno de los aceites estudiados, pudiéndose clasificar todos los aceites de la variedad *picual* dentro de la categoría virgen extra.

c) *Variedad empeltre*

La evolución del análisis sensorial de los aceites elaborados a partir de las aceitunas de la variedad *empeltre*, en función del estado de madurez de los frutos, se expone en la **Figura 4.5**.

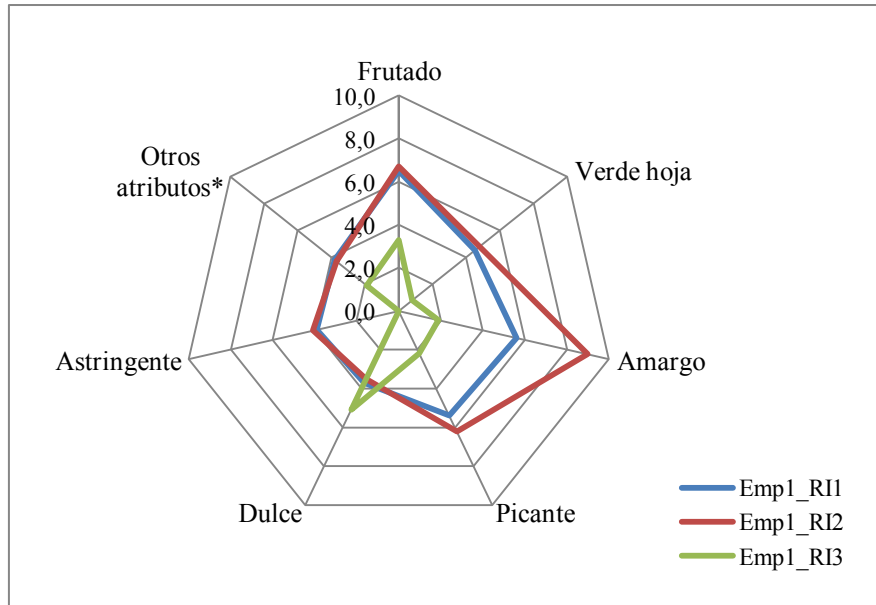


Figura 4.5. Evolución de los atributos positivos de aceites de la variedad *empeltre* elaborados a partir de aceitunas de diferente grado de madurez.

* *alcachofa, tomatera, almendra verde, nueces y verdura.*

En general, uno de los atributos predominantes fue el correspondiente al *frutado* de oliva, con valores medios de intensidad alrededor de 6,7 para los estados de madurez RI1 y RI2, el cual disminuyó considerablemente su intensidad para el aceite elaborado con aceitunas maduras (RI3).

En atributo *amargo*, presentó su máximo valor en el estado de maduración RI2 en concordancia con su valor máximo de FT que presentó esta variedad para este estado de maduración. La misma tendencia se observó para el *picante*, aunque con una intensidad menor.

Al igual que en las demás variedades de aceite de oliva estudiadas, el atributo *dulce* se exhibió una tendencia inversa a los atributos *amargo* y *picante*, presentando, para la variedad *empeltre*, una intensidad de $5,1 \pm 0,4$ en el aceite elaborado a partir de aceitunas maduras (*Emp1-RI3*).

En general, los atributos positivos, a diferencia del amargo y picante, no presentaron diferencias significativas entre los estados de madurez RI1 y RI2.

En este caso, e igual que para las variedades *arbequina* y *picual*, tampoco se detectó ningún defecto en los aceites elaborados con aceitunas de la variedad *empeltre*.

En consecuencia, evaluando de forma conjunta el análisis sensorial y el análisis físico-químico, los aceites estudiados se clasificaron dentro de la máxima categoría de aceite de oliva virgen extra, de acuerdo con el Reglamento (CEE) 2568/91 y sus modificaciones.

4.1.1.8. Análisis estadístico multivariable

Con la finalidad de observar de forma conjunta el efecto de las variables analizadas para la diferenciación de los aceites elaborados con las variedades *arbequina*, *picual* y *empeltre*, se llevó a cabo un análisis estadístico multivariable (análisis de componentes principales, ACP). La selección de las variables para dicho análisis se fundamentó básicamente en las variables más utilizadas según literatura científica como atributos con mayor capacidad discriminante (Rotondi *et al.*, 2004; Yousfi *et al.*, 2007; Bengana *et al.*, 2013).

De este modo, se consideraron 17 de las variables inicialmente analizadas para la aplicación del ACP. Concretamente, el GA, el IP, los coeficientes de extinción K_{232} y K_{270} , la relación de ácidos grasos mono- y poli-insaturados (MUFA/PUFA), la estabilidad oxidativa, los FT, los valores de capacidad antioxidante determinados mediante el método de ABTS, las coordenadas de color L^* , a^* , b^* , el parámetro croma (C^*), así como los atributos sensoriales de frutado, *amargo*, *picante*, *dulce* y *astringente*. Estas mismas variables, a excepción de los atributos *dulce* y *astringente* y las coordenadas de color, fueron utilizadas en el trabajo de Rotondi *et al.*, (2004) para caracterizar el aceite de oliva procedente de la variedad italiana *Nostraha di Briseghella* elaborado a partir de aceitunas en diferentes grados de madurez.

Los tres primeros componentes principales, resultantes de la aplicación del ACP sobre los aceites de oliva procedentes de las aceitunas de las variedades *arbequina*, *picual* y *empeltre* explicaron el 78,47% de la varianza total de la base de datos. En la **Figura 4.6** se exponen las variables elegidas para el estudio en función del primer (CP1) y del segundo (CP2) componente principal. Mediante el CP1, correlacionado positivamente con el atributo positivo de *dulce* y de forma negativa con los FT, los

atributos *frutado*, *picante* y *astringente* y la coordenada de color a^* , pudo explicarse un 45,83% de la variabilidad total. Por su parte el CP2, representando un 19,83% de dicha variabilidad, quedó definido positivamente por el GA y por el parámetro K_{232} y negativamente por la estabilidad oxidativa y el ratio MUFA/PUFA. Adicionalmente, gracias al tercer componente principal (CP3) se recogió otro 12,77% de la variabilidad total de la base de datos de los aceites de oliva objeto de estudio, presentando una correlación positiva con las variables de IP, L^* , b^* y C^* y una correlación negativa con las variables de capacidad antioxidante (ABTS) y los FT (**Tabla 4.7**).

Tabla 4.7. ACP de los diferentes aceites de oliva. Contribución de la variables seleccionadas a los tres primeros componentes principales.

	CP1	CP2	CP3
GA	0,169	0,368	-0,228
PV	0,097	0,104	0,175
K_{232}	0,122	0,345	-0,075
K_{270}	0,187	0,330	-0,220
MUFA/PUFA	-0,163	-0,405	-0,168
Estabilidad oxidativa	-0,180	-0,356	-0,313
TP	-0,216	0,192	-0,433
ABTS	-0,142	0,331	-0,425
<i>Frutado</i>	-0,310	-0,117	-0,143
<i>Amargo</i>	-0,277	0,162	-0,133
<i>Picante</i>	-0,327	0,005	0,055
<i>Dulce</i>	0,268	0,011	0,148
<i>Astringente</i>	-0,343	-0,016	-0,094
L^*	-0,253	0,195	0,263
a^*	0,257	-0,208	-0,327
b^*	-0,306	0,184	0,245
C^*	-0,306	0,184	0,247

CP: Componente Principal

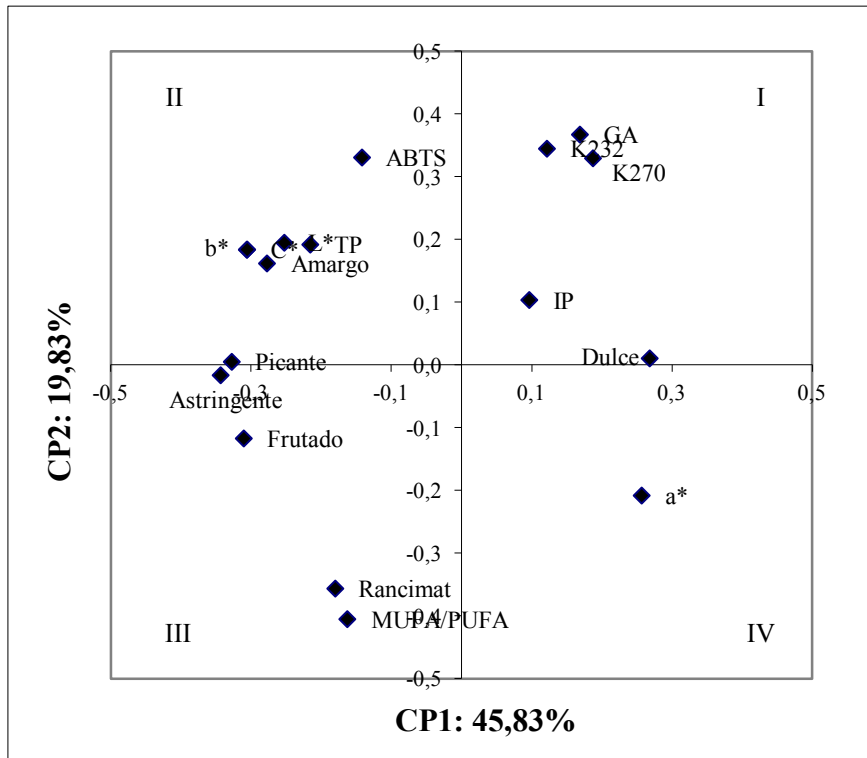


Figura 4.6. Representación gráfica de la distribución de las diferentes variables elegidas para realizar el análisis de componentes principales: CP1 vs. CP2.

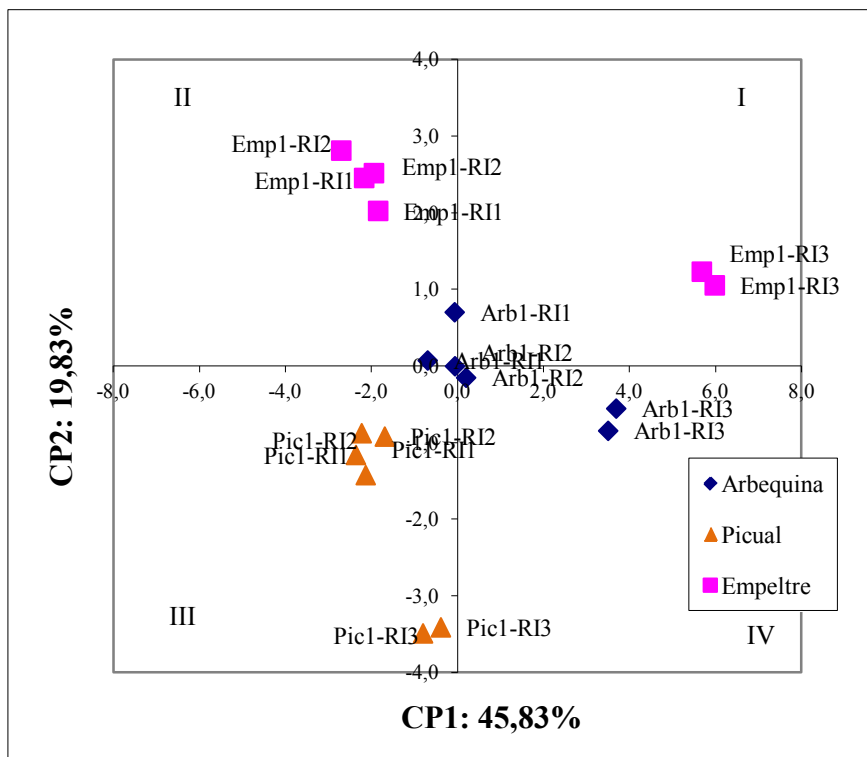


Figura 4.7. Representación de las muestras de aceite procedente de las variedades *arbequina*, *picual* y *empeltre* de diferentes grados de madurez en función de CP1 y CP2.

Los aceites de oliva de las tres variedades en estudio también se han representado como función del primer (CP1) y segundo (CP2) componente principal en la **Figura 4.7**. La distribución de los mismos en este plano pone de manifiesto su tendencia a distribuirse en tres grupos bien diferenciados. Así, los aceites procedentes de la variedad *picual* se separaron claramente del resto al quedar localizados en el tercer cuadrante. A su vez, puede apreciarse que dentro de la misma variedad, se separaron los aceites procedentes de aceitunas en un estado de madurez elevado (*Pic1-RI3*) de los otros aceites elaborados con aceitunas de grado de madurez inferior (RI1 y RI2), entre los cuales no se apreciaron diferencias.

La posición de las muestras *Pic-RI3* respecto al eje CP2 se justifica en base a la alta estabilidad oxidativa y la elevada relación MUFA/PUFA y a los bajos registros del GA y de los parámetros K_{232} y K_{270} . Respecto a los aceites *Pic1-RI1* y *Pic-RI2*, se caracterizan, según el CP1 como aceites en los cuales predominan los atributos frutado y astringente.

Por su parte, el aceite procedente de la variedad *arbequina* constituyó un segundo grupo, en el cual el aceite procedente de aceitunas maduras (*Arb1-RI3*) se situó en el cuarto cuadrante, mientras que los aceites *Arb1-RI1* y *Arb1-RI2* se situaron mayoritariamente sobre el eje positivo del CP2. Observándose, al igual que en el caso de la variedad *picual*, que no existió una diferenciación clara entre los dos primeros estados de maduración (RI1 y RI2) y sí con el aceite elaborado a partir de frutos más maduros (RI3).

Finalmente, la variedad *empeltre*, mostró una gran separación entre el aceite procedente del tercer grado de madurez (*Emp1-RI3*) situándose en el primer cuadrante y los aceites elaborados a partir de aceitunas más verdes *Emp1-RI1* y *Emp1-RI2*, situándose, ambas en el segundo cuadrante. Comparando la posición en la cual se situaron los aceites *Emp1-RI1* y *Emp1-RI2* con el gráfico de las variables analizadas (**Figura 4.6**) se apreció que estos aceites se caracterizaron por una elevada capacidad antioxidante (ABTS), altos valores de L^* , b^* y C^* , así como un elevado valor para el atributo *amargo*, en cambio, fueron los aceites que presentaron un menor valor de la coordenada de color a^* .

Las representaciones de los aceites de oliva en función del primer (CP1) y tercer (CP3) componente principal se muestran en las **Figuras 4.8** y **4.9**.

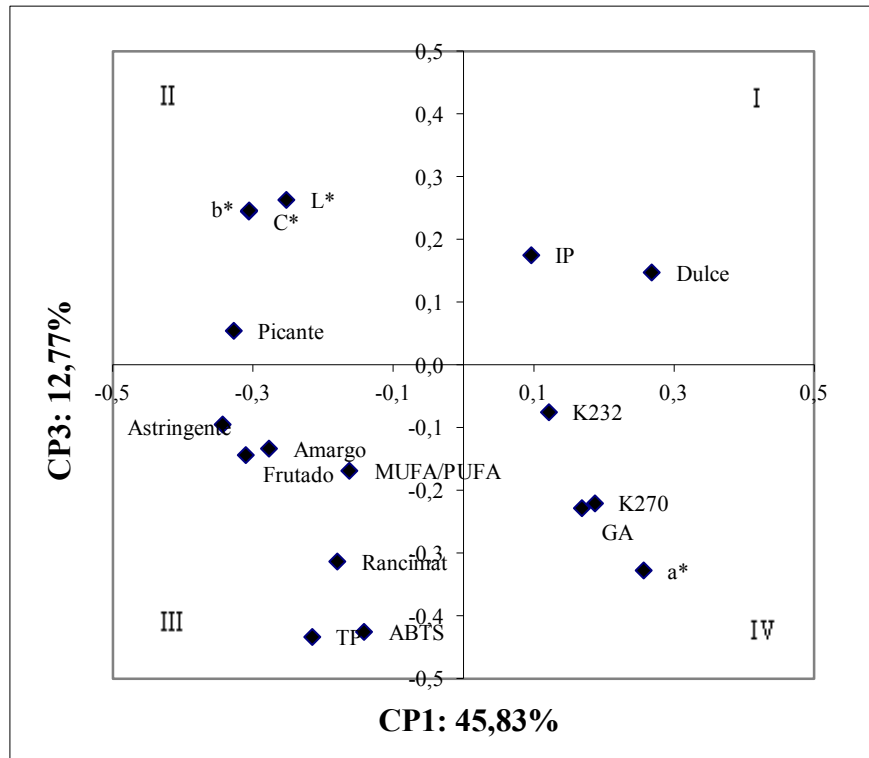


Figura 4.8. Representación gráfica de la distribución de las diferentes variables elegidas para realizar el análisis de componentes principales: CP1 vs. CP3.

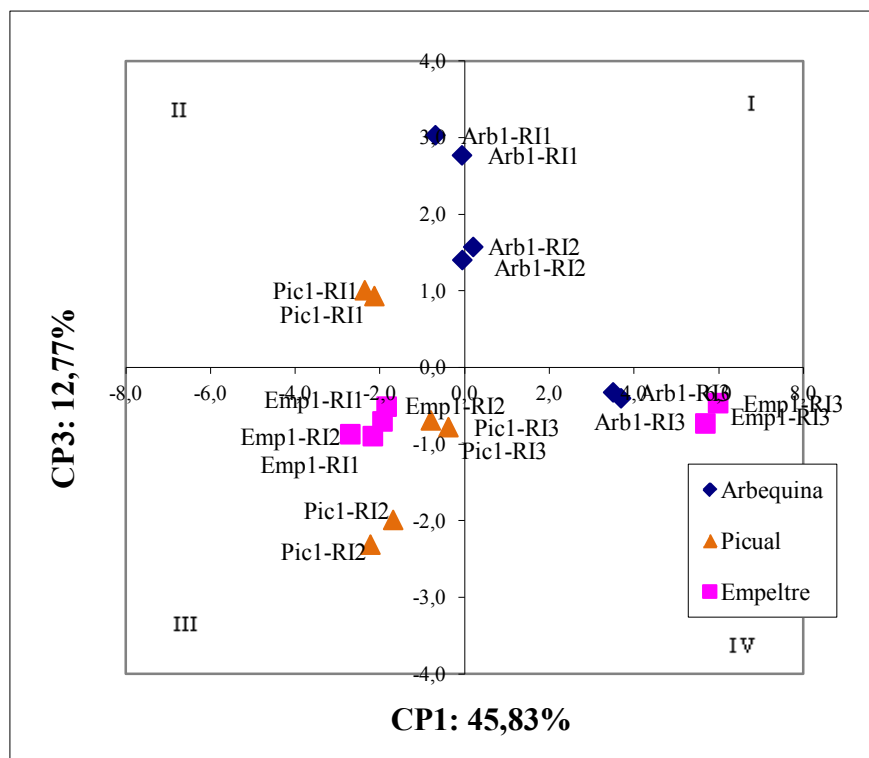


Figura 4.9. Representación de las muestras de aceite de oliva procedente de las variedades *arbequina*, *picual* y *empeltre* de diferentes grados de madurez en función del primer (CP1) y tercer (CP3) componente principal.

Estas representaciones mostraron un patrón de distribución ligeramente diferente al expuesto en la representación CP1 vs. CP2. En esta representación se reflejó una clara diferenciación entre los tres estados de madurez estudiados para las variedades *arbequina* y *picual*. Por el contrario, para la variedad *empeltre* no se observaron diferencias entre los estados de madurez RI1 y RI2 y sí en el caso del grado de madurez RI3, en el cual el aceite resultante se caracterizó por el atributo *dulce*.

Mediante la herramienta del análisis estadístico multivariable (análisis de componentes principales, ACP), la caracterización en términos de calidad y de la composición del aceite de oliva, se ha podido corroborar que tanto las propiedades físico-químicas como las características sensoriales del aceite de oliva están fuertemente relacionadas no solo con la variedad de la aceituna de origen, sino también con el grado de madurez de las mismas.

En general, podemos afirmar, de acuerdo con los resultados obtenidos, que el grado óptimo de madurez de la aceituna de las variedades *arbequina*, *picual* y *empeltre* que permitiría maximizar tanto las propiedades físico-químicas como las características organolépticas de los aceites obtenidos, se corresponde con un grado de madurez representado en el grupo 3 (RI2) según la escala descrita por Uceda y Frias *et al.*, (1975).

4.1.2. Influencia de los factores agroclimáticos y del estado de madurez de las aceitunas sobre la calidad del aceite de oliva

El objetivo propuesto en esta línea de trabajo se basó en evaluar la influencia de los efectos agroclimáticos del olivar (suelo, clima y paisaje) y del grado de madurez de las aceitunas (verde, en enero y maduro) sobre las características físico-químicas del aceite de oliva. Para ello, se utilizaron aceitunas de la variedad *arbequina* recogidas en diferentes puntos geográficos de la Isla de Mallorca.

El término “olivar-muestra” quedó definido por las características físico-químicas del aceite de oliva y del suelo, conjuntamente con los datos climáticos y de paisaje geolocalizados, para cada olivar en estudio.

4.1.2.1. Parámetros agroclimáticos

Para la elección de los datos climáticos, se consideró el período comprendido entre 2008-2012, calculándose el valor medio de los cinco años para los datos de

pluviometría, mientras que para los datos de temperatura, humedad, radiación solar y viento, se tomaron los valores medios del año 2012 (año correspondiente a la cosecha de las aceitunas). Cabe destacar que tan solo en el caso de la pluviometría se observaron diferencias significativas entre los valores medios anuales de los cinco años, ($p > 0.05$). Se han considerado valores medios anuales (año natural), al coincidir con el período comprendido entre dos cosechas de aceitunas, y por tanto, de esta forma se tendrá en cuenta todo el ciclo productivo del olivo. Los valores utilizados para definir los parámetros agroclimáticos de cada olivar-muestra se recogen en la **Tabla 4.8**

Tabla 4.8. Caracterización agroclimática (suelo, clima y paisaje) de los puntos geográficos de la Isla de Mallorca, origen de las aceitunas recogidas.

	<i>Olivar 1</i>	<i>Olivar 2</i>	<i>Olivar 3</i>
Suelo			
Arenas (%)	47,00 ± 1,00a	18,00 ± 2,00c	36,00 ± 1,00b
Limos (%)	30,00 ± 1,00b	48,00 ± 1,00a	34,00 ± 1,00b
Arcillas (%)	23,00 ± 2,00b	34,00 ± 2,00a	30,00 ± 1,00ab
Mat. Orgánica (%)	1,73 ± 0,05c	1,96 ± 0,03b	2,44 ± 0,01a
Carbonatos (%)	70,16 ± 0,23a	47,81 ± 0,57b	50,82 ± 1,48b
Calcaria Activa (%)	11,28 ± 0,21a	12,45 ± 0,34a	11,71 ± 0,08a
pH	8,48 ± 1,49a	8,61 ± 0,02a	8,23 ± 0,01a
Conductividad (dS/m)	0,16 ± 0,01ab	0,13 ± 0,01b	0,19 ± 0,01a
N total (%)	0,10 ± 0,01b	0,16 ± 0,01a	0,17 ± 0,01a
C/N ratio	10,03 ± 0,61a	7,11 ± 0,13b	8,33 ± 0,02ab
P asimilable (ppm)	13,65 ± 0,84b	16,52 ± 1,21b	120,57 ± 0,24a
K intercambiable (ppm)	188,00 ± 2,00c	302,00 ± 7,50b	474,00 ± 10,50a
Clima			
Precipitación anual (mm)	486,42 ± 46,40b	774,73 ± 52,51a	485,31 ± 60,80b
Temperatura media (°C)	17,17 ± 6,76a	16,28 ± 6,42a	16,80 ± 6,90a
Humedad media (%)	74,94 ± 7,35a	74,19 ± 6,52a	73,03 ± 9,19a
Radiación media (MJ/m ²)	16,34 ± 7,01a	16,31 ± 7,33a	16,51 ± 7,30a
Viento (m/s)	0,82 ± 0,12a	1,29 ± 0,21a	1,03 ± 0,14a
Paisaje			
Elevación (m)	201	132	130

Para cada variable, las letras diferentes indican diferencias significativas entre olivares ($p < 0,05$)

El suelo en cada uno de los *olivares-muestra* presentó una textura característica. Por su parte, en el primer *olivar-muestra1* (Algaida), la arena fue el principal componente seguido de los limos y la arcilla, mientras que el segundo *olivar-muestra2* (Campanet) presentó una composición totalmente diferente, en el cual el componente principal fueron los limos seguido de las arcillas y, en menor proporción, la arena. En el caso del tercer y último *olivar-muestra3* estudiado (Cas Concos), la diferencia entre los tres componentes no fue tan dispar, aun así predominó la arcilla con un 36%, seguido de los limos y la arena con un 34 y un 30%, respectivamente.

En función del contenido de carbonatos del suelo, los *olivares-muestra* estudiados se clasificaron en dos grupos bien diferenciados ($p < 0,05$), por una parte los *olivares 2* (Campanet) y *3* (Cas Concos) los cuales presentaron valores del 47,81 % y 50,82%, respectivamente, y por otra parte el *olivar 1* (Algaida) que presentó valores cercanos al 70%. El suelo con menor contenido en materia orgánica fue el correspondiente al *olivar 1*, seguido del *olivar 2* y por último, el *olivar 3*, siendo éste el que presentó un contenido de materia orgánica más elevado. Con respecto a la composición mineral, el contenido en fósforo fue muy superior en los suelos del *olivar 3*, con respecto a los otros dos *olivares*, concretamente alrededor de 100 ppm superior. En cuanto al potasio, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre *olivares*, siendo el *olivar-muestra3* el *olivar* más rico en este mineral, seguido del *olivar 2* y el *olivar 1*.

Con respecto a las condiciones meteorológicas (**Tabla 4.8**) solo la precipitación media anual, presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes *olivares*. El *olivar* situado más al norte de Mallorca (*olivar 2*) presentó el valor más alto de pluviometría, mientras que para los *olivares 1* y *3* no se observaron diferencias en el nivel de precipitación, situándose alrededor de los 486 mm de pluviometría anual.

Por su parte, la elevación del terreno sobre el nivel del mar, como descriptor del paisaje de los *olivares*, también presentó diferencias significativas entre los *olivares* ($p < 0,05$). Estos resultados ponen de manifiesto que la gran variedad de variables agroclimáticas, pueden resultar útiles para el estudio y análisis de las diferencias existentes entre *olivares* de una misma región oleícola.

4.1.2.2. Parámetros de calidad del aceite de oliva obtenido

Tal y como se ha comentado anteriormente, los parámetros que definen la calidad del aceite de oliva, y entre ellos, los más representativos y estudiados son el GA, el IP y

los coeficientes K_{232} y K_{270} . Dichos parámetros no están directamente relacionados con la variedad de la aceituna con la cual se elabora el aceite de oliva, ni con su procedencia geográfica, sino más bien con el estado en el que se encuentra la aceituna y con el proceso de extracción del aceite de oliva.

En la **Tabla 4.9**. se detallan los valores de los diferentes parámetros de calidad analizados en los aceites de oliva, en función del grado de madurez de las aceitunas y de su procedencia geográfica.

a) Grado de acidez (GA)

Como se desprende de la **Tabla 4.9**, independientemente del grado de madurez de la aceituna y de la zona de recolección, todos los aceites analizados presentaron valores de GA muy por debajo del límite establecido (0,8% ácido oleico) para la categoría virgen extra Reglamento CEE 2568/91).

Tabla 4.9. Parámetros de calidad de los aceites de la variedad *arbequina* en función del grado de madurez de la aceituna y de su procedencia geográfica.

Parámetros de calidad				
	GA	IP	K_{232}	K_{270}
Olivar 1				
<i>Arb1-RI1</i>	$0,18 \pm 0,01_b^{XY}$	$10,28 \pm 0,41_a^X$	$1,60 \pm 0,27_a^X$	$0,15 \pm 0,01_b^X$
<i>Arb1-RI2</i>	$0,25 \pm 0,01_a^{XY}$	$3,39 \pm 0,28_b^Y$	$1,46 \pm 0,02_a^X$	$0,11 \pm 0,01_b^X$
<i>Arb1-RI3</i>	$0,23 \pm 0,01_a^Y$	$3,77 \pm 0,10_b^Y$	$1,85 \pm 0,13_a^Y$	$0,24 \pm 0,01_a^X$
Olivar 2				
<i>Arb2-RI1</i>	$0,21 \pm 0,01_c^X$	$9,65 \pm 0,41_a^X$	$2,21 \pm 0,02_b^X$	$0,13 \pm 0,00_a^X$
<i>Arb2-RI2</i>	$0,31 \pm 0,02_b^X$	$8,87 \pm 0,15_a^X$	$1,62 \pm 0,05_c^{XY}$	$0,08 \pm 0,03_a^X$
<i>Arb2-RI3</i>	$0,41 \pm 0,04_a^X$	$3,83 \pm 0,07_b^Y$	$2,43 \pm 0,04_a^X$	$0,14 \pm 0,03_a^Y$
Olivar 3				
<i>Arb3-RI1</i>	$0,16 \pm 0,01_b^Y$	$3,84 \pm 0,11_c^Y$	$2,02 \pm 0,08_a^X$	$0,14 \pm 0,03_a^X$
<i>Arb3-RI2</i>	$0,23 \pm 0,03_{ab}^Y$	$7,32 \pm 0,43_b^X$	$1,81 \pm 0,11_{ab}^X$	$0,07 \pm 0,00_b^X$
<i>Arb3-RI3</i>	$0,30 \pm 0,01_a^Y$	$8,85 \pm 0,03_a^X$	$1,54 \pm 0,05_b^Y$	$0,20 \pm 0,01_a^{XY}$

GA en % ácido oleico; IP en meq. O_2 /kg aceite.. Las letras a-c indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre grados de madurez, mientras que las letras X-Z indican diferencias entre olivares (para un mismo grado de madurez).

En general, se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en el GA a medida que aumentó la madurez de las aceitunas, independientemente del olivar estudiado. Resultados similares han sido descritos por Salvador *et al.*, (2001), Yousfi *et al.*, (2006)

y Youssef *et al.*, (2010). Dicho aumento en el GA parece ser la consecuencia de la actividad endógena de ciertas lipasas que provocan daños en los tejidos de las aceitunas (Baccouri *et al.*, 2008). Tomando en consideración los aceites procedentes de diferentes regiones de la isla de Mallorca, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los valores del GA entre los diferentes olivares-muestra, siendo el *olivar 2* el que presentó, en conjunto, los valores más elevados de GA. Estos resultados están en consonancia con las observaciones realizadas por Issaoui *et al.*, (2010) en el cual se observaron diferencias significativas entre los valores de GA de aceites de las variedades *chenlali* y *chétoui* procedentes del sur y del norte de Túnez, o el trabajo de Youssef *et al.*, (2011), en el cual también detectaron variaciones en el GA de la variedad *oueslati* recolectada en diferentes zonas geográficas de Túnez.

b) Índice de peróxidos (IP)

Según los valores obtenidos para el IP de los distintos aceites de oliva objeto de estudio (**Tabla 4.9**), todos los aceites estudiados, independientemente del grado de madurez de las aceitunas y de su procedencia geográfica, presentaron valores de IP muy por debajo del límite legislado para esta categoría (20 meq. O₂/kg aceite).

Al estudiar la evolución de este parámetro en función del estado de madurez de las aceitunas, se apreciaron diferentes tendencias en función del olivar. Por una parte, se observó un descenso significativo en los valores de IP a medida que avanzaba el grado de madurez de las aceitunas en el caso de los *olivares 1* y *2*, con variaciones de 10,3 meq. O₂/kg aceite para la muestra *Arb1-R11*, hasta los 3,7 meq. O₂/kg aceite para la muestra *Arb1-R13*, o de 9,6 meq. O₂/kg aceite para la muestra *Arb2-R11* a 3,8 meq. O₂/kg aceite para la muestra *Arb2-R13*. Por otro parte, se detectó un aumento del IP en el caso del aceite procedente del *olivar 3* a medida que los aceites provenían de aceitunas más maduras, con valores de IP de 3,8 meq. O₂/kg aceite para aceites procedentes de aceitunas verdes (*Arb3-R11*) hasta 8,8 meq. O₂/kg aceite para aceites más maduros (*Arb3-R13*). Dichas variaciones en la evolución del IP, conlleva la detección de diferencias significativas entre los distintos olivares-muestra estudiados para un mismo estado de madurez. En este contexto, otros autores también observaron diferencias en los valores de IP al comparar aceites procedentes de diferentes zonas geográficas (Issaoui *et al.*, 2010; Youssef *et al.*, 2011).

c) Coeficiente de extinción específico K_{232}

Al igual que en el caso del GA y del IP, como se expone en la **Tabla 4.9**, todos los aceites estudiados presentaron valores para el coeficiente K_{232} inferiores al límite legislado ($\leq 2,5$) para la categoría virgen extra (Reglamento CEE 2568/91).

La evolución del coeficiente K_{232} en función del grado de madurez también presentó diferentes tendencias en función del olivar-muestra estudiado. Por una parte, los aceites procedentes del *olivar 1* (Algaida), no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los distintos grados de madurez estudiados, en cambio para el *olivar 2* (Campanet) mostró un ligero aumento desde el valor obtenido para el aceite procedente de aceitunas verdes (*Arb2-R11*) hasta el valor correspondiente al aceite procedente de aceitunas más maduras (*Arb2-R13*). Por último, para el *olivar 3* (Cas Concos) mostró un ligero descenso en los valores de K_{232} a medida que avanzó el grado de maduración de las aceitunas.

d) Coeficiente de extinción específico K_{270}

Tomando en consideración el límite legislado para el parámetro K_{270} para la categoría de aceite de oliva virgen extra, se observa como todos los valores determinados para los aceites objeto de estudio (**Tabla 4.9**), independientemente de su grado de madurez y de su procedencia geográfica, pueden clasificarse dentro de esta categoría.

En cuanto a la influencia del grado de madurez de la aceituna, se observó un aumento significativo ($p < 0,05$) de los valores del parámetro K_{270} en los aceites procedentes del *olivar 1* a medida que avanzó el grado de madurez del fruto. Estos valores están en consonancia con el trabajo de García *et al.*, (1996) en el cual se observó un incremento del valor de K_{270} a medida que aumentaba el grado de madurez de las aceitunas de la variedad *arbequina* en la zona del bajo Aragón. Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en los valores de K_{270} a medida que avanzaba la madurez de las aceitunas en los *olivares 2 y 3*, con valores medios de 0,14 para el caso del *olivar 2* y de 0,17 para el *olivar 3*. Rotondi *et al.*, (2004) observó valores similares, al detectar diferencias significativas entre aceites procedentes de aceitunas verdes y maduras correspondientes a la variedad *Nostrana de Brisighella*.

Teniendo en cuenta los distintos olivares estudiados, para un mismo grado de madurez, no se observaron diferencias entre los valores de K_{270} en los distintos olivares estudiados.

4.1.2.3. Perfil de ácidos grasos

A diferencia de los parámetros de calidad anteriormente analizados, el perfil de ácidos grasos está directamente relacionado con la variedad de aceituna utilizada para elaborar el aceite de oliva, y también con su grado de madurez (Aparicio *et al.*, 2002; Rotondi *et al.*, 2004) y su procedencia geográfica (Issaoui *et al.*, 2010).

La evolución del perfil de ácidos grasos en función del grado de madurez y de la procedencia geográfica se muestran en la **Tabla 4.10**.

No se observaron diferencias significativas en el porcentaje de ácido oleico a medida que avanzó el grado de madurez de las aceitunas. Sin embargo, teniendo en cuenta el efecto geográfico, sí se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes olivares. El *olivar 1* (Algaida) fue el que proporcionó aceites con un porcentaje mayor de ácido oleico (66,5-68,8 %), seguido del *olivar 2* (Campanet) con porcentajes del 64,4 hasta el 66,6 % y, por último, el *olivar 3* (Cas Concos) con porcentajes desde el 59,7 hasta el 63,2 %. Otro de los ácidos grasos importantes en el aceite de oliva es el ácido palmítico. En el caso del *olivar 1*, se observó una ligera disminución del porcentaje de este ácido a medida que avanzaba el grado de madurez de la aceituna, tomando valores de 16,60 % para el aceite elaborado con aceitunas verdes (*Arb1-RII*) hasta el 14,24 % para el aceite procedente de aceitunas más maduras (*Arb1-RII*). Una tendencia similar se presentó para el *olivar 3* en el cual dicho descenso fue del 17,52 % para el aceite procedente de aceitunas verdes (*Arb2-RII*) hasta el 15,10 % para el aceite elaborado con aceitunas más maduras (*Arb3-RI3*). Gutierrez *et al.*, (1999) explicó este fenómeno como consecuencia de la dilución del ácido palmítico dentro de la aceituna a medida que ésta va madurando. Para el *olivar 2*, no se observaron diferencias significativas en la proporción de ácido palmítico, presentando valores medios del 15,7%. En cuanto al ácido palmitoleico, sí se observaron cambios significativos en los *olivar 1* y *2*, en función del grado de madurez de la aceituna, pero no en el *olivar 3*. Por otra parte, el ácido linoleico presentó un ligero aumento a medida que aumentó el grado de madurez del fruto, para el *olivar 1* y también para el *olivar 2*, manteniéndose constante para el *olivar 3*.

Tabla 4.10. Influencia del grado de madurez y de la procedencia geográfica sobre la composición de ácidos grasos del aceite de oliva.

	Ácidos Grasos							
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	C20:0	MUFA/PUFA
Olivar 1								
<i>Arb1-RI1</i>	16,60 ± 0,01 _b ^X	1,40 ± 0,01 _b ^Y	2,06 ± 0,00 _a ^X	67,65 ± 0,03 _a ^X	10,99 ± 0,01 _b ^Y	0,53 ± 0,00 _a ^Z	0,42 ± 0,01 _a ^X	6,02
<i>Arb1-RI2</i>	16,89 ± 0,04 _a ^X	1,61 ± 0,00 _a ^Y	2,31 ± 0,00 _a ^X	66,59 ± 0,12 _a ^X	11,16 ± 0,02 _b ^Y	0,57 ± 0,00 _a ^Y	0,43 ± 0,00 _a ^X	5,84
<i>Arb1-RI3</i>	14,25 ± 0,04 _c ^Y	1,04 ± 0,03 _c ^Z	2,02 ± 0,17 _a ^X	68,87 ± 1,81 _a ^X	12,60 ± 0,33 _a ^X	0,48 ± 0,03 _b ^Y	0,40 ± 0,06 _b ^X	5,37
Olivar 2								
<i>Arb2-RI1</i>	15,47 ± 0,35 _a ^Y	1,44 ± 0,03 _b ^Y	1,82 ± 0,04 _a ^Y	66,64 ± 1,44 _a ^{XY}	9,12 ± 0,20 _c ^Z	0,57 ± 0,01 _a ^Y	0,39 ± 0,01 _a ^X	7,06
<i>Arb2-RI2</i>	16,79 ± 0,34 _a ^X	2,13 ± 0,04 _a ^X	1,74 ± 0,03 _a ^Y	64,66 ± 1,25 _a ^X	11,25 ± 0,22 _a ^Y	0,60 ± 0,01 _a ^{XY}	0,38 ± 0,01 _{ab} ^Y	5,66
<i>Arb2-RI3</i>	15,79 ± 0,26 _a ^X	2,04 ± 0,03 _a ^X	1,68 ± 0,03 _a ^X	64,81 ± 1,06 _a ^Y	10,31 ± 0,17 _b ^Y	0,52 ± 0,01 _b ^Y	0,36 ± 0,01 _b ^X	6,20
Olivar 3								
<i>Arb3-RI1</i>	17,52 ± 0,15 _a ^X	1,89 ± 0,02 _a ^X	1,90 ± 0,02 _a ^Y	63,18 ± 0,53 _a ^Y	12,62 ± 0,11 _a ^X	0,71 ± 0,01 _a ^X	0,42 ± 0,00 _a ^X	4,49
<i>Arb3-RI2</i>	16,85 ± 0,64 _a ^X	1,98 ± 0,07 _a ^X	1,82 ± 0,07 _a ^Y	60,65 ± 2,30 _a ^X	12,77 ± 0,48 _a ^X	0,66 ± 0,03 _a ^X	0,41 ± 0,02 _{ab} ^{XY}	4,68
<i>Arb3-RI3</i>	15,10 ± 0,00 _b ^X	1,91 ± 0,00 _a ^Y	1,55 ± 0,00 _b ^X	59,75 ± 0,00 _a ^Z	12,24 ± 0,00 _a ^X	0,68 ± 0,01 _a ^X	0,37 ± 0,01 _b ^X	4,79

Las letras a-c indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre aceites elaborados con aceitunas del mismo olivar con diferente grado de madurez, mientras que las letras X-Z indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre aceites de diferente procedencia geográfica, para un mismo grado de madurez.

Teniendo en cuenta la relación MUFA/PUFA, se observó un discreto descenso de este ratio para los aceites procedentes de los *olivares 1 y 2*, con valores que van del 6,02 para RI1 hasta el 5,37 para RI3 en el caso del *olivar 1*, mientras que para los aceites del *olivar 2*, la disminución fue del 7,06 al 6,20 para los RI1 y RI3, respectivamente. En el caso del *olivar 3*, al no observarse diferencias significativas en los ácidos grasos oleico y linoleico en función del grado de madurez, repercutió en que la relación MUFA/PUFA también se mantuviese constante a medida que avanzaba la maduración del fruto.

4.1.2.4. Color

En la **Tabla 4.11** se exponen los valores de las diferentes coordenadas de color L*, a* y b*, así como los valores de los parámetros C* y h* correspondientes a los aceites elaborados a partir de aceitunas de la variedad arbequina de diferentes grados de madurez y de diferente procedencia geográfica.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los diferentes aceites elaborados (**Tabla 4.11**), independientemente del estado de maduración del fruto, confirmando el efecto que ejerce el entorno agroclimático sobre el color y, por tanto, sobre el contenido en pigmentos (Minguez-Mosquera *et al.*, 1991; Issaoui *et al.*, 2010; Daddous *et al.*, 2011).

Tomando en consideración la coordenada L*, independientemente del olivar considerado, no se observó una tendencia clara en función del grado de madurez de la aceituna. Por una parte, el *olivar 1*, presentó una disminución de dicha coordenada a medida que aumentó el grado de madurez de las aceitunas, con valores de 92,8 para la muestra *Arb1-RI1* hasta 54,4 para la muestra *Arb1-RI3*. Sin embargo, para los aceites elaborados con aceitunas procedentes del *olivar 2* se observó un tenue aumento, con valores que van de 96,1 para el aceite procedente de aceitunas verdes (*Arb2-RI1*) hasta 100,7 para las muestras más maduras (*Arb2-RI3*). No se observaron diferencias significativas entre los RI1 y RI3 en las muestras de aceite procedentes del *olivar 3*. Esta disparidad también se refleja en trabajos de Criado *et al.*, (2007) en el cual se obtiene un incremento en la luminosidad de aceites procedentes de la variedad *arbequina*, a medida que la aceituna va madurando, mientras que Mínguez-Mosquera *et al.*, (1991) observaron una disminución de dicha coordenada para aceites procedentes de aceitunas de la variedad *lechin*.

Tabla 4.11. Influencia del grado de madurez y de la procedencia geográfica sobre las coordenadas de color (espacio Ciel*a*b*)

Coordenadas Color CieLab					
	L*	a*	b*	C*	h*
Olivar 1					
<i>Arb1-RI1</i>	92,82 ± 0,25 _b ^X	-9,26 ± 0,09 _b ^Y	79,18 ± 1,62 _a ^X	79,72 ± 1,62 _a ^X	96,67 ± 0,07 _b ^Y
<i>Arb1-RI2</i>	93,73 ± 0,33 _a ^X	-8,98 ± 0,01 _b ^Y	59,39 ± 0,61 _b ^X	60,07 ± 0,61 _b ^X	98,60 ± 0,08 _a ^Y
<i>Arb1-RI3</i>	58,43 ± 0,80 _c ^Z	-4,02 ± 0,13 _a ^Y	27,66 ± 0,95 _c ^Y	27,94 ± 0,96 _c ^Y	98,27 ± 0,03 _a ^X
Olivar 2					
<i>Arb2-RI1</i>	96,23 ± 0,46 _b ^X	-9,89 ± 0,09 _c ^Z	71,03 ± 1,35 _a ^Y	71,72 ± 1,34 _a ^Y	97,93 ± 0,08 _b ^X
<i>Arb2-RI2</i>	93,18 ± 0,03 _a ^Y	-7,90 ± 0,06 _b ^X	58,27 ± 0,95 _b ^X	58,80 ± 0,95 _b ^X	97,72 ± 0,06 _b ^Z
<i>Arb2-RI3</i>	100,75 ± 0,55 _c ^X	-6,29 ± 0,04 _a ^Z	29,85 ± 0,37 _b ^X	30,50 ± 0,37 _c ^X	101,89 ± 0,05 _a ^X
Olivar 3					
<i>Arb3-RI1</i>	86,82 ± 0,94 _b ^Y	-6,71 ± 0,05 _b ^X	46,90 ± 0,99 _a ^Z	47,37 ± 0,98 _a ^Z	98,14 ± 0,11 _b ^X
<i>Arb3-RI2</i>	98,80 ± 0,53 _a ^{ZX}	-8,03 ± 0,08 _c ^X	40,51 ± 0,60 _b ^Y	41,29 ± 0,60 _b ^Y	101,21 ± 0,05 _a ^X
<i>Arb3-RI3</i>	84,02 ± 0,31 _b ^Y	-2,59 ± 0,07 _a ^X	24,42 ± 0,30 _c ^Y	24,55 ± 0,29 _c ^Y	96,05 ± 0,22 _c ^Y

Las letras a-c indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre aceites elaborados con aceitunas del mismo olivar con diferente grado de madurez, mientras que las letras X-Z indican diferencias significativas entre aceites de diferente procedencia geográfica, para un mismo grado de madurez.

En cuanto a la evolución de la coordenada a*, se observó, para los aceites de los diferentes olivares estudiados, un incremento significativo ($p < 0,05$) a medida que aumentó el grado de maduración de la aceituna. En concreto, para el olivar 1, la coordenada a* aumentó de -9,25 para el aceite correspondiente al estado de madurez RI1 a -4,02 para el grado de madurez RI3, mientras que en el *olivar 2*, dicho aumento fue de -9,89 (*Arb2-RI1*) a -6,29 (*Arb2-RI3*), y para el olivar 3 de -6,71 (*Arb3-RI1*) a -2,59 (*Arb3-RI3*). Estos cambios se vieron reflejados en una disminución de la tonalidad verdosa de los diferentes aceites.

Para la coordenada b*, se observó una disminución significativa ($p < 0,05$) generalizada en los aceites procedentes de los distintos olivares, objeto de estudio, a medida que avanzó el estado de madurez de la aceituna, observándose que los aceites elaborados a partir de aceitunas más maduras eran menos amarillentos que los aceites procedentes de frutos más verdes. Criado *et al.*, (2007) observó similares resultados al estudiar las variaciones de color en función del grado de madurez de las aceitunas de la variedad *arbequina* sobre dicha coordenada de color.

Otros parámetros importantes a la hora de estudiar la evolución del color en el aceite de oliva son la variación en la saturación del color o croma (C^*) y la tonalidad o hue (h^*). El parámetro C^* , exhibió una disminución significativa ($p < 0,05$) en los aceites procedentes de todos los olivares analizados, a medida que aumentaba el grado de madurez de las aceitunas. Este hecho se tradujo en una pérdida de intensidad del color de los aceites con el avance de la maduración de las aceitunas. En cuanto al parámetro h^* , prácticamente no se observaron diferencias significativas entre los diferentes aceites, independientemente de la procedencia geográfica y del estado de maduración de las aceitunas.

En general, los cambios observados entre grados de madurez y la procedencia geográfica de las aceitunas, indican que estos factores influyen en la composición de los pigmentos responsables del color del aceite de oliva (sobretudo carotenos y clorofilas), tal y como demostraron Issaouri *et al.*, 2010 y Youssef *et al.*, 2011 en sus respectivos trabajos.

4.1.2.5. Fenólicos totales, capacidad antioxidante y estabilidad oxidativa

El contenido en compuestos fenólicos, aportan cierto valor añadido al aceite de oliva, al estar directamente relacionados con los efectos beneficiosos para la salud, con las propiedades organolépticas, y también, con el período de vida útil del aceite (Bendini *et al.*, 2009).

a) Fenólicos totales

En la **Tabla 4.12** se muestra la evolución del contenido en FT para los diferentes olivares-muestra objeto de estudio, en función del estado de madurez de las aceitunas para la variedad *arbequina*.

En general, se observaron diferentes tendencias en función del índice de madurez de la aceituna, independientemente del olivar-muestra considerado. El *olivar 1*, presentó niveles de FT que alcanzaron su valor más elevado en los aceites elaborados con aceitunas del grado de madurez RI2, con un valor de 308 mg ácido cafeico/kg aceite. En cambio, los aceites procedentes de los *olivares 2* y *3*, no presentaron diferencias significativas, independientemente del grado de madurez de los frutos, con valores en torno a los 100 mg ácido cafeico/kg aceite para el *olivar 2* y de unos 140 mg ácido cafeico/kg aceite para el *olivar 3*.

En definitiva, se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los aceites de los distintos olivares-muestra estudiados (**Tabla 4.12**), siendo el aceite procedente del *olivar 1* (Algaida) el que presentó los valores medios de FT más elevados, seguido por el aceite del *olivar 2* (Cas Concos) y por el del *olivar 3* (Campanet).

Tabla 4.12. Influencia del grado de madurez y la procedencia geográfica de las aceitunas sobre el contenido en FT, capacidad antioxidante y estabilidad oxidativa del aceite de oliva.

	Capacidad antioxidante				Est. Oxidativa (h)
	FT (mg ácido cafeico/kg aceite)	ABTS (mM trolox/kg aceite)	CUPRAC (mM trolox/kg aceite)	FRAP (mM trolox/kg aceite)	
Olivar 1					
<i>Arb1-RI1</i>	213,22 ± 12,49 ^X	224,81 ± 10,15 ^X	558,72 ± 15,65 ^X	162,41 ± 6,66 ^X	55,25 ± 1,59 ^X
<i>Arb1-RI2</i>	303,53 ± 2,16 ^X	308,07 ± 7,07 ^X	889,27 ± 10,61 ^X	228,55 ± 15,56 ^X	69,83 ± 3,61 ^X
<i>Arb1-RI3</i>	227,82 ± 1,58 ^Z	228,18 ± 0,17 ^{ab} ^Y	564,19 ± 29,80 ^X	153,69 ± 22,86 ^X	59,17 ± 1,54 ^X
Olivar 2					
<i>Arb2-RI1</i>	98,84 ± 4,91 ^Z	173,40 ± 6,48 ^{ab} ^Y	215,33 ± 2,56 ^b ^Z	137,93 ± 15,76 ^a ^X	30,01 ± 0,70 ^a ^Z
<i>Arb2-RI2</i>	103,44 ± 7,32 ^a ^Y	181,90 ± 1,45 ^a ^Y	286,65 ± 13,49 ^a ^Y	138,19 ± 12,17 ^a ^Y	21,69 ± 1,36 ^b ^Z
<i>Arb2-RI3</i>	94,68 ± 10,21 ^Z	159,39 ± 0,73 ^b ^Y	211,08 ± 21,50 ^b ^Z	95,67 ± 4,77 ^b ^Y	21,16 ± 0,35 ^b ^Z
Olivar 3					
<i>Arb3-RI1</i>	153,07 ± 8,89 ^a ^Y	179,13 ± 10,07 ^a ^Y	357,12 ± 15,84 ^a ^Y	146,86 ± 20,77 ^a ^X	36,48 ± 0,37 ^a ^Y
<i>Arb3-RI2</i>	136,96 ± 8,95 ^a ^Y	171,73 ± 2,64 ^a ^Y	338,97 ± 8,59 ^a ^Y	115,68 ± 15,74 ^a ^Y	33,32 ± 0,72 ^b ^Y
<i>Arb3-RI3</i>	140,54 ± 7,02 ^a ^Y	148,44 ± 20,04 ^a ^Y	321,78 ± 11,62 ^a ^Y	98,99 ± 14,71 ^a ^Y	30,07 ± 0,91 ^c ^Y

Las letras a-c indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre aceites elaborados con aceitunas del mismo olivar con diferente grado de madurez, mientras que las letras X-Z indican diferencias significativas entre aceites de diferente procedencia geográfica, para un mismo grado de madurez.

Estudios basados en la relación existente entre las condiciones de déficit de agua (comparación entre olivares de secano y de regadío) de los cultivos y el grado de maduración de las aceitunas sobre la calidad del aceite de oliva, llegaron a la conclusión de que a medida que aumenta la cantidad de agua aportada al olivar, el contenido en FT disminuye, de ahí que los olivares de secano consigan aceites con porcentajes más elevados en FT que los aceites procedentes de olivares de regadío (Fregapane *et al.*, 2010). Por tanto, el hecho que el *olivar 2* (Campanet) fuera el que presentó una mayor pluviometría anual, explicaría el menor contenido en FT determinado en las muestras de aceite de dicha procedencia en comparación con las muestras procedentes de los *olivares 1* y *3* (Algaida y Cas Concos, respectivamente). Por otra parte, Issaouri *et al.* (2010) estudiaron el efecto de la elevación del terreno sobre el contenido en FT de las

muestras de aceite, observando que el aceite producido en el sur de Túnez (13 m sobre el nivel del mar) presentaba una menor concentración de FT que el mismo aceite cultivado al norte del país (222 m). Este estudio está en concordancia con el hecho que las muestras de aceite procedentes del *olivar 1* (el de más elevación de los 3 estudiados) presentara el contenido de FT más elevado.

b) Capacidad antioxidante

Con el objetivo de tener una visión global de la capacidad antioxidante de los diferentes aceites en función del grado de madurez y de los parámetros agroclimáticos, se utilizaron los métodos ABTS, CUPRAC y FRAP para su evaluación. Los resultados experimentales para los aceites objeto de estudio se incluyen en la **Tabla 4.12**.

En el caso del *olivar 1*, los valores más elevados de la capacidad antioxidante se obtuvieron para los aceites procedentes de aceitunas del estado de madurez RI2.

Para el *olivar 2*, los valores más elevados determinados mediante los métodos ABTS y CUPRAC también correspondieron a los aceites obtenidos de aceitunas en el estado de madurez RI2, sin embargo, con el método de FRAP no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras de aceite *Arb2-RI1* y *Arb2-RI2* y un ligero descenso en la capacidad antioxidante del aceite procedente de aceitunas más maduras (*Arb2-RI3*).

Finalmente, para el *olivar 3*, no se presentó diferencias significativas entre los valores de la capacidad antioxidante de los aceites determinado mediante los métodos utilizados, independientemente del grado de maduración de las aceitunas. Este resultado está en consonancia con los resultados del contenido en FT de los aceites procedentes de dicho olivar.

En general, los aceites procedentes del *olivar 1*, fueron los que presentaron mayores valores de capacidad antioxidante en comparación con los *olivares 2* y *3*, los cuales, a su vez, fueron los que presentaron un menor contenido en FT.

c) Estabilidad oxidativa

La estabilidad oxidativa de las muestras analizadas en este estudio mostraron una tendencia o evolución similar a la observada en el caso de los FT y a la capacidad antioxidante, durante el proceso de maduración de las aceitunas (**Tabla 4.12**).

Los aceites procedentes del *olivar 1* presentaron los valores más elevados en la estabilidad oxidativa coincidiendo con los resultados obtenidos en FT y capacidad antioxidante para las mismas muestras. Tomando en consideración el grado de madurez de las aceitunas, el aceite de este olivar presentó un valor de 55,3 h para el estado de madurez RI1, llegando a un máximo en el segundo estado de maduración (RI2) de 69,83 h, y disminuyendo hasta las 59,2 h para el aceite del estado de maduración (RI3).

En el caso del *olivar 2*, el aceite procedente de la variedad *arbequina* para el estado de madurez RI1 (*Arb2-RI1*) obtuvo un valor de estabilidad oxidativa de 30 h, el cual disminuyó hasta aproximadamente las 21-22 h para aceites elaborados en los estados de madurez RI2 y RI3, sin apreciarse diferencias significativas entre estos dos aceites.

Por último, en las muestras procedentes del *olivar 3*, se observó un ligero descenso aunque no significativo ($p > 0,05$) a medida que avanzó el estado de madurez de las aceitunas con valores de 36,5 h para la muestra *Arb3-RI1*, 33,3 h para la muestra *Arb3-RI2* y 30,1 h para la muestra *Arb3-RI3*.

En general se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los distintos olivares-muestra, indicando la importancia del entorno geográfico y climático de los olivares sobre las características físico-químicas de los aceites de oliva que se obtienen.

4.1.2.6. Análisis estadístico multivariable

El análisis de componentes principales (ACP) correspondiente a los olivares-muestra de la variedad *arbequina*, consideró todas las variables estudiadas, exceptuando los ácidos grasos de menor peso porcentual (C16:1, C18:0, C18:3 y C20:0), así como la relación entre ácidos grasos mono- y poli-insaturados (ratio MUFA/PUFA).

Los tres primeros componentes principales resultantes de la aplicación del ACP sobre los olivares-muestra, explicaron el 71,07% de la varianza total de la base de datos considerada. En la **Figura 4.10** y **Figura 4.11** se representan las variables estudiadas (parámetros de calidad y composición del aceite de oliva, así como los datos agronómicos de suelo, clima y paisaje) como función del primer (CP1) y segundo (CP2) componente principal. Mediante el CP1, correlacionado positivamente con parámetros como la pluviometría, el viento, el N total, los limos, la calcaria activa y las arcillas, y de forma negativa con la capacidad antioxidante (ABTS, FRAP, CUPRAC), los FT, la estabilidad oxidativa, la elevación, los carbonatos y la arena, pudo explicarse un 39,84%

de la variabilidad total. Por su parte, el CP2, representando un 18,66% de dicha variabilidad, quedó definido positivamente por la coordenadas de color b* y por el parámetro croma (C*), así como por el contenido en ácido oleico y el pH, y negativamente por la conductividad, el fósforo, el potasio, la coordenada de color a*, el ácido linoleico y la materia orgánica. Adicionalmente, con el tercer componente principal (CP3) se recogió otro 12,56% de la variabilidad total de la base de datos del olivar-muestra, presentando una fuerte correlación positiva con las variables de radiación, temperatura media anual y humedad relativa (**Tabla 4.13**).

Los olivares-muestra objeto de estudio se han representado en función del primer (CP1) y segundo (CP2) componente principal en la **Figura 4.10** y **4.11**. La distribución de los mismos en este plano pone de manifiesto su tendencia a distribuirse en tres grupos bien diferenciados. Sin embargo dentro de un mismo olivar-muestra no se observó una clara separación entre los diferentes grados de madurez de las aceitunas. Por este motivo, parece ser que los factores agroclimáticos son los que imprimen una huella más significativa sobre las características del aceite de oliva.

El *olivar 2* (Campanet) se separó claramente del resto al quedar localizado en el cuadrante I. Dicha posición respecto al eje CP1 se justifica en base a la elevada pluviometría, el grado de acidez, el coeficiente K_{232} , así como por un suelo rico en limos, calcaria activa y ser una zona ventosa, en comparación con los otros olivares objeto de estudio.

Tabla 4.13. Análisis de componentes principales de los olivares-muestra. Contribución de las variables a los tres primeros componentes principales

	CP1	CP2	CP3
GA	0,118	0,067	-0,149
IP	0,062	0,060	0,071
K ₂₃₂	0,133	0,089	-0,220
K ₂₇₀	-0,110	-0,074	-0,138
Estabilidad oxidativa	-0,260	0,015	0,066
Palmítico C16:0	0,096	-0,060	0,130
Oleico C18:1	-0,092	0,209	-0,169
Linoléico C18:2	0,069	-0,315	0,124
TF	-0,254	-0,015	0,039
ABTS	-0,228	0,098	0,068
CUPRAC	-0,247	0,006	0,057
FRAP	-0,212	0,064	0,084
L*	0,117	0,098	0,105
a*	0,010	-0,235	-0,104
b*	-0,055	0,226	0,121
C*	-0,054	0,227	0,121
h*	0,087	0,031	-0,071
Arenas	-0,233	-0,146	0,125
Linos	0,218	0,217	-0,041
Arcillas	0,254	0,070	0,094
Mat. Orgánica	0,156	-0,297	0,109
Carbonatos	-0,259	0,045	0,055
Calcaria Activa	0,226	0,171	0,086
pH	-0,079	0,157	0,218
Conductividad	-0,049	-0,331	0,225
N total	0,244	-0,112	0,114
C/N ratio	-0,242	-0,055	0,146
P asimilable	0,084	-0,354	0,102
K intercambiable	0,173	-0,282	0,085
Precipitación anual	0,161	0,257	0,149
Temperatura media	0,015	0,059	0,417
Humedad media	0,010	0,094	0,401
Radiación media	0,030	0,063	0,414
Viento	0,209	0,141	0,197
Elevación	-0,263	0,001	0,037

CP, componente principal

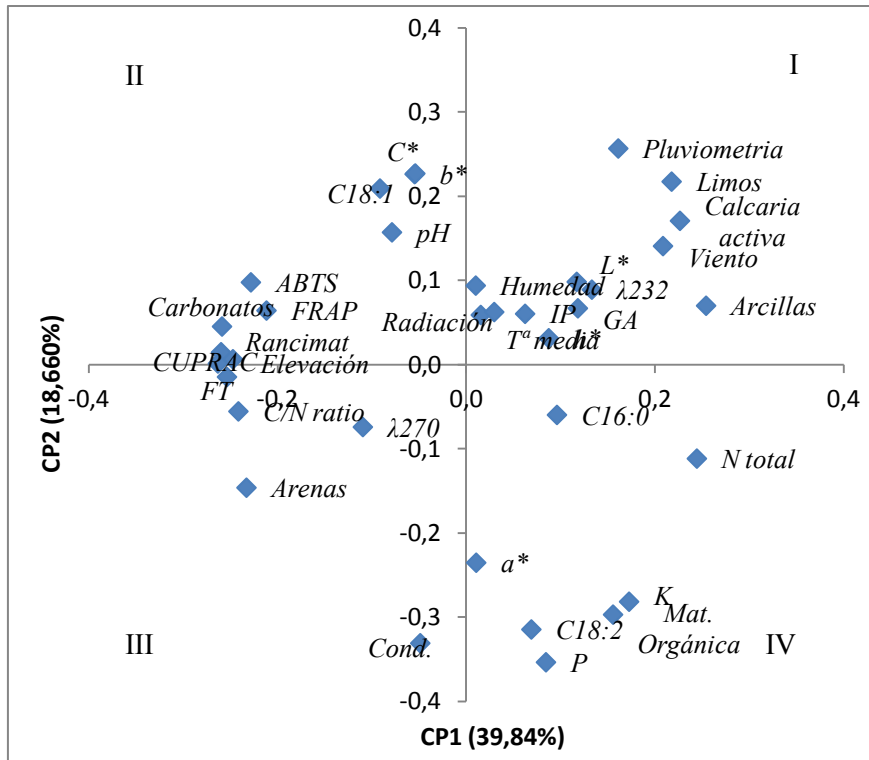


Figura 4.10. Representación gráfica de la distribución de las diferentes variables elegidas para realizar el análisis de componentes principales: CP1 vs. CP2.

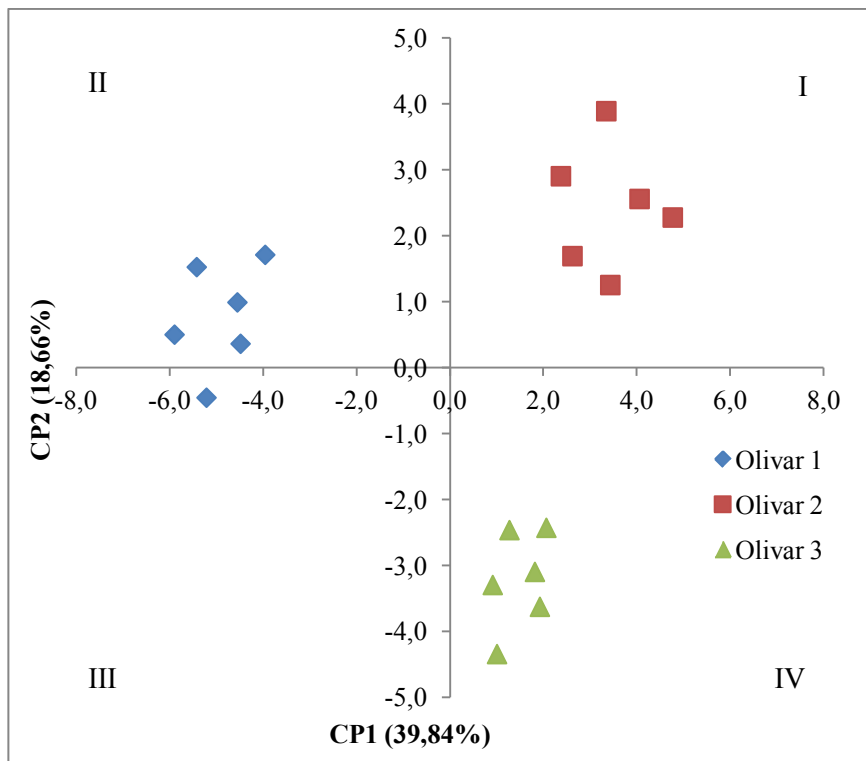


Figura 4.11. Representación de las muestras de aceite de oliva procedente de la variedad *arbequina*, en diferentes condiciones agroclimáticas como función del primer (CP1) y del segundo (CP2) componente principal.

Por su parte, el *olivar 3* (Cas Concos) constituyó un segundo grupo situándose en el cuarto cuadrante, mientras que el *olivar 1* (Algaida) se agrupó principalmente en el segundo cuadrante, caracterizado principalmente por presentar elevados contenidos en FT, capacidad antioxidante, estabilidad oxidativa, carbonatos, además de presentar la mayor elevación sobre el nivel del mar.

La representación de los olivares muestra en función del primer (CP1) y tercer (CP3) componente principal (**Figura 4.12** y **4.13**) mostró un patrón de distribución ligeramente distinto al establecido en la representación CP1 versus CP2. Se observó una clara diferenciación entre el *olivar 1* (Algaida) y el resto de los olivares-muestra objeto de estudio, en donde el eje de ordenadas hizo de barrera divisoria entre este olivar y los dos restantes.

En el presente estudio, los tres primeros componentes principales permitieron de forma conjunta la identificación de diferentes patrones de comportamiento de los olivares-muestra de acuerdo con su origen geográfico. Debido a su presencia en el primer componente principal, el contenido en FT, capacidad antioxidante, estabilidad oxidativa, elevación y pluviometría fueron los descriptores más importantes del patrón de distribución de los olivares-muestra en el plano formado por los diferentes componentes principales. De hecho, los olivares-muestra de las tres zonas en estudio se separaron principalmente a lo largo del CP1 (**Figura 4.11** y **Figura 4.13**). Ello se justifica de acuerdo con la literatura, según la cual estos descriptores ejercen un impacto significativo en el desarrollo de la aceituna y, consecuentemente, sobre las características finales del aceite de oliva (Ferreiro *et al.*, 1992; Dabbou *et al.*, 2010; Issaoui *et al.*, 2010; Youssef *et al.*, 2011; Di Vaio *et al.*, 2013).

El hecho de atribuir la calidad y las características propias del aceite de oliva a su origen o procedencia geográfica resulta de gran importancia tanto para los productores como para los consumidores. En las últimas décadas, diversos autores han estudiado la caracterización de los aceites de oliva a partir de su origen geográfico, aplicando la técnica ACP sobre una base de datos únicamente constituida por características propias del aceite de oliva tales como los parámetros de calidad, la composición fenólica, la capacidad antioxidante, y en algunos casos incluyendo la pluviometría y la elevación del terreno, aunque sin considerar las características propias del suelo, ni las condiciones agroclimáticas implicadas en su desarrollo.

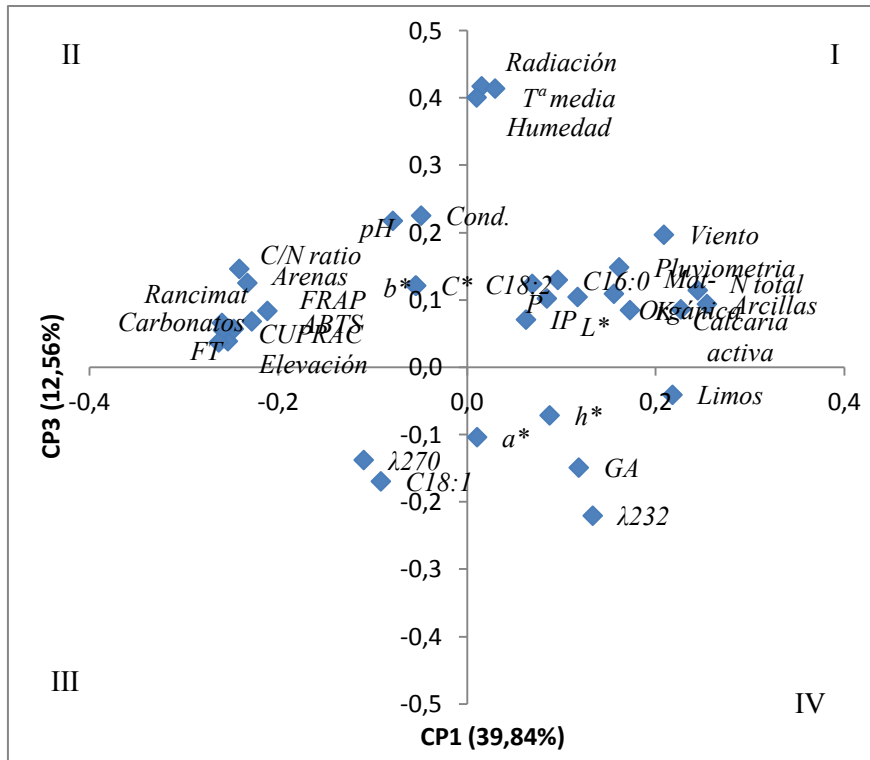


Figura 4.12. Representación gráfica de la distribución de las diferentes variables elegidas para realizar el análisis de componentes principales: CP1 vs. CP3.

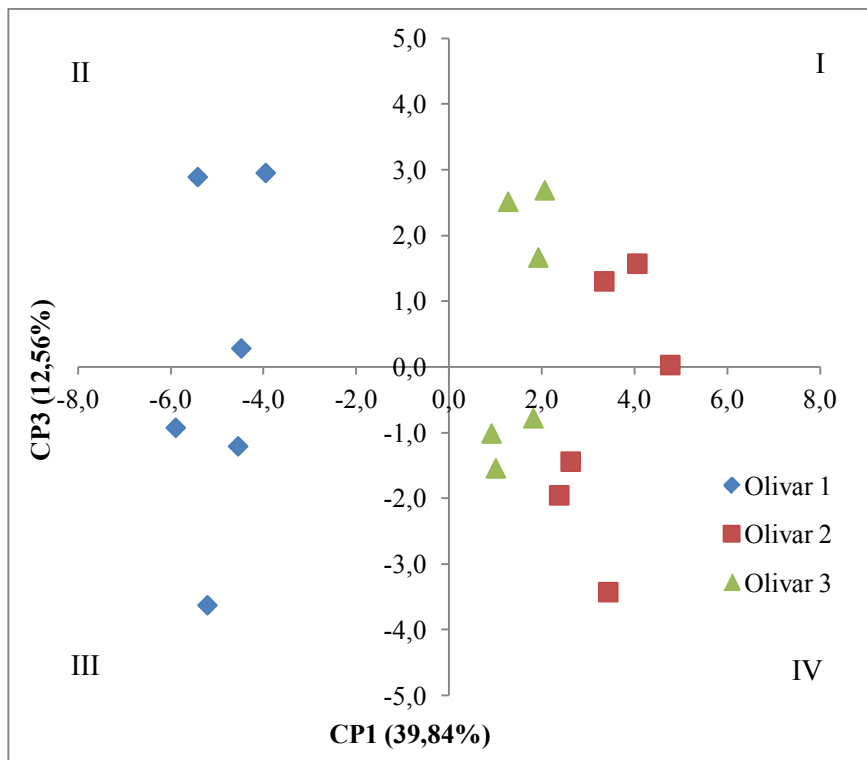


Figura 4.13. Representación de las muestras de aceite de oliva procedente de la variedad *arbequina* en diferentes condiciones agroclimáticas en función del primer (CP1) y del tercer (CP3) componente principal.

En este sentido hay que remarcar los trabajos de Youssef *et al.*, (2011), en el que se evaluó la calidad y la composición del aceite de oliva de dos áreas de producción de Túnez, en base a los parámetros de calidad, compuestos volátiles, elevación, temperatura y pluviometría media anual y humedad relativa, y el de Issaoui *et al.* (2010) en el cual se diferenciaron dos aceites tunecinos en función de la localización geográfica de los cultivos y de la pluviometría. No obstante, cabe destacar el hecho que no se hayan encontrado trabajos en los cuales se tengan en cuenta las características propias del suelo, como posible parámetro diferenciador entre los aceites de oliva producidos. Considerando que el aceite de oliva se considera el zumo de la aceituna, y que las características de éstas dependen del olivo y de los nutrientes que le aporta el suelo, es de vital importancia considerar estos parámetros como elementos diferenciadores entre aceites de oliva.

A modo de conclusión de este trabajo, se puede extraer que el aceite de oliva es un alimento vivo, y como tal, sus características físico-químicas y sensoriales están directamente relacionadas con la variedad de aceituna de la cual proviene, así como del grado de madurez de la misma, siendo el período del envero (segundo grado de madurez considerado) de la aceituna el más idóneo para elaborar el aceite de oliva, ya que es el momento en el cual existe un equilibrio entre todas las variables que conforman las características físico-químicas y organolépticas del aceite de oliva producido. Aunque los resultados obtenidos también sugieren que el entorno agroclimático en el cual se emplaza el olivar puede afectar de forma significativa a las características finales del aceite de oliva, siendo, según los resultados expuestos en este trabajo, los lugares menos lluviosos y más elevados sobre el nivel del mar, los que confieren al aceite más propiedades beneficiosas y de mayor estabilidad frente a la oxidación, al presentar los valores más elevados de FT, y en consecuencia la mayor capacidad antioxidante.

4.2. Conservación del aceite de oliva. Influencia de las variables de operación: atmosfera, luz, temperatura y ultrasonidos de potencia

Este estudio se planteó con el objetivo de establecer una metodología o procedimiento para la conservación del aceite de oliva virgen extra que garantice, el mayor tiempo posible, su calidad, así como la estabilidad de los parámetros físico-químicos y sensoriales dentro de los límites establecidos por el Reglamento CEE 2568/91 y posteriores modificaciones. Para la realización de este estudio se han utilizado dos aceites de oliva monovarietales elaborados a partir de aceitunas de las variedades *arbequina* (*Arb*) y *empeltre* (*Emp*).

Según la bibliografía expuesta en la introducción, parece evidente que para alargar la vida útil del aceite de oliva, es imprescindible controlar o actuar sobre los diferentes aspectos que provocan su oxidación. Entre estos factores destacan la temperatura, la ausencia/presencia de luz, y la presencia de oxígeno. Todos ellos se han tomado en consideración para la planificación experimental llevada a cabo. Como innovación del estudio se han utilizado los ultrasonidos (US) de potencia para la eliminación total o parcial del oxígeno disuelto en la matriz lipídica del aceite de oliva, intentando de esta forma minimizar, aun más, las posibles reacciones de oxidación.

4.2.1. Caracterización físico-química y sensorial de los aceites de oliva iniciales y los aceites pre-tratados con US de potencia

Una de las cuestiones que se plantearon en esta fase inicial del desarrollo de este proyecto fue conocer si el pre-tratamiento con US de potencia (aplicado siguiendo las condiciones descritas en la patente nº P25287ES00) producía cambios significativos en la calidad del aceite de oliva virgen extra, en este caso sobre los aceites monovarietales elaborados a partir de las aceitunas de las variedades *arbequina* y *empeltre*. Por tanto, el primer paso fue determinar si la aplicación de US de potencia (en forma de pulsos electrónicos) alteraba las propiedades físico-químicas y sensoriales del aceite de oliva, realizando un análisis exhaustivo de las muestras antes y después de la aplicación del tratamiento.

Los parámetros de calidad; GA, IP, los índices K_{270} y K_{232} , así como las características organolépticas fueron determinados tanto para las muestras originales como para las muestras tratadas con US de potencia, siguiendo la normativa

correspondiente a los Reglamentos (CEE) 2568/91 y (CE) 640/2008 de la UE, específicos para aceites de oliva.

4.2.1.1. Aceite de oliva monovarietal procedente de la variedad *arbequina*

En la **Tabla 4.14** se presentan los valores correspondientes a los parámetros físico-químicos de calidad del aceite de oliva procedente de la variedad *arbequina* con y sin pretratamiento con US de potencia. Tal y como puede observarse, según la normativa (CEE) 2568/91 y los parámetros analizados, ambos aceites pudieron clasificarse dentro de la categoría de aceite de oliva virgen extra. También hay que destacar los valores relativamente bajos del GA, corroborando la buena calidad del aceite de oliva y la poca presencia de ácidos grasos libres. El hecho más destacable fue que la aplicación de US de potencia no tuvo influencia (no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras de aceite con y sin pre-tratamiento con US) sobre los principales indicadores físico-químicos de calidad del aceite de oliva

Tabla 4.14. Caracterización inicial del aceite (*Arb*) con y sin tratamiento con US de potencia.

Muestra	GA	IP	K ₂₇₀	K ₂₃₂
Inicial	0,15 ± 0,01	10,15 ± 0,26	0,12 ± 0,01	2,16 ± 0,11
US	0,15 ± 0,07	9,14 ± 0,55	0,14 ± 0,01	2,34 ± 0,09
EVOO*	≤ 0,8	≤ 10,0	≤ 0,22	≤ 2,50

GA en % ácido oleico; IP en meq. O₂/Kg aceite

*Valores máximos para la categoría de aceite de oliva virgen extra (EVOO) según el Reglamento CEE 2568/91.

Por otra parte, y con la misma finalidad de observar el posible efecto del pretratamiento con US de potencia sobre la calidad del aceite de oliva, se llevó a cabo el análisis sensorial de las dos muestras de aceite (Inicial y US). En la **Figura 4.14** se refleja claramente como el pre-tratamiento con US (según el procedimiento descrito en la Patente P25827ES00) no produjo alteraciones significativas en las intensidades sensoriales de los diferentes atributos evaluados, y tampoco originó la aparición de algún tipo de defecto.

Como puede observarse en la **Figura 4.14A**, el aceite de oliva de la variedad *arbequina* se caracterizó por un frutado de aceituna medio ($5,2 \pm 0,2$ unidades de intensidad para la muestra inicial y $4,7 \pm 0,3$ para la muestra tratada con US). Cabe destacar el atributo dulce, con intensidades cercanas a $4,7 \pm 0,3$ en ambas muestras.

También se detectaron los atributos positivos de *verde hoja*, *picante* y *amargo*, los cuales presentaron intensidades similares en ambas muestras. En el caso de la *astringencia* la muestra inicial presentó valores de $1,2 \pm 0,6$ mientras que la aplicación de US provocó la práctica desaparición de este atributo. En cuanto al parámetro que engloba otros atributos tolerables destacaron el aroma a *almendra*, almendra verde, *nueces*, y *tomate*. Además, tal y como se observa en la **Figura 4.14B** el hecho de aplicar US no provocó la aparición de defecto organoléptico alguno.

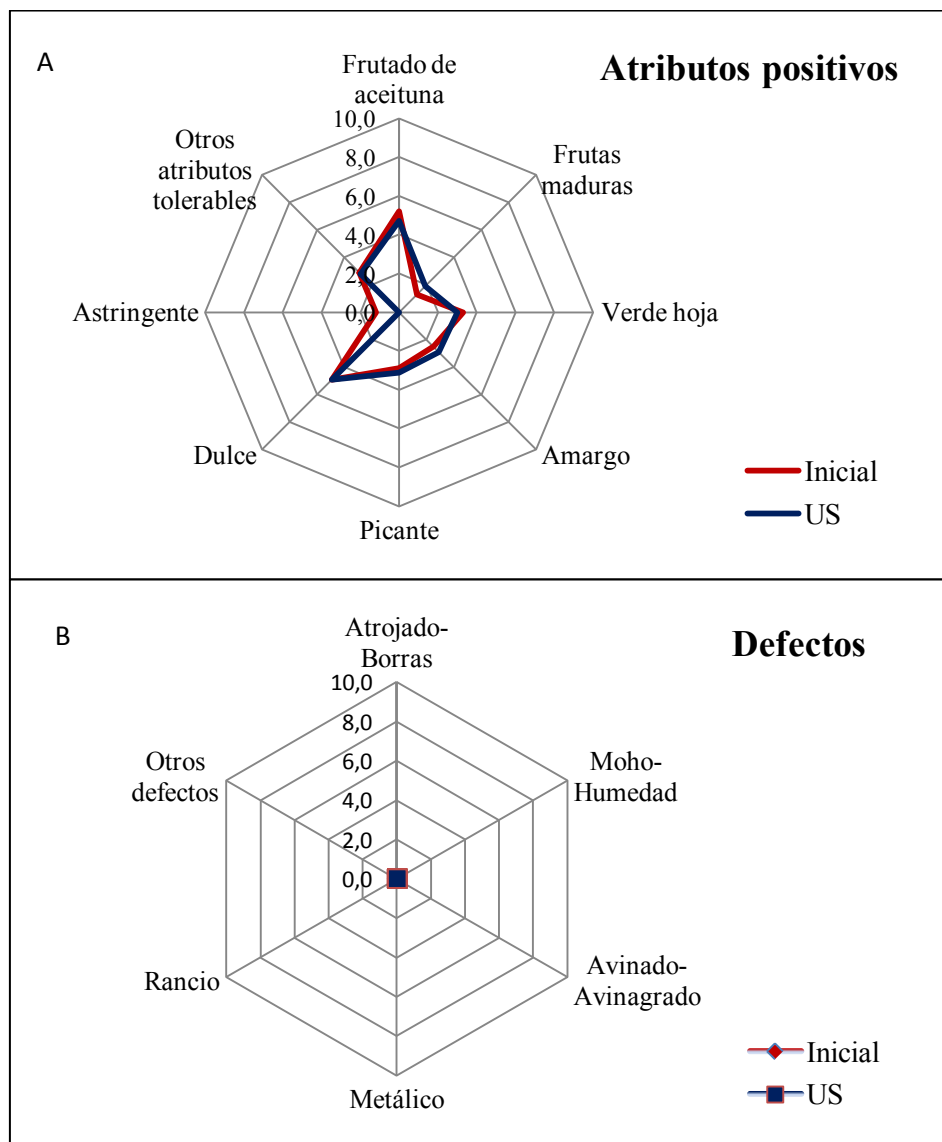


Figura 4.14. Clasificación de los atributos positivos (A) y defectos (B) para los aceites de la variedad *arbequina*, inicial y tratado con US, según el Panel Oficial de Cata de Cataluña

4.2.1.2. Aceite de oliva monovarietal procedente de la variedad *empeltre*

Al igual que en el caso anterior, se realizó un análisis inicial de los parámetros de calidad para comprobar que el pre-tratamiento con US de potencia no produjo alteraciones significativas en la calidad del aceite de oliva.

Como puede verse en la **Tabla 4.15**, no se observaron diferencias significativas entre los dos aceites de oliva considerados, lo cual indica que la aplicación de US de potencia no tuvo prácticamente influencia sobre los principales indicadores físico-químicos de la calidad del aceite.

Sin embargo, es interesante destacar el elevado GA que presentaron las muestras, con un valor muy próximo al límite establecido por la legislación europea (Reglamento CEE 2568/91) para la categoría virgen extra. Esta situación, tal y como se verá a lo largo del trabajo, tuvo una gran relevancia en el comportamiento del aceite de oliva durante el período de conservación.

Tabla 4.15. Caracterización inicial del aceite (Emp) con y sin tratamiento con US de potencia.

Muestra	GA	IP	K ₂₇₀	K ₂₃₂
Inicial	0,70 ± 0,10	10,00 ± 1,50	0,11 ± 0,02	1,63 ± 0,03
US	0,70 ± 0,10	10,00 ± 1,40	0,11 ± 0,03	1,64 ± 0,04
EVOO	≤ 0,8	≤ 10,0	≤ 0,22	≤ 2,50

GA en % ácido oleico; IP en meq. O₂/Kg aceite

*Valores máximos para la categoría aceite de oliva virgen extra (EVOO) según el Reglamento CEE 2568/91.

El análisis sensorial descriptivo realizado por el Panel Oficial de Cata de Cataluña permitió profundizar en la caracterización y valoración sensorial de cada uno de los atributos positivos del aceite monovarietal de la variedad *empeltre*, permitiendo su comparación con el aceite de oliva pre-tratado con US de potencia.

La caracterización organoléptica de la muestra inicial y de la muestra pre-tratada con US de potencia se muestra en la **Figura 4.15**. Al igual que en el caso de la variedad *arbequina*, el pre-tratamiento con US no alteró los resultados del análisis sensorial con respecto a la muestra de aceite inicial no tratada.

El aceite de oliva de la variedad *empeltre* se caracterizó por presentar un frutado de aceituna medio ($5,0 \pm 0,4$ unidades de intensidad para la muestra inicial y $4,6 \pm 0,3$

para la muestra tratada con US) (**Figura 4.15A**), destacando también los atributos *picante*, *amargo* y *verde hoja*, sin ser demasiado *asringente*. En el apartado de otros atributos tolerables destacan el aroma a almendra, nueces, alcachofa y tomatera. Además, al igual que para la variedad *arbequina* el hecho de realizar el pre-tratamiento con US no provocó la aparición de defectos organolépticos (**Figura 4.15B**)

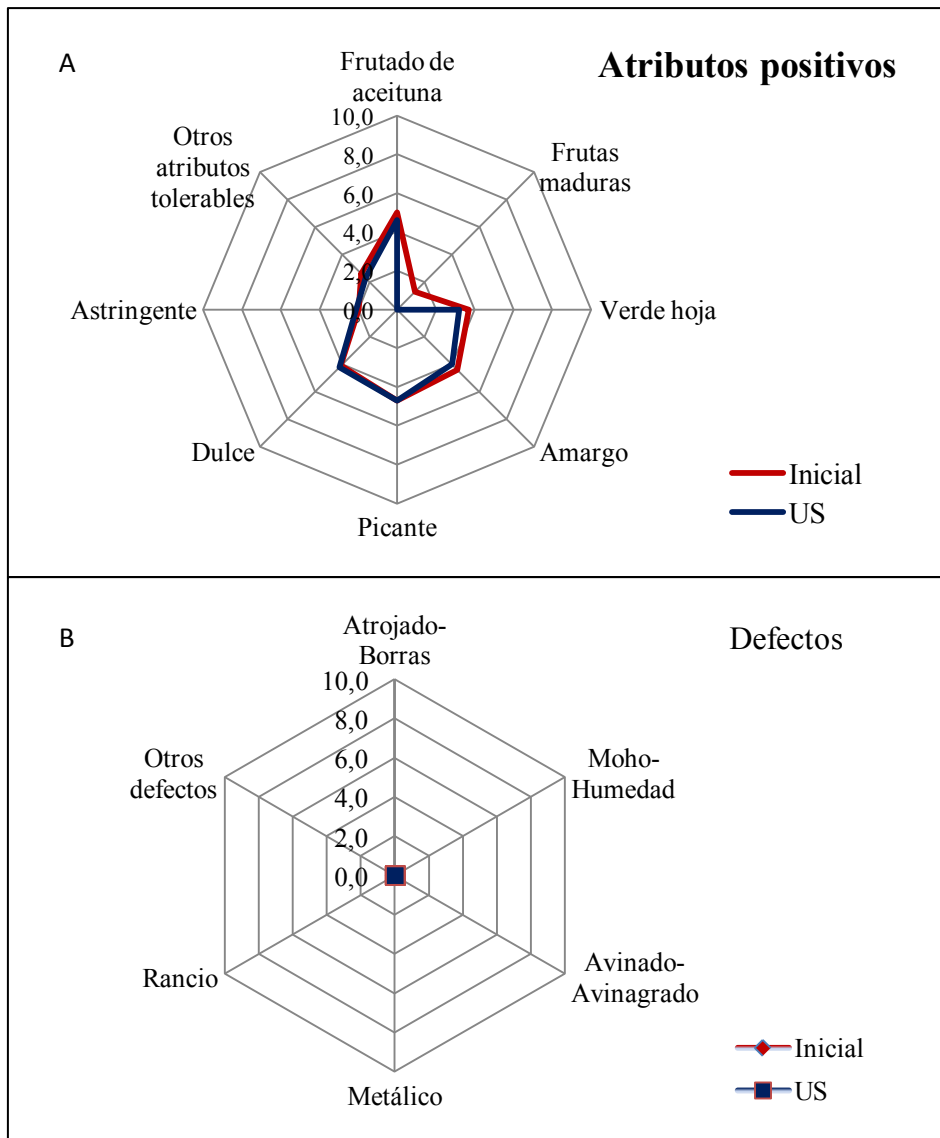


Figura 4.15. Clasificación de los atributos positivos (A) y defectos (B) para los aceites de la variedad *empeltre*, *inicial* y *tratado con US*, según el Panel Oficial de Cata de Cataluña.

El hecho de no deteriorar el aceite de oliva mediante la aplicación de US de potencia, permitió incorporar ambas muestras de aceite (*arbequina* y *empeltre*) pre-tratadas en los estudios de vida útil junto con las demás muestras sometidas a diferentes procedimientos de conservación.

4.2.2. Evolución de los parámetros físico-químicos del aceite de oliva virgen extra durante el periodo de conservación

Como se ha indicado en la caracterización del aceite de oliva, este estudio se inició con dos aceites de oliva con GA bien diferenciados, por una parte un aceite de oliva con un GA bajo (0,15 % ácido oleico), procedente de la variedad *arbequina* (*Arb*), y, por otra, con un aceite de oliva con un GA próximo al límite legislado para la categoría virgen extra (0,74 % ácido oleico), procedente de la variedad *empeltre* (*Emp*).

Las muestras de aceite conservadas bajo diferentes condiciones de almacenamiento fueron sometidas a un control periódico de los principales parámetros físico-químicos y sensoriales con la finalidad de determinar la influencia de las diferentes variables: atmósfera inerte, ausencia de luz y baja temperatura sobre la calidad del aceite de oliva, además se incorporó una nueva metodología basada en el pre-tratamiento con US.

A lo largo del seguimiento de la evolución de las diferentes muestras se determinaron, tanto los principales indicadores de calidad establecidos por la legislación europea, es decir, GA, IP y coeficientes de extinción K_{232} y K_{270} , así como otros parámetros de gran interés como son el perfil de ácidos grasos, el contenido en FT y la estabilidad oxidativa.

4.2.2.1. Evolución del grado de acidez (GA)

La materia biológicamente sintetizada es neutra, por tanto la existencia de ácidos grasos libres en el aceite de oliva se considera una anomalía o un desorden molecular consecuencia del mal estado de conservación de las aceitunas, de una mala práctica en la elaboración del aceite o de una mala conservación del aceite de oliva.

Actualmente, el GA se utiliza como primer criterio de clasificación del aceite de oliva en todas las almazaras, no obstante, varios autores defienden que por sí solo no es un buen indicador de la calidad del aceite de oliva, ya que por ejemplo, un aceite con un valor de GA relativamente alto puede poseer un buen aroma y obtener una buena calificación por parte de un panel de cata, mientras que otro aceite de oliva con menor GA puede carecer de aroma (Kiritsakis, 1998; Pristouri *et al.*, 2010).

a) Variedad *arbequina*

En la **Figura 4.16**, se muestra la evolución del GA para el aceite de la variedad *arbequina* a lo largo de los 16 meses de conservación bajo las diferentes metodologías estudiadas.

Se ha representado en color rojo el valor máximo del GA por el cual el aceite de oliva puede considerarse como virgen extra según el Reglamento Europeo CEE nº 2568/91. Como se refleja en la **Figura 4.16**, durante todo el tiempo de almacenamiento considerado, los valores del GA permanecieron muy por debajo de este límite (de hecho, el valor del GA fue siempre inferior al 0,22 % ácido oleico) traduciéndose en un bajo contenido en ácidos grasos libres responsables de posibles procesos de auto-oxidación.

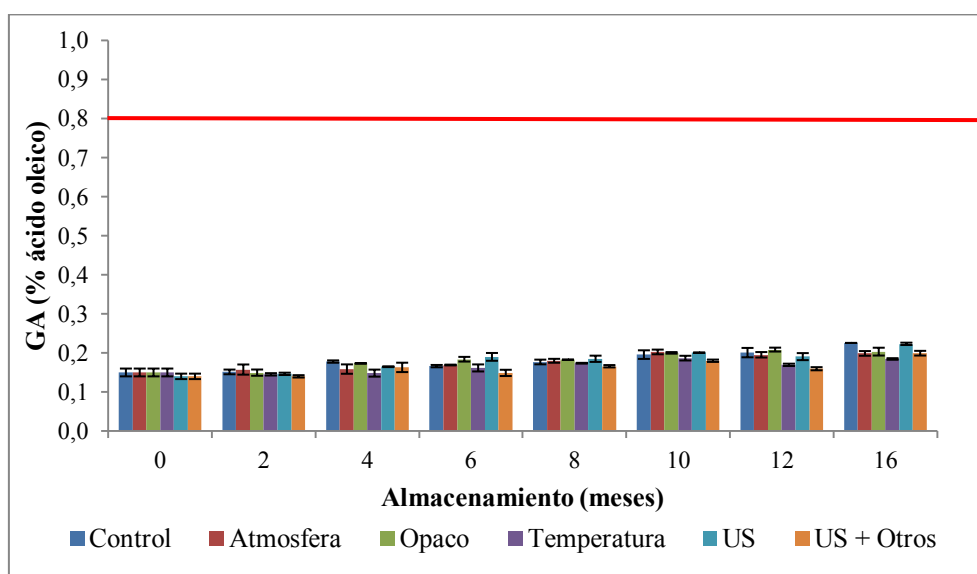


Figura 4.16. Evolución del GA con el tiempo de almacenamiento para las diferentes metodologías de conservación aplicadas al aceite de oliva procedente de la variedad *arbequina*.

**no encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para los valores del GA a lo largo del estudio de conservación, ni entre metodologías estudiadas*

Aun así se observó un ligero, pero significativo ($p < 0,05$) incremento en los valores del GA a lo largo de los 16 meses que duró el estudio con valores que van del 0,15 % ácido oleico a tiempo 0 hasta 0,23 % ácido oleico a los 16 meses para la muestra *Control*; 0,20 % ácido oleico en el caso de las muestras almacenadas bajo atmosfera inerte; 0,20 % ácido oleico para las muestras conservadas en ausencia de luz; 0,18 % ácido oleico en las muestra almacenadas a baja temperatura; 0,22 % ácido oleico en las muestra pre-tratadas con US y, finalmente, 0,20 para las muestras en las que sé

consideraron todas las variables anteriores (*US + Otras*). Teniendo en cuenta estos valores, parece ser que la temperatura fue el factor externo más influyente para controlar el incremento del GA en el aceite de oliva. Según dicho parámetro, se puede hacer una primera valoración de la estabilidad y la buena calidad de dicho aceite, fruto del buen hacer y las buenas prácticas en cuanto a la recogida del fruto y la elaboración del aceite de oliva.

b) Variedad *empeltre*

La evolución del GA del aceite de oliva de la variedad *empeltre* bajo las diferentes metodologías de conservación se representan en la **Figura 4.17**. Al igual que en el caso anterior, la línea roja indica el valor máximo del GA para la categoría virgen extra.

Como ya se ha indicado, el análisis inicial de este aceite de oliva presentó un valor de GA de 0,75 % de ácido oleico, valor muy próximo al límite para la categoría virgen extra (Reglamento CEE 2568/91). El elevado valor del GA supone, no solo el disponer de muy poco margen de variación para no abandonar la máxima categoría, sino también la presencia de ácidos grasos libres que pueden provocar importantes procesos de auto-oxidación (Kiritsakis *et al.*, 1992; Frega *et al.*, 1999; Bendini *et al.*, 2009).

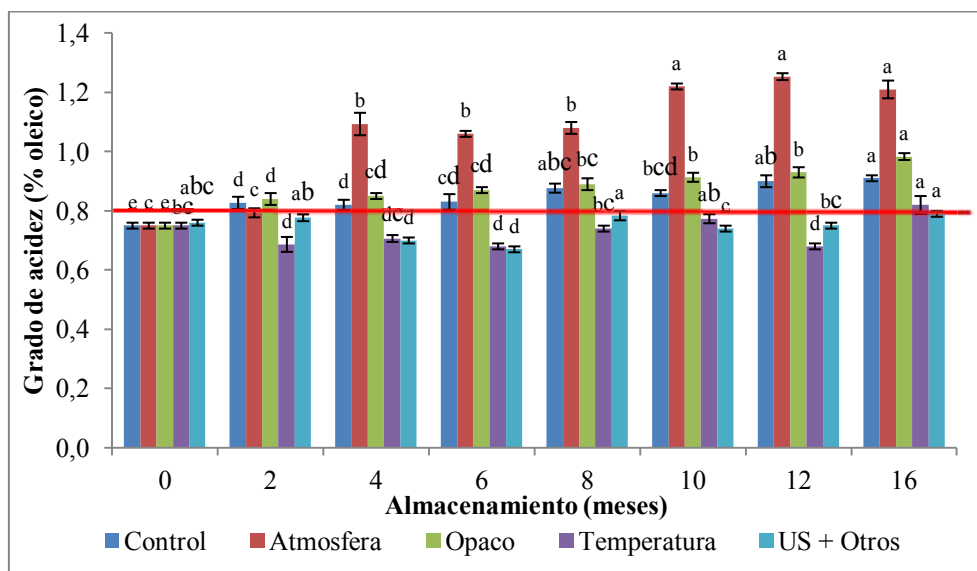


Figura 4.17 Evolución del GA con el tiempo de almacenamiento para las diferentes metodologías de conservación aplicadas al aceite de oliva procedente de la variedad *empeltre*.

Diferentes letras indican diferencias significativas en función del tiempo de conservación ($p < 0,05$) para cada tratamiento.

Como puede observarse en la **Figura 4.17** el GA correspondiente tanto a las muestras almacenadas a baja temperatura (*Temperatura*) como a las muestras pre-

tratadas con US, prácticamente no experimentaron cambios significativos a lo largo de los 16 meses de almacenamiento, manteniéndose siempre por debajo del límite establecido para la categoría de aceite virgen extra. Los demás tratamientos (control, atmosfera inerte y ausencia de luz) presentaron un aumento progresivo y significativo ($p > 0,05$) a lo largo del período de conservación. En el caso de la muestra conservada en atmosfera inerte se observó un aumento brusco en el GA a partir del cuarto mes de almacenamiento. Sin embargo, la muestra conservada en ausencia de luz (*opaco*) exhibió un aumento del GA gradual con el tiempo, obteniendo un valor de 0,82 % de ácido oleico a partir del segundo mes de conservación, lo que se traduce en la pérdida de la máxima categoría para el aceite de oliva. El mismo efecto se observó en la muestra control.

A pesar del aumento del GA de las muestras *control* y *opaco* en ningún caso sobrepasaron el valor de 1 % de ácido oleico durante los 16 meses. En el caso de la muestra conservada en atmosfera inerte (atmosfera) el valor más alto del GA fue de 1,2 % de ácido oleico, pudiendo clasificarse en la categoría virgen. Estos datos ponen de manifiesto que, a pesar de iniciar el estudio con un aceite que presentó valores elevados de GA, dicho aceite de oliva pudo clasificarse, en el peor de los casos, dentro de la categoría de aceite de oliva virgen. Este hecho indica la gran estabilidad oxidativa que presenta el aceite de oliva de la variedad *empeltre*.

A partir de la evolución del GA se observa que, cuando el aceite de oliva presenta inicialmente valores elevados del GA, solo la conservación a baja temperatura (con y sin US) es eficaz para frenar el avance del GA y, por consiguiente, mantener su categoría comercial.

Varios autores han estudiado la evolución de los parámetros de calidad, y entre ellos el GA, en diferentes aceites de oliva almacenados bajo diferentes condiciones como la ausencia/presencia de luz (Caponio *et al.*, 2005; Vacca *et al.*, 2006, Pristouri *et al.*, 2010), el uso de atmosferas inertes o modificadas y la aplicación de diferentes temperaturas (Di Giovacchino *et al.*, 2002; Pristouri *et al.*, 2010; Krichene *et al.*, 2010), llegando todos ellos a una misma conclusión: el aceite de oliva experimenta un aumento del GA durante el periodo de almacenamiento debido a la aparición de compuestos generados en las reacciones de degradación de los triglicéridos. En la mayor parte de los estudios citados anteriormente, el aumento del GA es menor si se minimizan las fuentes potencialmente oxidativas, es decir, para una misma temperatura, el aumento del GA de

un aceite de oliva conservado en atmósfera inerte es menor que el conservado en atmósfera no inerte, y lo mismo pasa con la ausencia de luz y la baja temperatura. Estas observaciones parecen ser ciertas si se parte de un aceite de oliva que presenta un GA bajo, en el cual predominan las reacciones de oxidación iniciadas por factores externos (luz, temperatura y oxígeno) sobre las reacciones de auto-oxidación (provocadas por los mismos ácidos grasos libres). En todos los estudios citados anteriormente, el aceite en estudio presentaba, un valor de GA inicial situado entre 0,2 – 0,4% de ácido oleico, de forma que el factor limitante en las reacciones de oxidación viene dado por los diferentes factores externos.

Los aceites que inicialmente presentan un valor elevado de GA, como en este caso el aceite procedente de la variedad *empeltre* (0,74 % ácido oleico), disponen de una cantidad relativamente importante de ácidos grasos libres que, dado a su carácter pro-oxidante, pueden promover reacciones de auto-oxidación. Así, en este caso, el hecho de proteger el aceite del oxígeno o la luz, no consigue minimizar los procesos de oxidación (Bendini *et al.*, 2009). Los resultados de este estudio indicaron que el grado de oxidación, puede minimizarse al conservar a baja temperatura, ya que de esta forma se actúa sobre la movilidad de las moléculas. Este fenómeno podría explicar el porqué, las muestras conservadas en atmósfera inerte y ausencia de luz exhibieron un aumento significativo del valor de GA durante el almacenamiento.

4.2.2.2. Evolución del índice de peróxidos (IP)

Este parámetro ofrece información sobre el estado de oxidación del aceite de oliva. Valores elevados del IP son indicativos de la presencia de importantes cantidades de oxígeno activo en la matriz del aceite de oliva, y por tanto, pueden darse diferentes reacciones de oxidación, traduciéndose en una pérdida de calidad.

a) Variedad *arbequina*

En el caso de la variedad *arbequina*, el estudio de conservación se inició con valores de IP cercanos a los 10 meqO₂/kg aceite sin observarse diferencias significativas entre las muestras con y sin pretratamiento con US. La evolución del IP a lo largo del período de conservación para cada una de las metodologías aplicadas se presenta en la **Figura 4.18**. Análogamente al caso del GA, la línea roja representa el valor máximo al que puede llegar el IP para poder clasificar el aceite de oliva dentro de la categoría virgen extra.

En términos generales e independientemente de la metodología de conservación, se observó un aumento progresivo de este parámetro, llegando a un máximo alrededor de los 6 – 10 meses de conservación, a partir del cual, dicho parámetro experimentó un ligero descenso hasta llegar a los 16 meses. No obstante, en ningún momento se sobrepasó el límite para la categoría virgen extra.

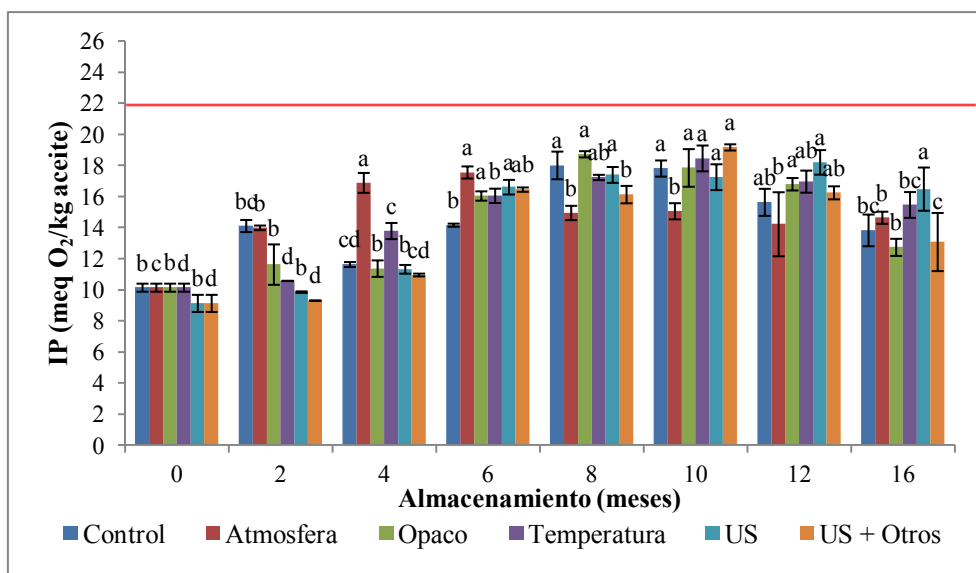


Figura 4.18. Evolución del IP con el tiempo de almacenamiento para las diferentes metodologías de conservación aplicadas al aceite de oliva procedente de la variedad *arbequina*.

Diferentes letras indican diferencias significativas en función del tiempo de conservación ($p < 0,05$).

Esta misma tendencia fue observada por Vacca *et al.*, (2006) al estudiar la conservación del aceite de oliva de la variedad *Bosana* almacenada en ausencia y en presencia de luz. En ambos casos, el IP aumentó progresivamente hasta llegar a un máximo (8,07 meq.O₂/kg de aceite) entorno a los 4 - 6 meses de conservación, con la posterior disminución (5,91 meq.O₂/Kg aceite) hasta los 16 meses.

b) Variedad *empeltre*

En el caso de la variedad *empeltre*, tal y como puede observarse en la **Figura 4.19** el valor de IP, también se mantuvo por debajo del límite legislado para la categoría virgen extra durante los 16 meses de almacenamiento. En general, se observó una tendencia similar en todas la metodologías de conservación estudiadas, para las cuales el IP se mantuvo prácticamente constante hasta los 6 meses de conservación, a partir del cual los valores de dicho parámetro de calidad experimentaron un incremento progresivo hasta el final del estudio.

Esta tendencia es similar a la descrita en los estudios de Di Giovacchino *et al.*, (2002) y Caponio *et al.*, (2005), los cuales observaron un aumento en el valor del IP a medida que avanzaba el período de conservación, para muestras de aceite de oliva almacenado a baja temperatura y en atmósfera inerte. No obstante, estos mismos autores, describieron que dicho incremento en los valores de IP fue menor cuando se minimizaban los factores oxidantes. Este hecho parece estar en aparente contradicción con lo observado en el presente estudio realizado con la variedad *empeltre*, ya que debería esperarse que las muestras consideradas como control, deberían presentar valores de IP superiores a las otras metodologías, ya que se actuó sobre la fuente de oxidación. Una posible explicación a esta contradicción podría deberse al hecho de iniciar el estudio con un aceite de oliva de elevado GA, ya que ello supone un factor a tener en cuenta en el aumento de las reacciones de auto-oxidación, pudiendo ser incluso más importante que las oxidaciones promovidas por factores externos.

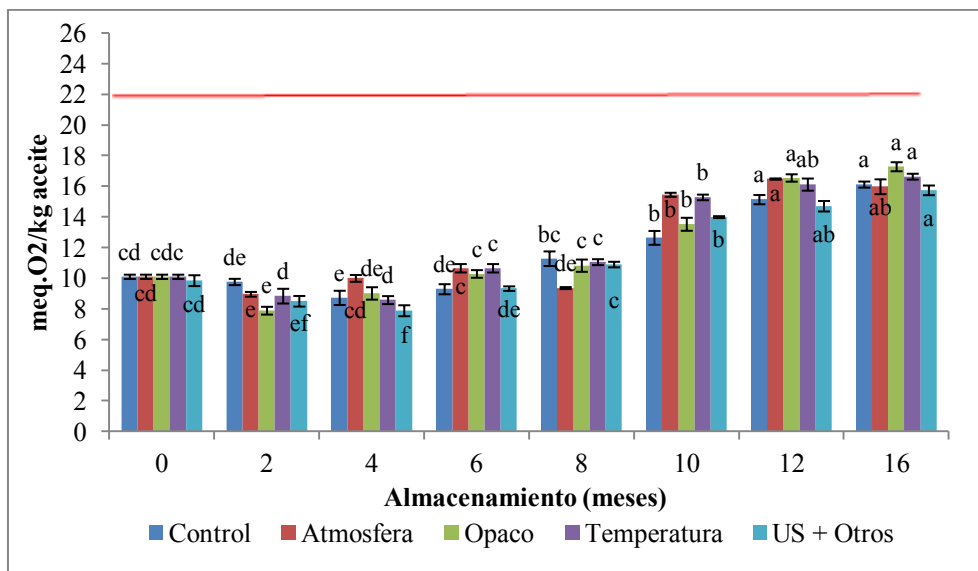


Figura 4.19. Evolución del IP con el tiempo de almacenamiento para las diferentes metodologías de conservación aplicadas al aceite de oliva procedente de la variedad *empeltre*.

Diferentes letras indican diferencias significativas en función del tiempo de conservación ($p < 0,05$).

4.2.2.3. Evolución del coeficiente de extinción K_{232}

El coeficiente de extinción K_{232} informa sobre la presencia de compuestos de oxidación primaria como son los peróxidos e hidroperóxidos. Según la normativa Europea (Reglamento CCE 2568/91), valores superiores a 2,5 de este parámetro hacen que el aceite de oliva no pueda clasificarse dentro de la categoría virgen extra.

a) Variedad *arbequina*

En la **Figura 4.20** se muestra la evolución del coeficiente de extinción K_{232} para las diferentes muestras de aceite, elaboradas a partir de aceitunas de las variedad *arbequina*, durante el periodo de almacenamiento. La línea roja representa el valor máximo de este parámetro para la categoría virgen extra.

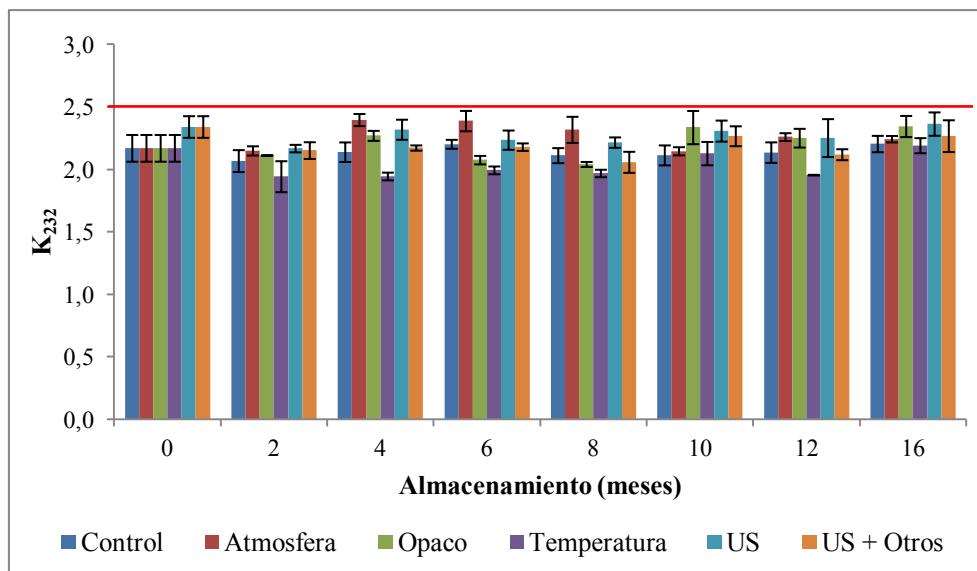


Figura 4.20. Evolución del coeficiente de extinción K_{232} con el tiempo de almacenamiento para las diferentes metodologías de conservación aplicadas al aceite de oliva procedente de la variedad *arbequina*.

Cómo puede observarse en la **Figura 4.20**, los valores de K_{232} tomaron valores entorno a 2,2 y no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) a lo largo de los 16 meses de conservación. Tampoco se observaron diferencias significativas para este parámetro entre las diferentes metodologías de conservación estudiadas. Además, los valores de este parámetro se encontraron, en todo momento y para todas las muestras, por debajo del valor máximo legislado, por lo que los aceites podrían clasificarse como aceite de oliva virgen extra según la normativa vigente.

Estos resultados no siguen la tendencia observada por otros autores tales como Caponio *et al.*, (2005) quienes observaron un aumento gradual en el valor de K_{232} a medida que avanzaba el período de almacenamiento, siempre llegando a la conclusión, de que a medida que se actúa sobre la fuente potencial de oxidación (luz, oxígeno y temperatura) dicho aumento es menor comparándola con una muestra control.

b) Variedad *empeltre*

A diferencia de la variedad *arbequina*, para la variedad *empeltre*, los valores correspondientes del coeficiente de extinción K_{232} aumentaron de forma progresiva a lo largo de los 16 meses de almacenamiento (**Figura 4.21**). Estos resultados presentan cierta similitud con la evolución del IP durante el proceso de almacenamiento bajo las mismas condiciones de conservación. De hecho, son varios los autores que definen una buena correlación entre los parámetros K_{232} e IP durante las etapas de almacenamiento bajo las condiciones de ausencia/presencia de luz (Caponi *et al.*, 2005) o en atmósfera inerte (Di Giovacchino *et al.*, 2002).

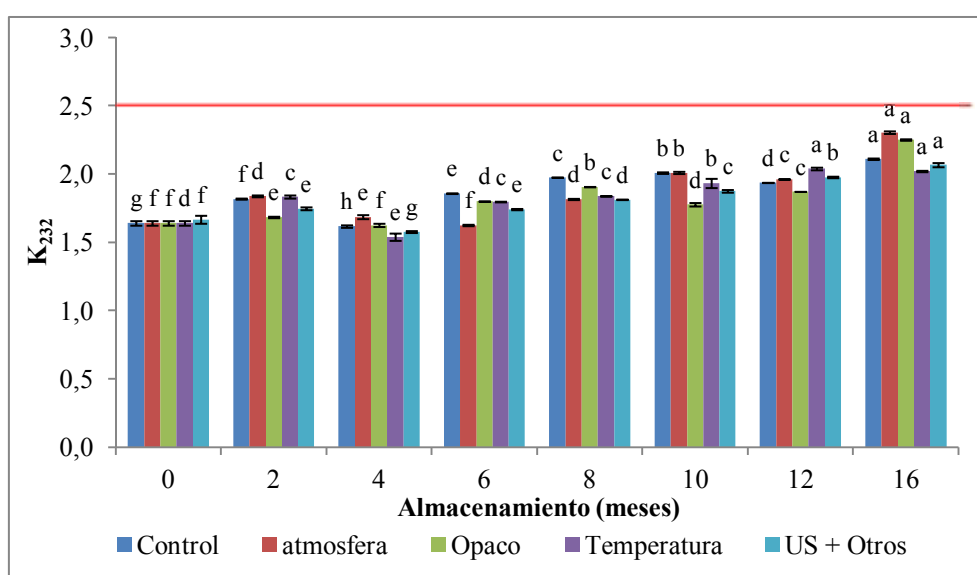


Figura 4.21. Evolución del coeficiente de extinción K_{232} con el tiempo de almacenamiento para las diferentes metodologías de conservación aplicadas al aceite de oliva procedente de la variedad *empeltre*.

Diferentes letras indican diferencias significativas en función del tiempo de almacenamiento ($p < 0,05$).

Sin embargo, hay que destacar que en todo momento y para todos los tratamientos los valores de este parámetro se encontraron por debajo del valor máximo legislado, apoyando la hipótesis de la elevada estabilidad del aceite de oliva de la variedad *empeltre*.

4.2.2.4. Evolución del coeficiente de extinción K_{270}

A diferencia del parámetro anterior, el coeficiente de extinción K_{270} está relacionado con la presencia de compuestos formados a partir de reacciones de oxidación secundaria como son aldehídos, cetonas, etc.

a) Variedad *arbequina*

En la **Figura 4.22** se muestra la evolución del coeficiente de extinción a 270 nm en función de las diferentes metodologías de conservación consideradas a lo largo de los 16 meses. Los valores de K_{270} , no presentaron una evolución clara a medida que avanzó el período de conservación, para ninguna de las metodologías de almacenamiento ensayadas.

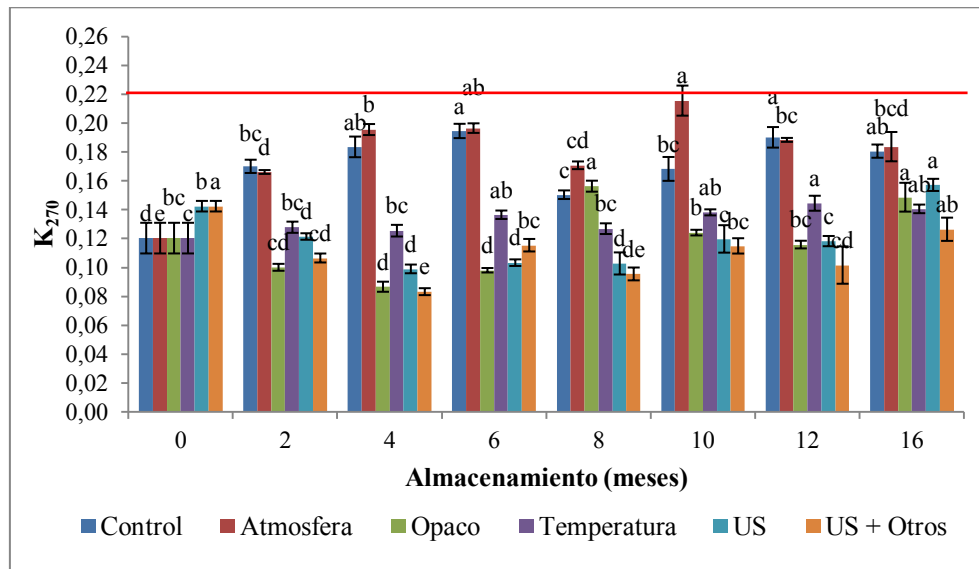


Figura 4.22. Evolución del coeficiente de extinción K_{270} con el tiempo de almacenamiento para las diferentes metodologías de conservación aplicadas al aceite de oliva procedente de la variedad *arbequina*.

Diferentes letras indican diferencias significativas en función del tiempo de almacenamiento ($p < 0,05$)

De forma parecida a lo observado con el parámetro K_{232} , y teniendo en cuenta el valor máximo por el cual un aceite de oliva puede alcanzar sin perder la clasificación de virgen extra (0,22), puede verse como los valores experimentales, en todos los análisis y para todas la metodologías de conservación, se encuentran claramente por debajo de este valor (línea roja).

Siguiendo la evolución de este parámetro con el tiempo de almacenamiento y para cada metodología de conservación, el parámetro K_{270} aumentó de manera significativa ($p < 0,05$) a lo largo del período de almacenamiento de las muestras conservadas a 20 °C (*control*), en atmósfera modificada (*atmosfera*), en ausencia de luz (*opaco*), y en menor proporción, en las muestras conservadas a baja temperatura y las pre-tratadas con ultrasonidos de potencia a 20°C (*US*). Mientras que las muestras pre-tratadas con ultrasonidos de potencia y conservadas a 4 – 6 °C (*US + Otros*) no se presentaron

diferencias significativas ($p < 0,05$) durante los 16 meses en de l estudio de conservación.

Estos resultados son comparables con los obtenidos por Gutiérrez *et al.*, (2002) al estudiar el efecto de la temperatura (30 y 2 °C) sobre aceites precedentes de las variedades *picual* y *hojiblanca* a lo largo de 6 meses de almacenamiento, quienes describieron como el parámetro K_{270} experimentó un progresivo aumento a lo largo de los 6 meses de conservación en las muestras conservadas a 30 °C, mientras que las muestras conservadas a baja temperatura el parámetro K_{270} permaneció constante. Por otra parte, en trabajos en los cuales se estudia el efecto de la ausencia/presencia de luz (Di Giovacchino *et al.*, 2002) o el uso de atmosfera inertes (Caponio *et al.*, 2005), tampoco se observaron diferencias significativas en los valores de K_{270} a lo largo del período de almacenamiento.

b) Variedad *empeltre*

En el estudio de conservación para el aceite de la variedad *empeltre*, la evolución del parámetro K_{270} se muestra en la **Figura 4.23**.

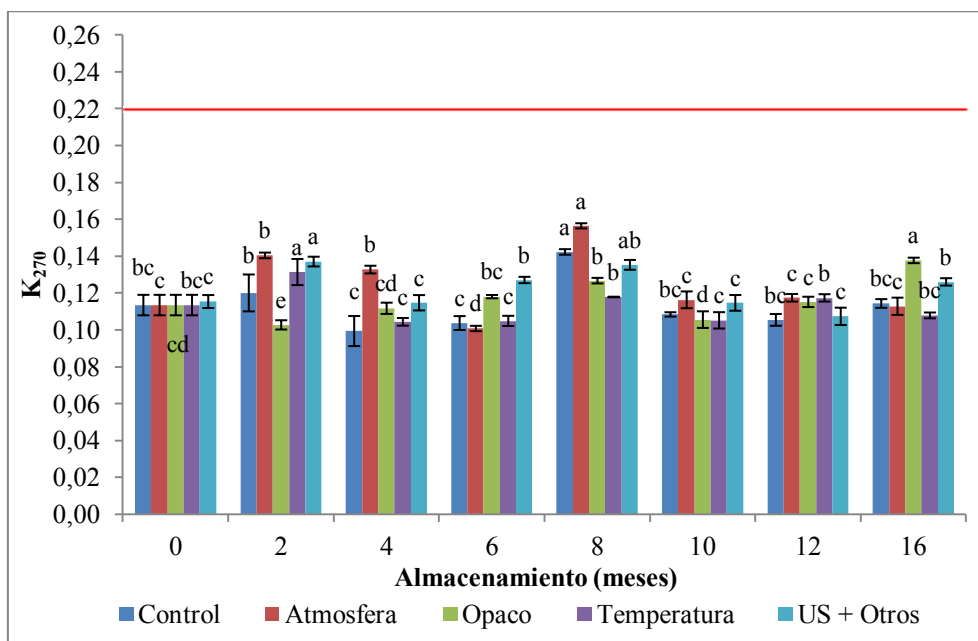


Figura 4.23. Evolución del coeficiente de extinción K_{270} con el tiempo de almacenamiento para las diferentes metodologías de conservación aplicadas al aceite de oliva procedente de la variedad *empeltre*.

Diferentes letras indican diferencias significativas a lo largo del almacenamiento ($p < 0,05$).

Como puede observarse los valores para este parámetro no presentaron, en general, variaciones significativas ($p < 0,05$) a lo largo del período de conservación para ninguna de las metodologías de almacenamiento evaluadas.

Además, no se observaron diferencias importantes entre las diferentes metodologías de conservación, ni tampoco entre las muestras almacenadas con y sin pretratamiento con US. Cabe destacar, que en todo el proceso de almacenamiento del aceite de oliva, independientemente de la metodología de conservación, los valores de K_{270} se encontraron muy por debajo del límite legislado para la categoría virgen extra.

Estas observaciones están, en general, de acuerdo con los trabajos de Di Giovacchino *et al.*, (2002), los cuales tampoco observaron cambios significativos durante el almacenamiento de muestras de aceite de oliva virgen, conservadas en atmósfera con gas inerte y en aire en el espacio de cabeza. Además, en el estudio de Caponio *et al.*, (2005) donde se analizaba el efecto de la presencia de luz sobre la conservación del aceite de oliva, tampoco se detectaron cambios significativos del parámetro K_{270} con el tiempo para las muestras conservadas en ausencia de luz.

4.2.3. Evolución del perfil de ácidos grasos

Los ácidos grasos representan entre el 98,5 y el 99,5% de la fracción saponificable (fracción mayoritaria en el aceite de oliva) y son los responsables, en cierta forma, de las propiedades del aceite de oliva y de la estabilidad frente a las reacciones de oxidación.

a) Variedad *arbequina*

El contenido y evolución del perfil de ácidos grasos del aceite de oliva de la variedad *arbequina* bajo las diferentes condiciones de almacenamiento a las que fue sometido se muestra en la **Tabla 4.16**.

El perfil de ácidos grasos del aceite de oliva de la variedad *arbequina* se caracterizó mayoritariamente por el ácido oleico (69%), seguido de los ácidos palmítico (15%), linoleico (10%), y estearico (1,8%) y palmitoleico (1,6 %). Otros ácidos como el palmitoleico, linolénico, araquídico y el galdoléico también se detectaron aunque en menor porcentaje. Valores similares fueron determinados por otros autores tales como Romero-Aroca *et al.*, (2002) y Morello *et al.*, (2004) para aceite de oliva de la misma variedad.

Analizando la evolución del perfil de ácidos grasos, cabe destacar que no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) a lo largo de los 16 meses que duró el estudio de conservación para ninguna de las diferentes metodologías de conservación estudiadas. Esto indica que el perfil de ácidos grasos del aceite de oliva es relativamente estable y no se ve influenciado por las condiciones externas aplicadas durante el almacenamiento.

b) Variedad *empeltre*

El contenido y la evolución del perfil de ácidos grasos para el aceite de la variedad *empeltre* a lo largo del estudio de conservación bajo las diferentes metodologías estudiadas, se muestra en la **Tabla 4.17**.

En este caso, el perfil de ácidos grasos se caracterizó, mayoritariamente, por el ácido oleico (72%), el ácido linoleico (12%), el ácido palmítico (11%) y el ácido estearico (2,6%), mientras que los ácidos palmitoleico, linolénico, araquídico y galdoléico se encontraron en menor porcentaje.

Por su parte, al igual que en el caso de la variedad *arbequina*, el perfil de ácidos grasos tampoco presentó variaciones significativas ($p < 0,05$) a lo largo del período de conservación, para ninguna de las metodologías de conservación aplicadas, apoyando la gran estabilidad de los ácidos grasos en forma de triglicéridos al proceso de oxidación.

Tabla 4.16. Evolución del perfil de ácidos grasos en función del tiempo de almacenamiento y de la metodología de conservación para el aceite de oliva procedente de la variedad *arbequina*.

	Almacenamiento (meses)							
	0	2	4	6	8	10	12	16
Control								
Palmitico C16:0	15,47 ± 0,01	15,64 ± 0,00	15,59 ± 0,01	15,64 ± 0,01	15,67 ± 0,02	15,74 ± 2,46	15,70 ± 0,04	15,64 ± 0,36
Palmitolenico C16:1	1,66 ± 0,01	1,63 ± 0,01	1,64 ± 0,01	1,66 ± 0,01	1,67 ± 0,00	1,67 ± 0,27	1,67 ± 0,01	1,66 ± 0,05
Stearico C 18:0	1,88 ± 0,00	1,89 ± 0,00	1,95 ± 0,00	1,96 ± 0,00	1,89 ± 0,00	1,91 ± 0,29	1,99 ± 0,01	1,92 ± 0,05
Oleico C18:1	69,35 ± 0,02	69,30 ± 0,01	69,29 ± 0,03	69,17 ± 0,02	69,25 ± 0,02	69,80 ± 0,78	69,05 ± 0,07	69,31 ± 1,57
Linoléico C18:2	10,38 ± 0,00	10,28 ± 0,01	10,30 ± 0,01	10,36 ± 0,01	10,28 ± 0,00	10,42 ± 1,61	10,22 ± 0,01	10,32 ± 0,24
Linolénico C18:3	0,58 ± 0,01	0,58 ± 0,00	0,55 ± 0,02	0,57 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,57 ± 0,09	0,57 ± 0,00	0,57 ± 0,02
Araquídico C20:0	0,38 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,38 ± 0,00	0,37 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,39 ± 0,06	0,42 ± 0,00	0,39 ± 0,01
Gadoleico C20:1	0,30 ± 0,01	0,30 ± 0,00	0,30 ± 0,00	0,29 ± 0,00	0,29 ± 0,00	0,30 ± 0,05	0,37 ± 0,04	0,31 ± 0,02
Atmosfera								
Palmitico C16:0	15,47 ± 0,01	15,62 ± 0,00	15,63 ± 0,01	15,69 ± 0,01	15,68 ± 0,07	15,68 ± 0,92	15,65 ± 0,06	15,63 ± 0,15
Palmitolenico C16:1	1,66 ± 0,01	1,64 ± 0,00	1,63 ± 0,00	1,66 ± 0,00	1,66 ± 0,00	1,69 ± 0,10	1,68 ± 0,00	1,66 ± 0,02
Stearico C 18:0	1,88 ± 0,00	1,90 ± 0,00	1,97 ± 0,00	1,98 ± 0,00	1,90 ± 0,00	1,93 ± 0,08	1,98 ± 0,00	1,93 ± 0,01
Oleico C18:1	69,35 ± 0,02	69,32 ± 0,01	69,25 ± 0,01	69,14 ± 0,01	69,18 ± 0,04	70,10 ± 1,03	69,07 ± 0,03	69,34 ± 0,59
Linoléico C18:2	10,38 ± 0,00	10,29 ± 0,00	10,26 ± 0,00	10,30 ± 0,00	10,31 ± 0,02	10,46 ± 0,60	10,26 ± 0,00	10,32 ± 0,09
Linolenico C18:3	0,58 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,58 ± 0,00	0,59 ± 0,04	0,58 ± 0,00	0,57 ± 0,01
Araquidico C20:0	0,38 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,39 ± 0,00	0,38 ± 0,01	0,38 ± 0,00	0,40 ± 0,03	0,42 ± 0,00	0,39 ± 0,01
Gadoleico C20:1	0,30 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,30 ± 0,00	0,29 ± 0,00	0,30 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,37 ± 0,03	0,31 ± 0,01
Opaco								
Palmitico C16:0	15,47 ± 0,01	15,61 ± 0,00	15,59 ± 0,02	15,64 ± 0,01	15,49 ± 0,17	15,50 ± 0,01	15,63 ± 0,02	15,56 ± 0,03
Palmitolenico C16:1	1,66 ± 0,01	1,64 ± 0,00	1,65 ± 0,01	1,66 ± 0,01	1,67 ± 0,01	1,67 ± 0,00	1,68 ± 0,00	1,66 ± 0,01
Stearico C 18:0	1,88 ± 0,00	1,89 ± 0,00	1,94 ± 0,01	1,99 ± 0,00	1,90 ± 0,01	1,89 ± 0,01	1,97 ± 0,00	1,92 ± 0,00
Oleico C18:1	69,35 ± 0,02	69,30 ± 0,01	69,32 ± 0,01	69,13 ± 0,01	69,44 ± 0,12	69,38 ± 0,03	69,11 ± 0,05	69,29 ± 0,03
Linoléico C18:2	10,38 ± 0,00	10,30 ± 0,00	10,27 ± 0,01	10,34 ± 0,01	10,26 ± 0,03	10,32 ± 0,01	10,27 ± 0,01	10,31 ± 0,01
Linolenico C18:3	0,58 ± 0,01	0,58 ± 0,00	0,57 ± 0,00	0,57 ± 0,00	0,57 ± 0,01	0,58 ± 0,02	0,58 ± 0,00	0,57 ± 0,01
Araquidico C20:0	0,38 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,37 ± 0,00	0,38 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,38 ± 0,00	0,41 ± 0,02	0,38 ± 0,01
Gadoleico C20:1	0,30 ± 0,01	0,30 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,00	0,29 ± 0,00	0,35 ± 0,06	0,30 ± 0,01

Tabla 4.16 (Continuación)

	Almacenamiento (meses)							
	0	2	4	6	8	10	12	16
Temperatura								
Palmitico C16:0	15,47 ± 0,01	14,55 ± 0,08	15,27 ± 0,60	15,59 ± 0,23	16,11 ± 0,02	15,59 ± 0,04	16,17 ± 0,01	16,18 ± 0,14
Palmitolenico C16:1	1,66 ± 0,01	1,68 ± 0,00	1,66 ± 0,02	1,66 ± 0,01	1,65 ± 0,00	1,66 ± 0,02	1,66 ± 0,00	1,66 ± 0,01
Stearico C 18:0	1,88 ± 0,00	1,89 ± 0,00	1,97 ± 0,00	1,97 ± 0,00	1,91 ± 0,00	1,89 ± 0,02	1,97 ± 0,00	1,97 ± 0,01
Oleico C18:1	69,35 ± 0,02	70,04 ± 0,07	69,51 ± 0,42	69,17 ± 0,17	68,82 ± 0,02	68,64 ± 0,84	68,71 ± 0,01	68,68 ± 0,22
Linolèico C18:2	10,38 ± 0,00	10,56 ± 0,02	10,35 ± 0,15	10,36 ± 0,06	10,24 ± 0,01	10,27 ± 0,13	10,20 ± 0,00	10,21 ± 0,05
Linolenico C18:3	0,58 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,57 ± 0,00	0,57 ± 0,01	0,58 ± 0,00	0,58 ± 0,01
Araquidico C20:0	0,38 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,39 ± 0,00	0,38 ± 0,01	0,39 ± 0,00	0,37 ± 0,00	0,40 ± 0,02	0,38 ± 0,01
Gadoleico C20:1	0,30 ± 0,01	0,31 ± 0,00	0,30 ± 0,00	0,28 ± 0,00	0,30 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,34 ± 0,01
US								
Palmitico C16:0	15,62 ± 0,02	15,63 ± 0,00	15,59 ± 0,02	15,60 ± 0,01	15,62 ± 0,01	15,29 ± 0,05	15,63 ± 0,01	15,63 ± 0,02
Palmitolenico C16:1	1,66 ± 0,00	1,65 ± 0,01	1,65 ± 0,00	1,66 ± 0,00	1,67 ± 0,01	1,68 ± 0,00	1,68 ± 0,00	1,68 ± 0,00
Stearico C 18:0	1,91 ± 0,00	1,89 ± 0,00	1,94 ± 0,01	1,96 ± 0,01	1,89 ± 0,00	1,88 ± 0,01	1,98 ± 0,01	1,97 ± 0,01
Oleico C18:1	69,19 ± 0,02	69,30 ± 0,01	69,30 ± 0,01	69,27 ± 0,01	69,33 ± 0,02	69,51 ± 0,03	69,15 ± 0,13	69,12 ± 0,02
Linolèico C18:2	10,34 ± 0,01	10,31 ± 0,00	10,29 ± 0,00	10,31 ± 0,00	10,26 ± 0,00	10,38 ± 0,01	10,24 ± 0,00	10,23 ± 0,00
Linolenico C18:3	0,58 ± 0,01	0,56 ± 0,00	0,55 ± 0,00	0,57 ± 0,00	0,56 ± 0,01	0,57 ± 0,00	0,57 ± 0,00	0,57 ± 0,00
Araquidico C20:0	0,40 ± 0,01	0,37 ± 0,00	0,39 ± 0,01	0,35 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,40 ± 0,02	0,42 ± 0,01
Gadoleico C20:1	0,30 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,28 ± 0,00	0,29 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,35 ± 0,03	0,38 ± 0,01
US + Otros								
Palmitico C16:0	15,62 ± 0,02	14,18 ± 0,19	13,23 ± 0,39	14,92 ± 0,20	17,09 ± 0,00	14,96 ± 0,21	17,49 ± 0,05	17,29 ± 0,14
Palmitolénico C16:1	1,66 ± 0,00	1,70 ± 0,01	1,70 ± 0,00	1,69 ± 0,00	1,61 ± 0,01	1,69 ± 0,01	1,63 ± 0,01	1,62 ± 0,01
Stearico C 18:0	1,91 ± 0,00	1,81 ± 0,02	1,99 ± 0,01	1,87 ± 0,01	1,98 ± 0,00	1,92 ± 0,00	1,92 ± 0,01	1,95 ± 0,01
Oleico C18:1	69,19 ± 0,02	70,41 ± 0,18	70,98 ± 0,30	69,75 ± 0,17	68,17 ± 0,01	69,66 ± 0,14	67,73 ± 0,21	67,95 ± 0,12
Linolèico C18:2	10,34 ± 0,01	10,63 ± 0,04	10,79 ± 0,09	10,50 ± 0,04	9,94 ± 0,01	10,50 ± 0,04	9,90 ± 0,11	9,92 ± 0,03
Linolénico C18:3	0,58 ± 0,01	0,58 ± 0,00	0,59 ± 0,00	0,59 ± 0,00	0,54 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,56 ± 0,01	0,55 ± 0,01
Araquídico C20:0	0,40 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,40 ± 0,03	0,39 ± 0,01
Gadoleico C20:1	0,30 ± 0,00	0,31 ± 0,00	0,32 ± 0,00	0,30 ± 0,00	0,28 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,32 ± 0,00

Valores expresados en tanto por ciento (media ± desviación estándar)

Tabla 4.17. Evolución del perfil de ácidos grasos en función del tiempo de almacenamiento y de la metodología de conservación para el aceite de oliva procedente de la variedad *empeltre*.

	Almacenamiento (meses)							
	0	2	4	6	8	10	12	16
Control								
Palmítico C16:0	10,94 ± 0,01	11,19 ± 0,00	11,24 ± 0,01	11,24 ± 0,13	11,34 ± 0,01	10,81 ± 0,31	10,80 ± 0,18	11,34 ± 0,10
Palmitoleico C16:1	0,47 ± 0,02	0,44 ± 0,02	0,47 ± 0,00	0,48 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,45 ± 0,02	0,43 ± 0,01	0,48 ± 0,01
Stearico C18:0	2,62 ± 0,03	2,71 ± 0,05	2,62 ± 0,03	2,62 ± 0,01	2,62 ± 0,02	2,63 ± 0,01	2,60 ± 0,04	2,61 ± 0,02
Oleico C18:1	72,08 ± 0,02	71,74 ± 0,03	72,08 ± 0,02	72,16 ± 0,06	72,11 ± 0,03	72,52 ± 0,26	72,57 ± 0,09	72,08 ± 0,05
Linoleico C18:2	12,44 ± 0,04	12,19 ± 0,03	12,33 ± 0,01	12,28 ± 0,01	12,23 ± 0,01	12,32 ± 0,06	12,32 ± 0,02	12,26 ± 0,00
Linolénico C18:3	0,56 ± 0,06	0,70 ± 0,05	0,54 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,54 ± 0,00	0,53 ± 0,02	0,52 ± 0,02	0,55 ± 0,01
Araquídico C20:0	0,52 ± 0,00	0,48 ± 0,02	0,41 ± 0,02	0,38 ± 0,03	0,39 ± 0,00	0,42 ± 0,02	0,45 ± 0,06	0,38 ± 0,04
Galdoleico C20:1	0,37 ± 0,01	0,54 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,31 ± 0,01	0,30 ± 0,00
Atmósfera								
Palmítico C16:0	10,94 ± 0,01	10,97 ± 0,01	11,52 ± 0,00	12,12 ± 0,74	12,33 ± 0,72	11,35 ± 0,01	10,97 ± 0,14	11,38 ± 0,01
Palmitoleico C16:1	0,47 ± 0,02	0,47 ± 0,00	0,52 ± 0,00	0,55 ± 0,02	0,51 ± 0,02	0,52 ± 0,00	0,49 ± 0,00	0,48 ± 0,00
Stearico C18:0	2,62 ± 0,03	2,69 ± 0,00	2,59 ± 0,02	2,49 ± 0,02	2,54 ± 0,06	2,57 ± 0,02	2,59 ± 0,02	2,61 ± 0,01
Oleico C18:1	72,08 ± 0,02	72,23 ± 0,03	71,88 ± 0,01	71,46 ± 0,64	71,47 ± 0,32	72,08 ± 0,01	72,33 ± 0,09	72,06 ± 0,02
Linoléico C18:2	12,44 ± 0,04	12,13 ± 0,01	12,22 ± 0,01	12,18 ± 0,06	12,06 ± 0,27	12,23 ± 0,04	12,27 ± 0,00	12,21 ± 0,03
Linolénico C18:3	0,56 ± 0,06	0,64 ± 0,04	0,57 ± 0,01	0,55 ± 0,03	0,51 ± 0,01	0,55 ± 0,02	0,55 ± 0,01	0,55 ± 0,01
Araquídico C20:0	0,52 ± 0,00	0,52 ± 0,00	0,40 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,35 ± 0,05	0,40 ± 0,00	0,48 ± 0,01	0,41 ± 0,00
Galdoleico C20:1	0,37 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,30 ± 0,00	0,28 ± 0,03	0,24 ± 0,03	0,35 ± 0,00	0,32 ± 0,01	0,30 ± 0,00
Opaco								
Palmítico C16:0	10,94 ± 0,01	11,64 ± 0,01	11,31 ± 0,07	11,57 ± 0,03	11,76 ± 0,19	11,22 ± 0,16	11,17 ± 0,08	11,31 ± 0,08
Palmitoleico C16:1	0,47 ± 0,02	0,54 ± 0,01	0,49 ± 0,00	0,54 ± 0,00	0,50 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,49 ± 0,01
Stearico C18:0	2,62 ± 0,03	2,57 ± 0,00	2,60 ± 0,02	2,59 ± 0,02	2,59 ± 0,04	2,59 ± 0,00	2,55 ± 0,07	2,59 ± 0,03
Oleico C18:1	72,08 ± 0,02	71,29 ± 0,02	72,07 ± 0,09	71,85 ± 0,00	71,74 ± 0,11	72,05 ± 0,10	72,21 ± 0,04	72,18 ± 0,09
Linoleico C18:2	12,44 ± 0,04	12,51 ± 0,04	12,28 ± 0,00	12,19 ± 0,01	12,23 ± 0,00	12,33 ± 0,01	12,29 ± 0,01	12,20 ± 0,03
Linolénico C18:3	0,56 ± 0,06	0,61 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,56 ± 0,00	0,53 ± 0,02	0,56 ± 0,00	0,54 ± 0,02	0,55 ± 0,02
Araquídico C20:0	0,52 ± 0,00	0,45 ± 0,03	0,41 ± 0,01	0,40 ± 0,00	0,37 ± 0,01	0,46 ± 0,06	0,45 ± 0,01	0,37 ± 0,04
Galdoleico C20:1	0,37 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,29 ± 0,00	0,29 ± 0,00	0,28 ± 0,02	0,30 ± 0,00	0,31 ± 0,01	0,31 ± 0,00

Tabla 4.17. (Continuación)

	Almacenamiento (meses)							
	Inicial	2	4	6	8	10	12	16
Temperatura								
Palmitico C16:0	10,94 ± 0,01	10,87 ± 0,00	11,57 ± 0,13	11,45 ± 0,17	11,50 ± 0,36	11,67 ± 0,07	11,72 ± 0,02	11,94 ± 0,10
Palmitoleico C16:1	0,47 ± 0,02	0,47 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,49 ± 0,00	0,50 ± 0,00	0,50 ± 0,01	0,48 ± 0,00	0,49 ± 0,01
Stearico C18:0	2,62 ± 0,03	2,74 ± 0,03	2,59 ± 0,04	2,61 ± 0,01	2,60 ± 0,05	2,63 ± 0,02	2,63 ± 0,01	2,59 ± 0,00
Oleico C18:1	72,08 ± 0,02	72,11 ± 0,02	71,84 ± 0,06	71,98 ± 0,13	71,95 ± 0,26	71,69 ± 0,06	71,72 ± 0,01	71,73 ± 0,10
Linoleico C18:2	12,44 ± 0,04	12,42 ± 0,00	12,32 ± 0,00	12,27 ± 0,00	12,27 ± 0,04	12,15 ± 0,02	12,11 ± 0,02	12,07 ± 0,01
Linoléico C18:3	0,56 ± 0,06	0,60 ± 0,01	0,53 ± 0,00	0,54 ± 0,01	0,53 ± 0,01	0,59 ± 0,01	0,55 ± 0,01	0,53 ± 0,02
Araquídico C20:0	0,52 ± 0,00	0,45 ± 0,00	0,38 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,44 ± 0,02	0,46 ± 0,01	0,37 ± 0,01
Galdoleico C20:1	0,37 ± 0,01	0,34 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,33 ± 0,00	0,33 ± 0,00	0,29 ± 0,00
US + Otros								
Palmitico C16:0	10,94 ± 0,01	11,19 ± 0,01	11,33 ± 0,00	11,40 ± 0,07	12,09 ± 0,17	11,08 ± 0,09	10,83 ± 0,12	11,40 ± 0,03
Palmitoleico C16:1	0,47 ± 0,02	0,47 ± 0,00	0,47 ± 0,00	0,48 ± 0,00	0,51 ± 0,00	0,47 ± 0,00	0,46 ± 0,01	0,49 ± 0,00
Stearico C18:0	2,62 ± 0,03	2,53 ± 0,01	2,61 ± 0,02	2,61 ± 0,02	2,56 ± 0,01	2,62 ± 0,03	2,61 ± 0,01	2,59 ± 0,02
Oleico C18:1	72,08 ± 0,02	72,17 ± 0,00	72,05 ± 0,05	71,98 ± 0,07	71,60 ± 0,15	72,22 ± 0,08	72,43 ± 0,13	72,11 ± 0,06
Linoleico C18:2	12,44 ± 0,04	12,46 ± 0,03	12,31 ± 0,03	12,29 ± 0,01	12,24 ± 0,02	12,33 ± 0,01	12,35 ± 0,00	12,18 ± 0,02
Linoléico C18:3	0,56 ± 0,06	0,52 ± 0,01	0,54 ± 0,00	0,54 ± 0,01	0,52 ± 0,02	0,55 ± 0,00	0,54 ± 0,00	0,56 ± 0,00
Araquídico C20:0	0,52 ± 0,00	0,35 ± 0,01	0,40 ± 0,00	0,40 ± 0,02	0,35 ± 0,00	0,42 ± 0,01	0,46 ± 0,00	0,38 ± 0,00
Galdoleico C20:1	0,37 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,25 ± 0,00	0,31 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,30 ± 0,00

Valores expresados en tanto por ciento (media ± desviación estándar)

Estos resultados están en consonancia con el estudio de Guil-Guerrero *et al.*, (2009) en el cual no se observaron diferencias significativas en el contenido en ácido oleico a lo largo de 12 meses de conservación, al estudiar el efecto del tipo de recipiente (oscuro y transparente) en aceites de oliva procedentes de las variedades *picual*, *hojiblanca* y *arbequina*.

Además, Gómez-Alonso *et al.*, (2007), tampoco observaron diferencias significativas en el contenido en ácido oleico a lo largo de 21 meses de almacenamiento a baja temperatura y en ausencia de luz para el aceite de oliva de la variedad *cornicabra*. Sin embargo, sí observaron un descenso en el contenido en ácido linolenico (entre un 6 y un 10 % de pérdida) y en el contenido en ácido linoleico (entre un 2 y un 4 % de pérdida) durante los 21 meses de almacenamiento.

No obstante, Morello *et al.* 2004, en un estudio de conservación en oscuridad, sí detectaron una disminución en el contenido en ácido linoleico, a medida que aumentaba el contenido en ácido oleico a lo largo de los 12 meses de almacenamiento. Estos autores propusieron que este fenómeno era consecuencia de la transformación, mediante procesos de oxidación, del ácido linoleico (C16:2) en ácido oleico (C16:1).

Globalmente, estos resultados ponen de manifiesto la elevada estabilidad del aceite de oliva virgen extra. El hecho de que no se observaran cambios significativos en el perfil de ácidos grasos, puede deberse, en gran medida, a la presencia de compuestos antioxidantes tales como los compuestos fenólicos o los tocoferoles capaces de proteger al aceite de las reacciones de oxidación (Bendini *et al.*, 2009).

4.2.4. Evolución de los componentes fenólicos durante la conservación del aceite de oliva

La relación existente entre los compuestos fenólicos y la estabilidad del aceite de oliva se encuentra ampliamente demostrada y documentada (Bendini *et al.*, 2009), así como la relación entre este tipo de compuestos y las propiedades organolépticas del aceite (Velasco y Dobarganes, 2002; Inageros-García *et al.*, 2009) e, incluso, con los efectos beneficiosos del aceite para la salud (López-Miranda *et al.*, 2010). De ahí que sea de vital importancia conocer la evolución de este tipo de compuestos durante la etapa de conservación, ya que de ello va a depender en gran medida la calidad final del aceite de oliva.

a) Variedad *arbequina*

En el aceite de oliva procedente de la variedad *arbequina*, los fenólicos totales (FT) detectados inicialmente fueron $175,49 \pm 6,33$ mg ácido cafeico/kg aceite. El hecho de aplicar un pretratamiento con US tampoco alteró de forma significativa ($p < 0,05$) el contenido en FT. El contenido medio para las muestras pre-tratadas con US cuyo se situó en torno a los $171,59 \pm 4,94$ mg ácido cafeico/kg aceite.

En la **Figura 4.24** se muestran los resultados de la evolución del contenido de FT del aceite de oliva para la variedad *arbequina* en función de las diferentes metodologías de conservación objeto de estudio.

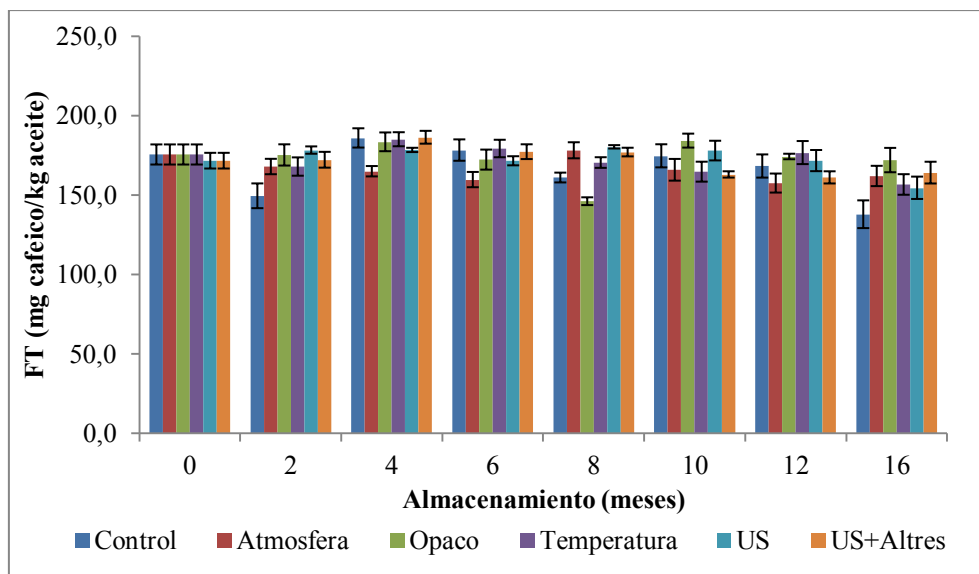


Figura 4.24. Evolución del contenido en FT en función del tiempo de almacenamiento y de la metodología de conservación para el aceite de oliva procedente de la variedad *arbequina*.

En general, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en el contenido de FT a lo largo de los 16 meses de estudio, independientemente de la metodología de conservación, a excepción del caso de la muestra *Control*, la cual experimentó una ligera pero significativa ($p < 0,05$) disminución a partir del duodécimo mes de almacenamiento. Estos resultados indican que las metodologías de conservación utilizadas en este estudio no afectaron de forma significativa a la degradación de los FT durante los primeros 12 meses de almacenamiento, hecho que parece estar en aparente desacuerdo con la mayoría de los estudios, los cuales concluyen que el contenido en FT disminuye a lo largo del período de conservación como consecuencia de los procesos de oxidación (Cinquanta *et al.*, 1997; Psomiadou y Tsimidou, 2002; Vacca *et al.*, 2005; Gómez-Alonso *et al.*, 2007; Krichene *et al.*, 2010).

b) Variedad *empeltre*

El aceite de oliva procedente de la variedad *empeltre*, presentó inicialmente valores más elevados de FT que el aceite de la variedad *arbequina*, situándose en torno a 323,5 mg de ácido cafeico/kg aceite. Estos compuestos, tal y como se ha mencionado anteriormente, están estrechamente ligados a la variedad de aceituna a partir de la cual se elabora el aceite de oliva. En este caso, el pre-tratamiento con US tampoco produjo alteraciones significativas en el contenido en FT.

En la **Figura 4.25** se muestran los resultados de la evolución del contenido de FT del aceite de oliva de la variedad *empeltre* en función de las metodologías de conservación objeto de estudio.

Durante la etapa de conservación, en general, el aceite de oliva experimentó un descenso en el contenido de FT, pasando de 323 mg ácido cafeico/ kg de aceite al inicio del estudio hasta los 170 mg ácido cafeico/kg de aceite de al final del periodo de estudio. Esto conllevó a una pérdida general del 50% en el contenido FT a lo largo de los 16 meses de almacenamiento, independientemente de la metodología de conservación.

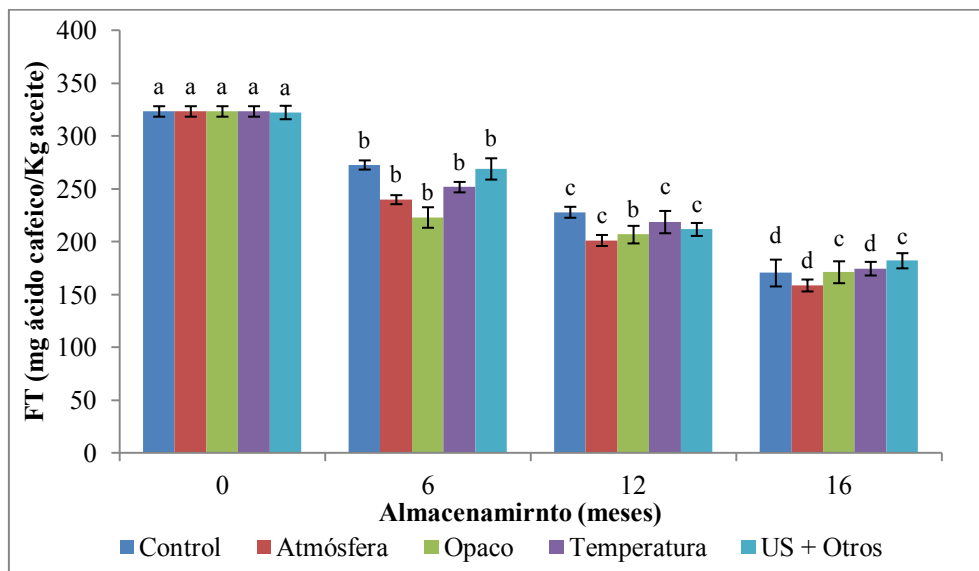


Figura 4.25. Evolución del contenido en FT en función del tiempo de almacenamiento y de la metodología de conservación para el aceite de oliva procedente de la variedad *empeltre*.

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) entre diferentes periodos de conservación.

Dicha reducción en el contenido FT se debe, principalmente, a los procesos de oxidación que experimenta el aceite de oliva durante su almacenamiento (Psomiadou y

Tsimidou, 2002). En este caso, los valores y la evolución observada para este tipo de compuestos concuerda con otros estudios publicados, en los cuales se analizó su evolución en condiciones de ausencia/presencia de luz (Caponio *et al.*, 2005; Vacca *et al.*, 2005; Lerma-García *et al.*, 2009), utilizando una atmósfera inerte (Cinquanta *et al.*, 1997) y a baja temperatura (Di Giovacchino *et al.*, 2002; Gómez-Alonso *et al.*, 2007; Krichene *et al.*, 2010).

Al final del estudio de conservación, no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las diferentes metodologías de conservación. De forma análoga, Caponio *et al.* (2005), no observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) a lo largo del período de conservación entre muestras de aceite de oliva almacenadas en presencia de luz y las muestras que fueron conservadas en ausencia de luz.

4.2.5. Evolución de la estabilidad oxidativa durante la conservación del aceite de oliva

Algunos investigadores afirman que la estabilidad oxidativa, determinada a partir del método Rancimat, a pesar de no estar considerada como un parámetro de calidad, proporciona una información muy valiosa sobre la vida útil del aceite de oliva, ya que engloba en un mismo parámetro el efecto conjunto de todos los compuestos que presentan carácter antioxidante (Aparicio *et al.*, 1999; Beltran *et al.*, 2000; Vacca *et al.*, 2005).

a) Variedad *arbequina*

Los valores de la estabilidad oxidativa en función de la metodología de conservación y a lo largo de 16 meses se presentan en la **Figura 4.26**.

A diferencia de las muestras conservadas a baja temperatura (Temperatura) las cuales no experimentaron cambios significativos ($p < 0,05$) a lo largo de todo el período de conservación, las demás muestras de aceite de oliva experimentaron un claro descenso de la estabilidad oxidativa a lo largo del período de almacenamiento. Siendo este descenso más acusado para la muestra control, con una reducción de la estabilidad oxidativa del 85 % a los 16 meses de almacenamiento. Por tanto, a medida que se actuó sobre las fuentes potenciales de oxidación, los resultados de la estabilidad oxidativa fueron mejorando, siendo las muestras conservadas a baja temperatura y las pretratadas con US las que conservaron mejor sus propiedades y en consecuencia las que

presentaron los valores más elevados de estabilidad oxidativa en todos los intervalos de tiempo considerados.

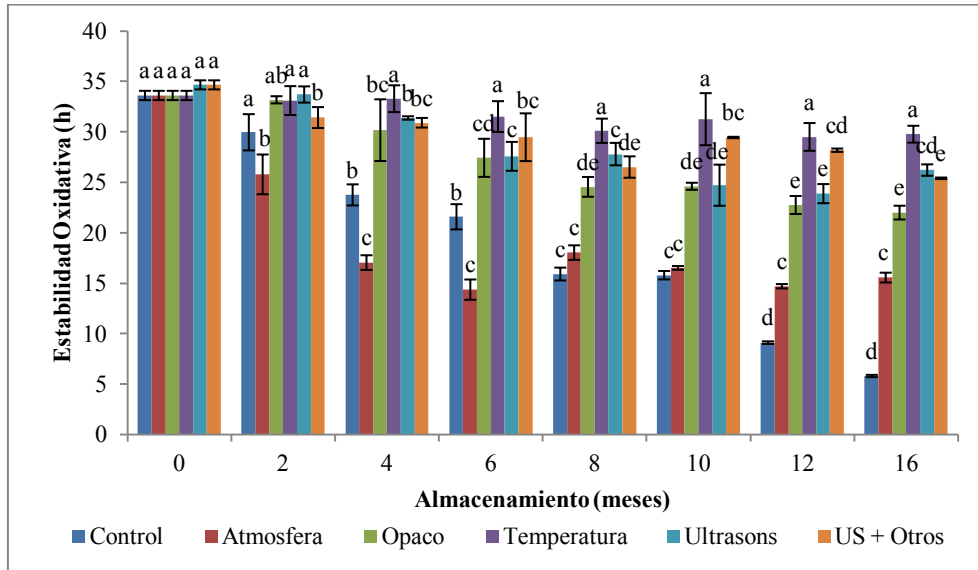


Figura 4.26. Evolución de la estabilidad oxidativa durante del período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad *arbequina*.

Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$), entre diferentes periodos de conservación.

b) Variedad *empeltre*

La evolución de la estabilidad oxidativa a lo largo del estudio de conservación para el aceite de oliva procedente de la variedad *empeltre* se muestra en la **Figura 4.27**.

Comparando los valores de estabilidad oxidativa de los dos aceites de oliva objeto de estudio, se observó como el aceite procedente de la variedad *empeltre* fue el que presentó mayor estabilidad frente a la oxidación. Este fenómeno está relacionado o justificado por el mayor porcentaje en ácido oleico y mayor contenido en FT en comparación con el aceite procedente de la variedad *arbequina*.

No obstante, para la variedad *empeltre* también se observó un descenso generalizado de la estabilidad oxidativa a medida que avanzó el tiempo de conservación del aceite, siendo los aceites sometidos a la metodología de conservación en frío, en particular, el aceite pretratado con US, el que presentó los valores más elevados de estabilidad oxidativa a los 16 meses de conservación.

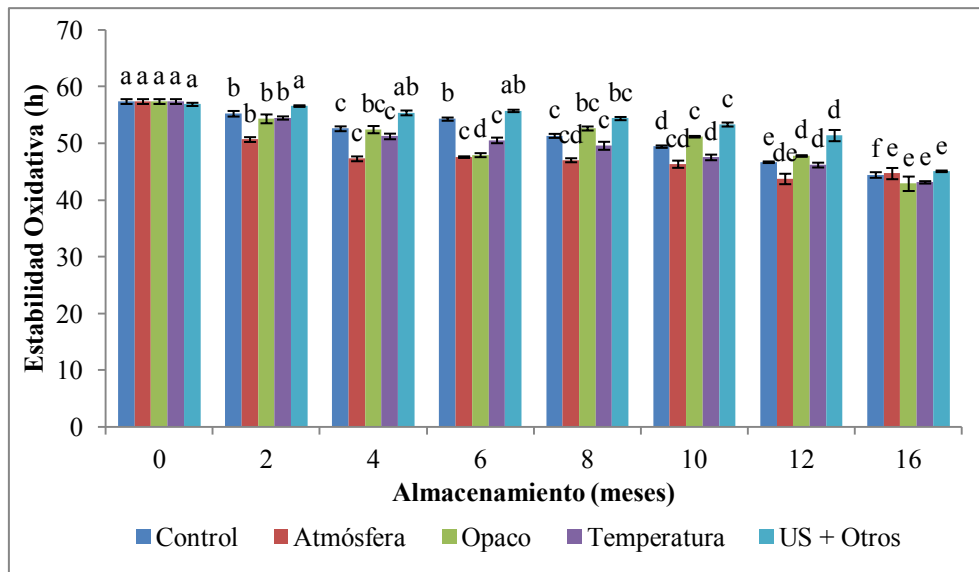


Figura 4.27. Evolución de la estabilidad oxidativa durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad *empeltre*. Diferentes letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Es evidente, tal como explican autores como Bendini *et al.*, (2009) o Fadda *et al.*, (2012), que el descenso observado en la estabilidad oxidativa a lo largo del almacenamiento podría atribuirse a la degradación de los compuestos minoritarios presentes en el aceite de oliva. Prueba de ello, fue la elevada correlación (según el coeficiente de Pearson) que hubo entre el descenso de la estabilidad oxidativa y el contenido en FT para la variedad *empeltre* ($p = 0,967$; $0,937$; $0,993$; $0,995$ y $0,923$ para las metodologías control, atmósfera, opaco, temperatura y ultrasonidos, respectivamente).

4.2.6. Evolución del análisis organoléptico del aceite de oliva virgen durante el período de conservación

A continuación, se presentan los resultados del análisis organoléptico de los estudios de conservación de los aceites de oliva procedentes de las variedades *arbequina* y *empeltre* bajo las diferentes metodologías de conservación. Cabe mencionar que no se han encontrado en la bibliografía estudios en los que se realice un estudio exhaustivo de la evolución de los diferentes atributos tanto positivos como negativos que caracterizan al aceite de oliva, a lo largo del período de conservación.

4.2.6.1. Variedad *arbequina*

A continuación, se presenta la evolución de los diferentes atributos positivos para el aceite de la variedad *arbequina*, para las diferentes metodologías de conservación, durante el período de almacenamiento.

a) Evolución de los atributos positivos

El principal atributo positivo, contemplado por la legislación europea (Reglamento CEE 2568/91 y posteriores modificaciones) en la clasificación del aceite de oliva es el *frutado de aceituna*. En la **Figura 4.28** se muestra la evolución de dicho atributo a lo largo de los 16 meses de almacenamiento, para cada una de las metodologías de conservación utilizadas.

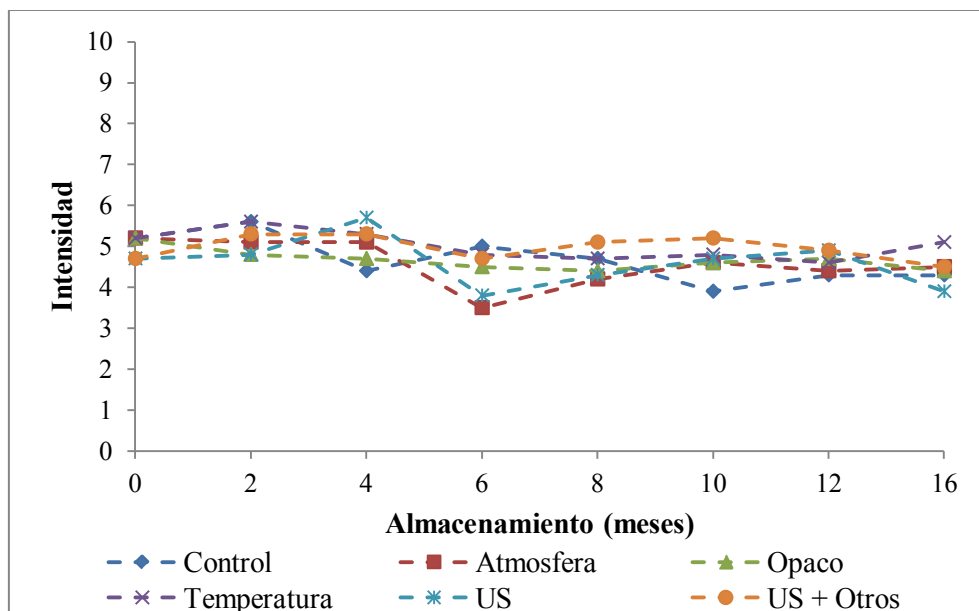


Figura 4.28. Evolución del atributo *frutado de aceituna* durante del período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad *arbequina*.

Como se desprende de la **Figura 4.28**, el valor inicial del atributo frutado en el aceite de la variedad *arbequina* se situó en torno a los 5 puntos de intensidad, el cual puede considerarse como una intensidad media. Teniendo en cuenta el período de conservación, independientemente de la metodología, no se observaron cambios significativos en la intensidad de este atributo a lo largo de los 16 meses de almacenamiento.

En el caso del atributo *verde hoja*, (Figura 4.29), tampoco se observaron diferencias significativas entre las diferentes metodologías de conservación durante el período de almacenamiento.

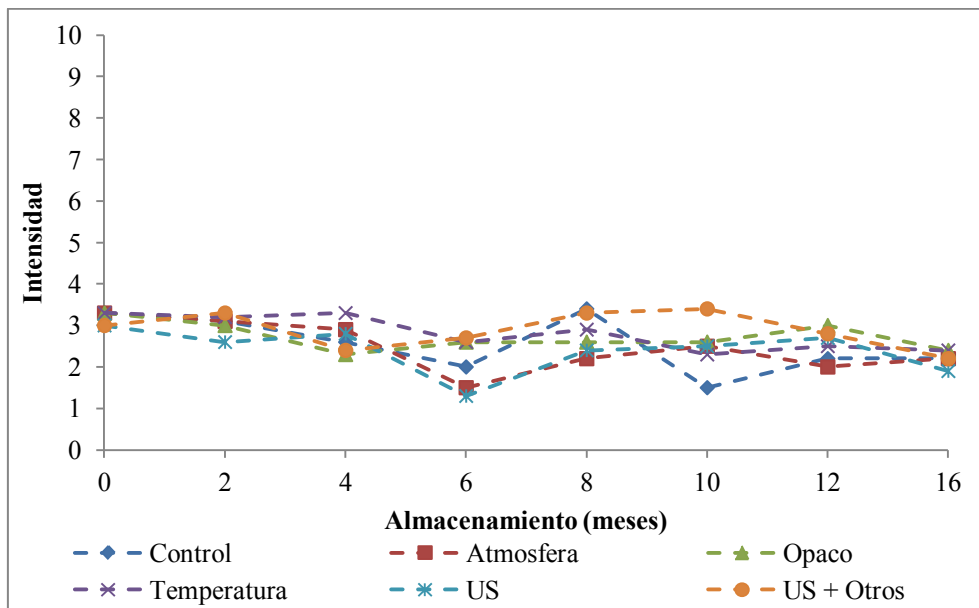


Figura 4.29. Evolución del atributo *verde hoja* durante del período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad *arbequina*.

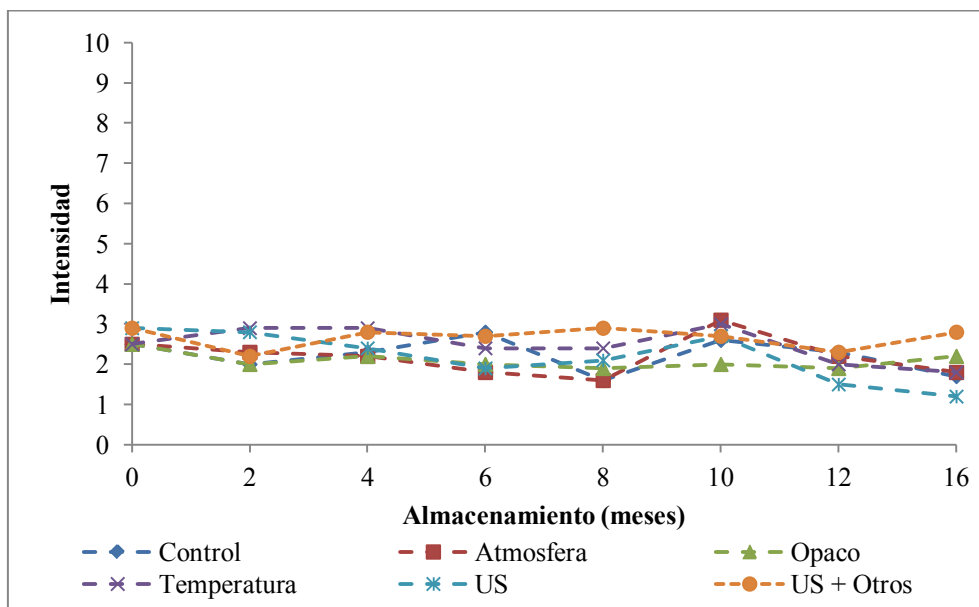


Figura 4.30. Evolución del atributo *amargo* durante del período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad *arbequina*.

En el caso del atributo *Amargo* (**Figura 4.30**). Exhibió una tendencia similar a los atributos positivos anteriormente descritos, sin experimentar variaciones significativas en su intensidad a lo largo de los 16 meses en que duró el estudio de conservación.

Otro atributo, muy característico en el aceite de oliva extra virgen es el *picante*.

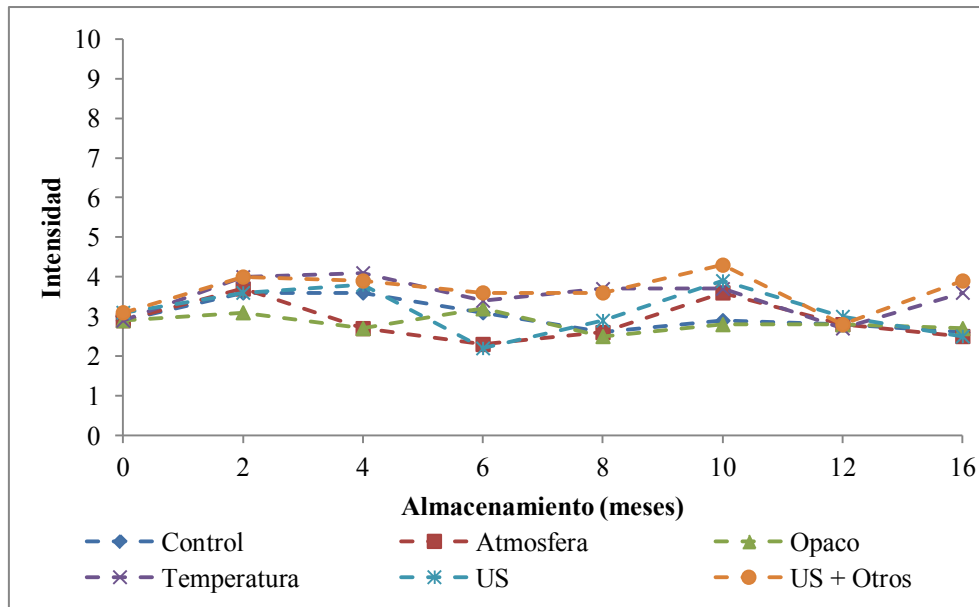


Figura 4.31. Evolución del atributo *picante* durante del período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad *arbequina*.

En cuanto al atributo *picante* del aceite, observando la **Figura 4.31** para el atributo *picante*, las muestras conservadas a baja temperatura (*Temperatura*) presentaron, valores ligeramente superiores a lo largo del estudio de conservación en comparación con las muestras conservadas a 20 °C. No obstante, las diferencias entre metodologías de conservación a lo largo de los del período de almacenamiento estudiado no fueron significativas.

Son varios los autores que describen la relación directa entre los compuestos fenólicos y los atributos amargo y picante (Angerosa *et al.*, 2004; Kalua *et al.*, 2007; Bendini *et al.*, 2009); Por este motivo, la no detección de diferencias significativas ($p < 0,05$) durante la evolución del contenido en FT a lo largo de los 16 meses de conservación, explicaría la poca variación de intensidades en los atributos amargo y picante durante el período de almacenamiento.

Otro atributo característico del aceite, procedente de las aceitunas en avanzado estado de madurez es el atributo *dulce*. La evolución con el tiempo de este atributo para las diferentes metodologías de conservación se muestra en la **Figura 4.32**

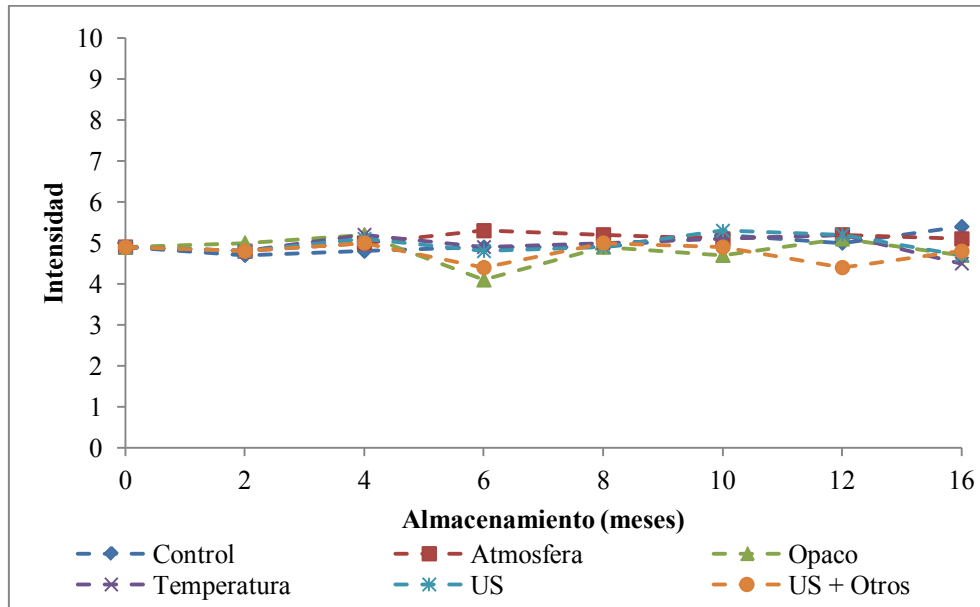


Figura 4.32. Evolución del atributo *dulce* durante del período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad *arbequina*.

El valor que tomó inicialmente este atributo se situó en valores cercanos a 5 unidades de intensidad y, no se evidenciaron diferencias significativas a lo largo del periodo de conservación, manteniendo una intensidad constante con el tiempo, independientemente de la metodología de conservación.

Normalmente, el atributo dulce sigue una tendencia inversa a los atributos de frutado, picante y amargo (Bendini *et al.*, 2009), es decir, a medida que la intensidad del frutado va disminuyendo, ya sea consecuencia del mal estado de las aceitunas (Vichi *et al.*, 2009), o del aumento grado de madurez de éstas (Angerosa *et al.*, 2004), o durante el almacenamiento (Stefanoudaki *et al.*, 2010), los aceites aumentan los valores del atributo dulce. El hecho de no observar una disminución significativa en las intensidades de los atributos frutado de aceituna, amargo y picante, podría explicar que el atributo dulce permanecería prácticamente inalterado a lo largo del período de conservación.

b) Evolución de los defectos sensoriales

Al igual que en el caso de los atributos positivos, también se evaluó la posible evolución de los diferentes defectos sensoriales característicos del aceite de oliva. La

detección de algún tipo de defecto en el aceite de oliva conlleva la pérdida de la máxima categoría comercial según la normativa Europea (Reglamento CEE 2568/91 y actualizaciones).

En este sentido, cabe destacar que no se detectó ningún tipo de defecto organoléptico en las muestras de aceite correspondientes a las diferentes metodologías de conservación estudiadas, a lo largo de los 16 meses almacenamiento.

Una vez finalizado este el estudio, analizando conjuntamente los resultados del análisis físico-químico y del análisis sensorial, se puede concluir que, por una parte, durante los 16 meses de almacenamiento, todas las muestras analizadas pudieron clasificarse dentro de la categoría de aceite de oliva virgen extra, mientras que por otra, no se observaron diferencias entre las diferentes metodologías de conservación, lo cual parece indicar que la calidad inicial del aceite (bajo grado de acidez) provoca que los efectos externos de conservación (atmosfera inerte, ausencia de luz y baja temperatura), no fueran relevantes para la conservación del aceite.

4.2.6.2. Variedad *empeltre*

Los resultados correspondientes a la evolución de los atributos positivos y de los defectos organolépticos, para el estudio de conservación del aceite de oliva procedente de la variedad *empeltre* se exponen a continuación.

a) Evolución de los atributos positivos

En la **Figura 4.33** se muestra la evolución del atributo *frutado* de aceituna a lo largo de los 16 meses de almacenamiento, en función de las diferentes metodologías de conservación utilizadas.

El valor inicial de atributo frutado en el aceite de la variedad *empeltre* también se situó en torno a los 5 puntos de intensidad. Independientemente de la metodología de conservación, se observó un descenso en intensidad durante los cuatro primeros meses. A partir de ese momento, las muestras conservadas en oscuridad (*opaco*) y en atmosfera inerte (*atmosfera*) experimentaron un ligero descenso hasta el final del estudio. Además, en el caso de la muestra conservada en ausencia de luz, este valor se hizo cero a partir de los 16 meses de almacenamiento, indicando la pérdida del atributo frutado de aceituna, motivo por el cual, independientemente del análisis físico-químico, dicho aceite debería clasificarse como aceite de oliva lampante, según la normativa (CE)

640/2008. Por otra parte, las muestras *Control*, *Temperatura* y *US + Otros* se mantuvieron prácticamente constante el valor del atributo frutado hasta los 16 meses de conservación. A pesar de que la evolución o tendencia de este atributo fue bastante similar entre las diferentes metodologías, hay que destacar que las muestras almacenadas a baja temperatura (*Temperatura* y *US + Otros*) fueron las que presentaron, durante la mayor parte del período de almacenamiento, los valores de intensidad de *frutado* de aceituna más elevados, en comparación con los valores de las demás metodologías estudiadas.

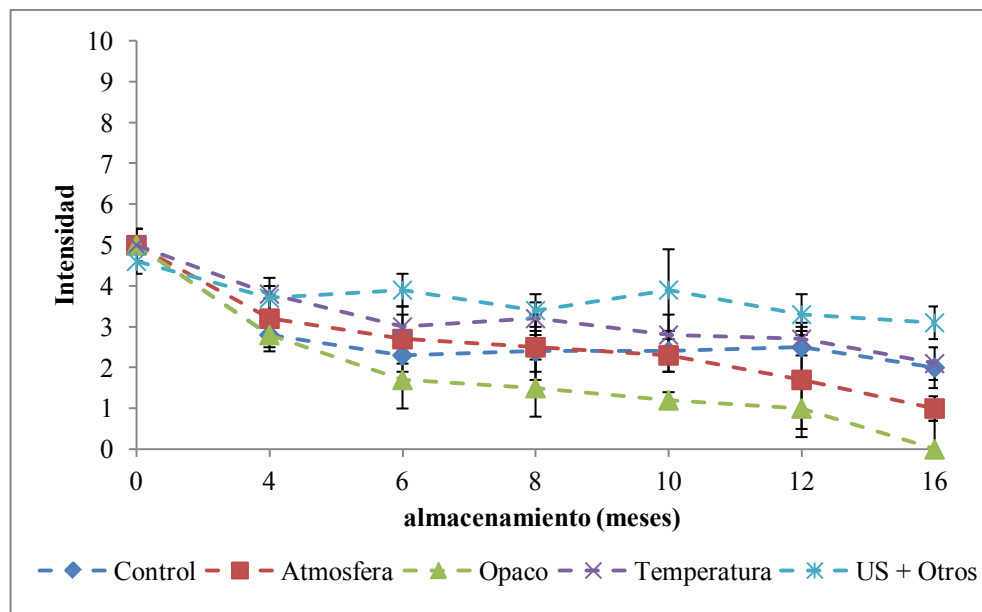


Figura 4.33. Evolución del atributo frutado de aceituna durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad *empeltre*.

Estos resultados son comparables con los observados por Samaniego-Sánchez *et al.*, (2012), al estudiar el efecto del envase PET, vidrio y Tetra-Brik® (lo cual se traduce en analizar el efecto de la transferencia de oxígeno a través del envase y la incidencia de la luz). Dichos autores observaron un ligero descenso en la intensidad del atributo frutado de aceituna a lo largo de 9 meses de conservación, para el aceite de oliva procedente de la variedad *picual*. No obstante, las muestras conservadas en oscuridad (Tetra-Brik®) fueron las que mantuvieron mejor las cualidades sensoriales del aceite de oliva durante todo el estudio.

En otro estudio, Stefanoudaki *et al.*, (2010) evaluaron los efectos del filtrado y la atmósfera inerte (N_2) durante el almacenamiento, observando cómo las muestras filtradas de aceite de oliva, procedente de la variedad *koronoiki*, almacenadas con y sin

N₂ experimentaron una clara disminución de los atributos positivos, siendo esta disminución menor para las muestras almacenada en atmosfera inerte.

En el caso del atributo *verde hoja* (**Figura 4.34**), el aceite de oliva de la variedad *empeltre* presentó valores ligeramente inferiores que en el caso del frutado de aceituna.

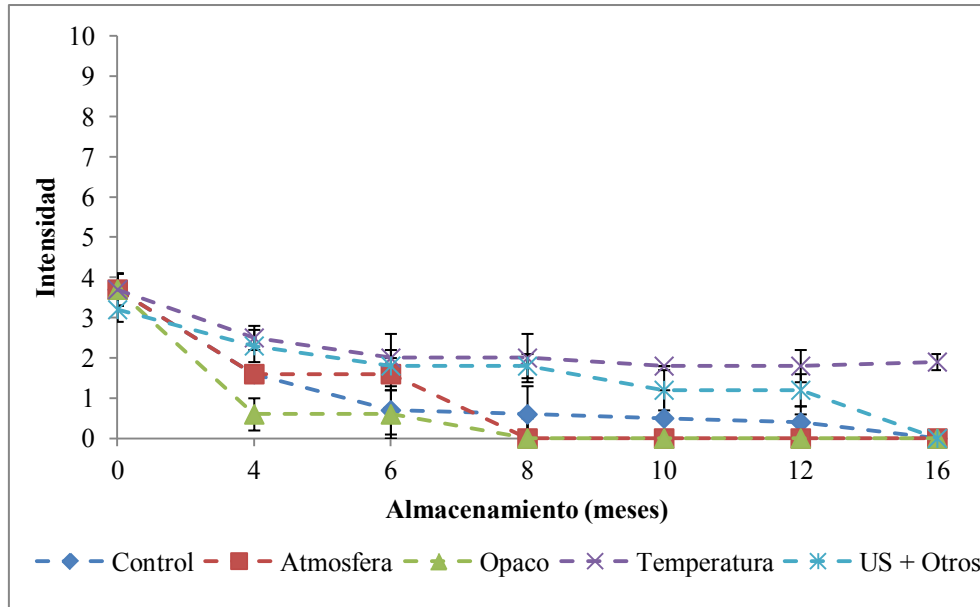


Figura 4.34. Evolución del atributo verde hoja durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad *empeltre*.

Al igual que en el caso del atributo frutado, las muestras experimentaron un descenso gradual en la intensidad de este atributo durante el período de almacenamiento, llegando a a nularse al octavo mes para las muestras conservadas en atmosfera inerte y en ausencia de luz. De todas las metodologías estudiadas, las muestras conservadas a baja temperatura (con y sin US) fueron las que experimentaron un menor descenso en la intensidad del atributo verde hoja a lo largo del estudio de conservación, siendo la muestra conservada a baja temperatura la única en la que no se anuló la intensidad del atributo verde hoja después de 16 meses de almacenamiento.

La **Figura 4.35** se muestra la evolución de la intensidad del atributo *amargo* para cada una de las metodologías de conservación estudiadas. Las muestras control, atmosfera y opaco experimentaron un descenso en la intensidad de amargo a lo largo de los 16 meses que duró el estudio de conservación, pasando de una intensidad media de 4,4 al inicio del estudio, a intensidades de 2,2 para la muestra control, 1,7 para la muestra atmosfera y 1,5 para la muestra opaco a los 16 meses de almacenamiento. Sin embargo, para las muestras almacenadas a baja temperatura (con y sin US), la

intensidad del amargo permaneció prácticamente constante hasta los 12 meses de conservación para la muestra pretratada con US (*US + Otros*), y hasta los 16 meses en el caso de las muestra conservada en frío (*Temperatura*).

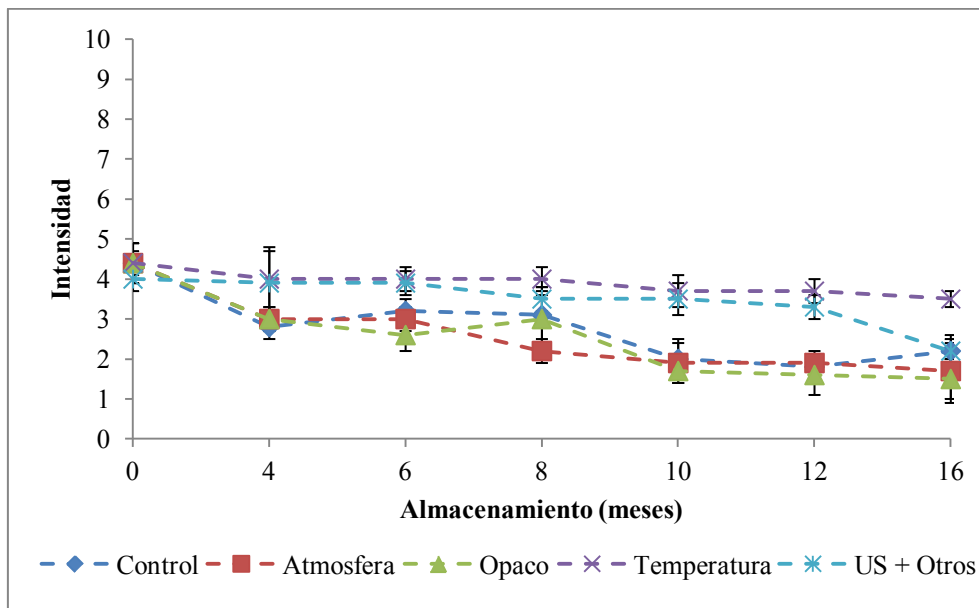


Figura 4.35. Evolución del atributo amargo durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad *empeltre*.

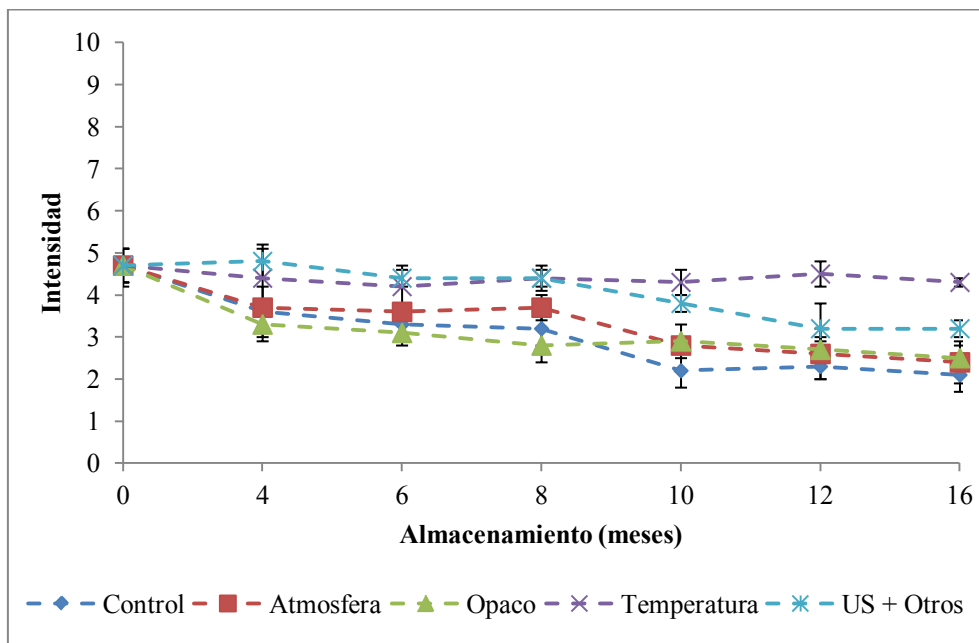


Figura 4.36. Evolución del atributo *picante* durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad *empeltre*.

Otro atributo, bastante característico en el aceite de oliva, y en concreto en el aceite de la variedad *empeltre*, es el *picante*. La evolución de dicho atributo a lo largo del estudio de conservación se expone en la **Figura 4.36**.

Tal y como puede observarse, en las muestras conservadas a baja temperatura (temperatura) la intensidad del atributo picante permaneció prácticamente constante a lo largo de los 16 meses que duró el estudio de conservación. Por otro lado, para la muestra pretratada con US (US + Otros), la intensidad del atributo picante no presentó cambios significativas durante los ocho primeros meses de conservación. A partir de este momento se observó un ligero descenso hasta alcanzar una intensidad media de 3,2 a los 16 meses de conservación. Las demás muestras de aceite evaluadas presentaron un descenso gradual desde el inicio, hasta aproximadamente el décimo mes de almacenamiento, a partir del cual se estabilizó la intensidad media del atributo picante alrededor de los 2,5 – 3 puntos, siendo la muestra control la que presentó los valores más bajos.

Samaniego-Sánchez *et al.*, (2012) y Stefanoudaki *et al.*, (2010), también estudiaron la evolución de los atributos amargo y picante en función del tipo de envase y del uso de atmosfera inerte a lo largo del período de almacenamiento, llegando a la conclusión de que la intensidad de estos atributos iba disminuyendo a lo largo del período de conservación, siendo menor la disminución, cuando se actuaba sobre las fuentes externas de oxidación.

La evolución del atributo *dulce* a lo largo del tiempo de almacenamiento se muestra en la **Figura 4.37**. Inicialmente el aceite de oliva de la variedad *empeltre* presentó valores de intensidad media en torno a 5 y como puede observarse, el atributo dulce no experimentó cambios significativos a lo largo de los 16 meses de almacenamiento.

Finalmente, el último atributo considerado fue el *astringente* (**Figura 4.38**). El valor inicial de intensidad media fue relativamente bajo, en torno a las 2 unidades. En las muestras conservadas en atmosfera inerte (*Atmosfera*) y ausencia de luz (*Opaco*), el atributo astringente desapareció a partir del cuarto mes de almacenamiento. En el caso de la muestra control se observó un descenso progresivo a lo largo de los 8 primeros meses de almacenamiento, llegando a desaparecer a partir del décimo mes de conservación. En el caso de la muestra conservada a baja temperatura (*Temperatura*),

dicho atributo se mantuvo prácticamente constante a lo largo de todo el período de conservación, mientras que para la muestra pre-tratada con ultrasonidos (*US + Otros*), a partir del décimo mes, mostró un descenso progresivo en su intensidad hasta desaparecer al final del período de almacenamiento.

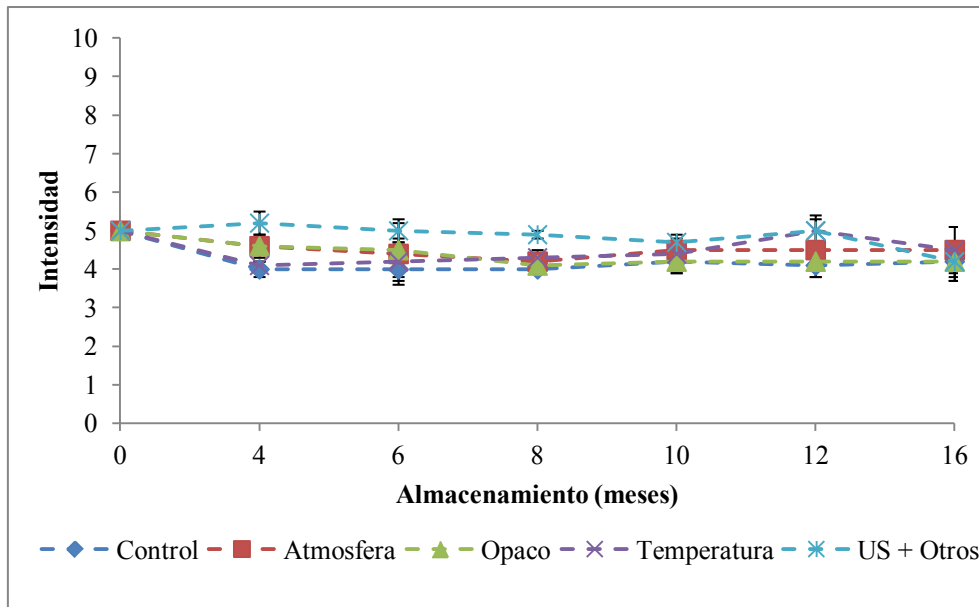


Figura 4.37. Evolución del atributo dulce durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad *empeltre*.

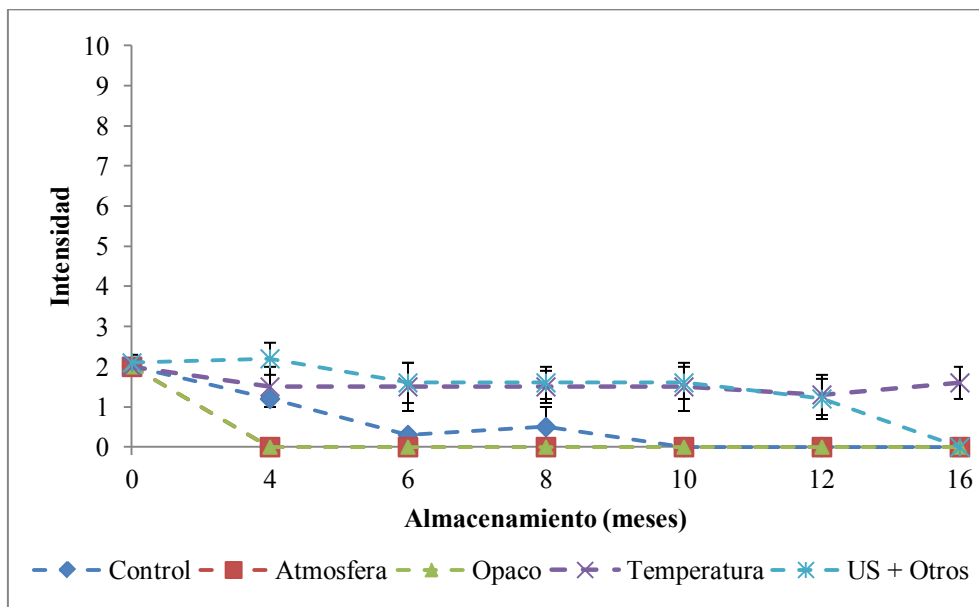


Figura 4.38. Evolución del atributo astringente durante el período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad *empeltre*.

Además de los atributos positivos mencionados hasta este momento, en el aceite de oliva de la variedad *empeltre* se han detectado otros atributos positivos tolerables y

característicos como son sensaciones que recuerdan a la almendra, alcachofa, nueces, tomatera, tomate, entre otros. La intensidad de estos atributos se agruparon de manera conjunta bajo el nombre de otros atributos tolerables, la evolución de éstos se muestra en la **Figura 4.39**.

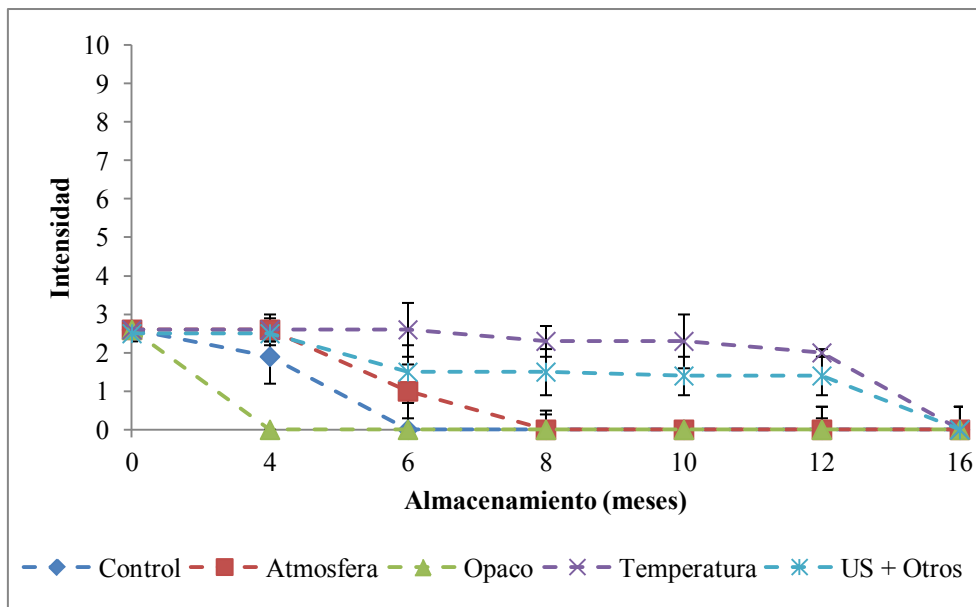


Figura 4.39. Evolución de los otros atributos tolerables durante del período de conservación en función de la metodología de almacenamiento para el aceite de oliva procedente de la variedad *empeltre*.

Tal y como puede observarse, la muestras opaco, control y atmosfera, experimentaron una pérdida gradual de estos atributos, llegando a desaparecer a los cuatro, sexto y octavo mes de conservación, respectivamente. Las muestras conservadas a baja temperatura, con y sin pre-tratamiento con US, no mostraron tal disminución en la intensidad, así los atributos de almendra y nueces se detectaron conjuntamente con cierta intensidad hasta los doce meses de almacenamiento.

b) Evolución de los defectos sensoriales

Al igual que en el caso de los atributos positivos, también se analizaron la aparición y evolución de los defectos sensoriales característicos del aceite de oliva. Ya que, como se ha comentado, el simple hecho de detectar algún tipo de defecto implica que el aceite de oliva pierda la categoría virgen extra según la normativa (CE) 640/2008.

En la **Tabla 4.18** se han reunido la evolución de los diferentes defectos sensoriales del aceite de oliva en función de las diferentes metodologías de conservación objeto de estudio y el período de almacenamiento.

Tabla 4.18. Evolución de los defectos organolépticos durante el período de conservación

Defectos	Período de conservación (meses)						
	Inicial	4	6	8	10	12	16
Control							
Atrojado/Borras	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,7	0,0 ± 1,0	0,0 ± 0,7	0,0 ± 0,8	0,0 ± 0,0	3,3 ± 1,2
Húmedo	0,0 ± 0,3	2,4 ± 0,4	4,1 ± 1,0	4,1 ± 1,4	4,1 ± 0,7	4,0 ± 0,6	4,7 ± 1,5
Avinado/Avinagrado	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,5	0,0 ± 0,9	0,0 ± 0,6	0,0 ± 0,7	0,0 ± 0,6	0,0 ± 0,8
Metálico	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Rancio	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,7	0,0 ± 0,5	0,0 ± 1,2	0,0 ± 0,7	0,0 ± 0,8	4,0 ± 1,1
Otros defectos*	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,1	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Atmosfera							
Atrojado/Borras	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,8	0,0 ± 0,3	0,0 ± 1,4	0,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 1,0
Húmedo	0,0 ± 0,3	2,4 ± 0,5	2,7 ± 0,5	3,1 ± 0,8	3,4 ± 0,3	3,6 ± 0,6	6,0 ± 1,0
Avinado/Avinagrado	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,5	0,0 ± 0,6	0,0 ± 0,9	0,0 ± 0,3	0,0 ± 0,6	2,3 ± 0,9
Metálico	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Rancio	0,0 ± 0,0	0,0 ± 1,2	2,6 ± 0,6	2,6 ± 0,6	2,6 ± 0,8	3,7 ± 0,8	5,4 ± 0,8
Otros defectos*	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,6	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Opaco							
Atrojado/Borras	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,5	0,0 ± 0,5	0,0 ± 1,3	0,0 ± 1,4	0,0 ± 0,6	0,0 ± 1,1
Húmedo	0,0 ± 0,3	3,9 ± 0,9	3,9 ± 0,6	3,9 ± 1,0	3,7 ± 0,9	4,2 ± 0,7	7,8 ± 0,1
Avinado/Avinagrado	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,5	0,0 ± 0,9	0,0 ± 0,3	0,0 ± 0,8	0,0 ± 0,3	0,0 ± 1,1
Metálico	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Rancio	0,0 ± 0,0	2,0 ± 0,6	2,0 ± 0,6	2,2 ± 0,6	2,2 ± 0,4	2,2 ± 0,6	3,7 ± 1,6
Otros defectos*	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 1,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Temperatura							
Atrojado/Borras	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,4	0,0 ± 1,0	0,0 ± 0,8	0,0 ± 1,0	0,0 ± 0,3	0,0 ± 0,4
Húmedo	0,0 ± 0,3	0,0 ± 0,4	0,0 ± 1,1	0,0 ± 1,0	0,0 ± 0,9	0,0 ± 0,4	4,1 ± 0,8
Avinado/Avinagrado	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,9	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Metálico	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Rancio	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,6	0,0 ± 0,0	1,4 ± 1,3
Otros defectos*	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,8	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Ultrasonidos							
Atrojado/Borras	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,5 ± 0,1
Húmedo	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,1	3,4 ± 0,3
Avinado/Avinagrado	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	2,5 ± 0,5
Metálico	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Rancio	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0
Otros defectos*	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0

Valores expresados en escala de intensidad (0 – 10). Expresados como mediana ± Desviación típica sólida. * Solo se detallan los indicados por más del 33% de los catadores.

Tal y como puede observarse, la muestra de aceite de oliva empeltre utilizada como control, así como las muestras conservadas en atmósfera modificada (*Atmosfera*) y ausencia de oscuridad (*Opaco*), a partir del cuarto mes de almacenamiento presentaron el defecto de humedad, además en el caso de la muestra conservada en ausencia de luz (*Opaco*) también se apreció cierta sensación a rancio. A partir de este punto del estudio, sensorialmente hablando, estos aceites abandonarían la categoría de aceite de oliva virgen extra según el Reglamento (CEE 640/2008). Para estas muestras, tal y como se observa en la **Tabla 4.18**, la intensidad de estos defectos aumentó progresivamente y de forma significativa a lo largo del periodo de conservación hasta alcanzar valores de hasta 7,8 de intensidad en el defecto de humedad para la muestra opaco al finalizar el estudio de conservación. Cabe señalar que al final del estudio se detectaron los defectos de atrojado en las muestras control y del defecto de avinado en las muestras conservadas en atmósfera modificada.

Sin embargo, las muestras conservadas a baja temperatura (con y sin pretratamiento con US) presentaron comportamientos claramente diferentes al resto de las metodologías de conservación. En el caso de las muestras de aceite conservadas a baja temperatura (*Temperatura*), no se detectó defecto alguno hasta el último análisis del estudio (16 meses), en donde apareció cierta sensación a humedad y rancio. En el caso de la muestra pre-tratada con US (*US + Otros*), tampoco presentaron defectos algunos hasta el análisis correspondiente al dieciseisavo mes de conservación, en donde aparecieron los defectos de humedad, atrojado y avinado/avinagrado. Cabe mencionar que la muestra pretratada con US no apareció el defecto rancio a lo largo de los 16 meses que duró el estudio de conservación.

Samaniego-Sánchez *et al.* (2012) evaluaron el efecto del tipo de envase y la temperatura de almacenamiento de aceite de oliva para la variedad picual. Dichos autores observaron como las muestras conservadas en botellas de cristal a 20 y 4 °C, a partir del tercer mes de almacenamiento empezaron a detectarse los defectos de rancio y avinado los cuales aumentaron progresivamente hasta finalizar el estudio (9 meses). Por su parte, las muestras almacenadas en Tetra-Brik® (opaco) a 20 y 4 °C no experimentaron ningún tipo de defecto durante los 9 meses que duró el estudio. Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, el análisis sensorial expuesto en esta tesis no se ajustaría exactamente a las conclusiones de este trabajo, ya que, según los autores el efecto de la temperatura no fue capaz de detener la aparición de defectos

sensoriales. De hecho, tal y como se ha demostrado en este estudio, solo el hecho de almacenar el aceite de oliva a baja temperatura (6 - 8 °C) fue capaz de evitar la aparición de defectos hasta al menos los 12 meses de conservación.

Por lo tanto, parece claro que la metodología más adecuada, desde el punto de vista sensorial, para el almacenamiento del aceite de oliva virgen extra, es la conservación a baja temperatura, sin llegar a diferenciar claramente entre las muestras pre-tratadas con US y las no pre-tratadas. Utilizando estas condiciones de almacenamiento se ha conseguido mantener dentro de la categoría virgen extra el aceite de oliva de la variedad *empeltre* hasta un período de 12 meses, lo cual es más destacable si se tiene en cuenta el GA inicial del aceite, próximo al límite regulado para la categoría virgen extra.

4.2.7. Otras observaciones relevantes: cristalización de las muestras durante el período de conservación a baja temperatura

Analizando de forma conjunta los resultados de los análisis físico-químicos y sensoriales, realizados a lo largo de la evolución de la conservación del aceite de oliva, parece claro que la metodología más adecuada para la conservación del aceite de oliva virgen extra cuando este presenta inicialmente un GA elevado y próximo al límite legislado para la máxima categoría temperatura, es la conservación a baja temperatura. No obstante, hay que destacar el hecho que cuando el aceite de oliva se encuentra dentro del rango de temperaturas comprendidas entre 0 y 8 °C se produce la formación de un precipitado de color blanco-amarillento debido a la cristalización de los triglicéridos (TAGs).

La variedad de ácidos grasos que forman los triglicéridos presentes al aceite de oliva son en parte los responsables de la complejidad del proceso de cristalización (Jansen y Birch, 2009). Si se considera que los ácidos grasos representan aproximadamente un 99% en peso del aceite de oliva y que de éstos el mayoritario (65-80 %) es el ácido oleico, este será el componente principal que condicionará el proceso de cristalización del aceite de oliva.

Tomando en consideración este importante aspecto, era más que previsible que las muestras conservadas a temperatura de refrigeración, a medida que pasara el tiempo de almacenaje, mostraran síntomas de la cristalización, y de hecho, así se observó de forma clara en este tipo de muestras.

Las muestras conservadas a temperatura de refrigeración, tanto la tratada con ultrasonidos como la que no fue tratada, como ya se ha comentado en el apartado de envasado, se conservaron a una temperatura aproximada de 5 - 6 °C. Durante los análisis periódicos a los que fueron sometidas, a partir del cuarto mes se empezaron a detectar importantes diferencias en el grado de cristalización que presentaban ambas muestras. Así, a pesar del color oscuro del vidrio, se observó como las muestras conservadas a temperatura de refrigeración sin tratamiento previo con US presentaban más síntomas de cristalización que las muestras conservadas a la misma temperatura, pero tratadas con pulsos ultrasónicos.

En la **Figura 4.40** puede observarse la diferencia en el grado de cristalización entre una muestra tratada con US (probeta de la izquierda) y la no tratada (probeta de la derecha) después de ser conservadas a una temperatura de 4 – 6 °C, para el caso del aceite de oliva procedente de la variedad arbequina.

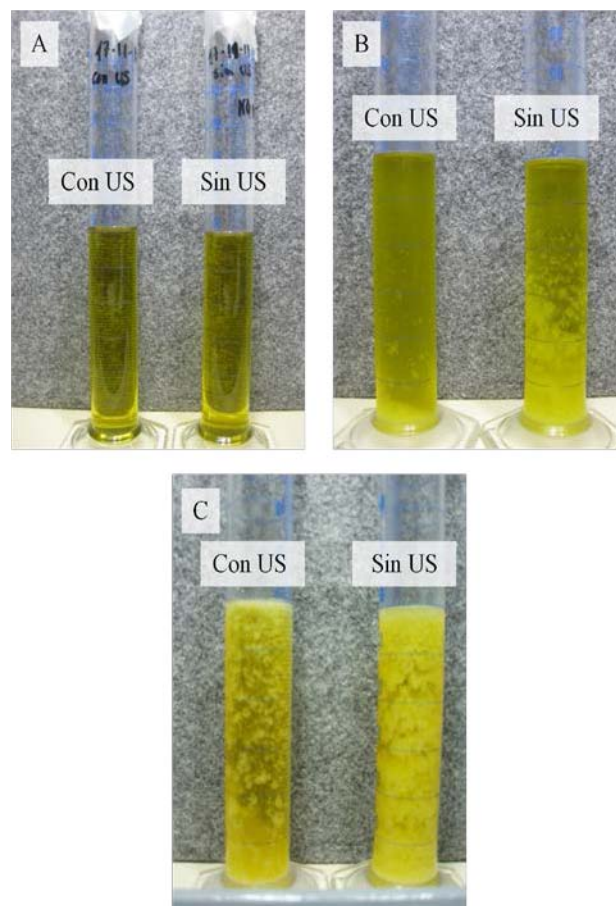


Figura 4.40. Comparación de la cristalización para de aceite de oliva virgen extra de la variedad *arbequina* tratada con y sin US; a) muestra inicial; b) después de 4 meses de almacenamiento a 6-8°C de temperatura y c) después de 8 meses de almacenamiento a 4 - 6° C de temperatura.

El comportamiento de las muestras correspondientes a la variedad *empeltre* en cuanto al proceso de cristalización de los TAGs fue muy similar a lo observado para la variedad *arbequina*, tal y como puede apreciarse en la **Figura 4.41**.

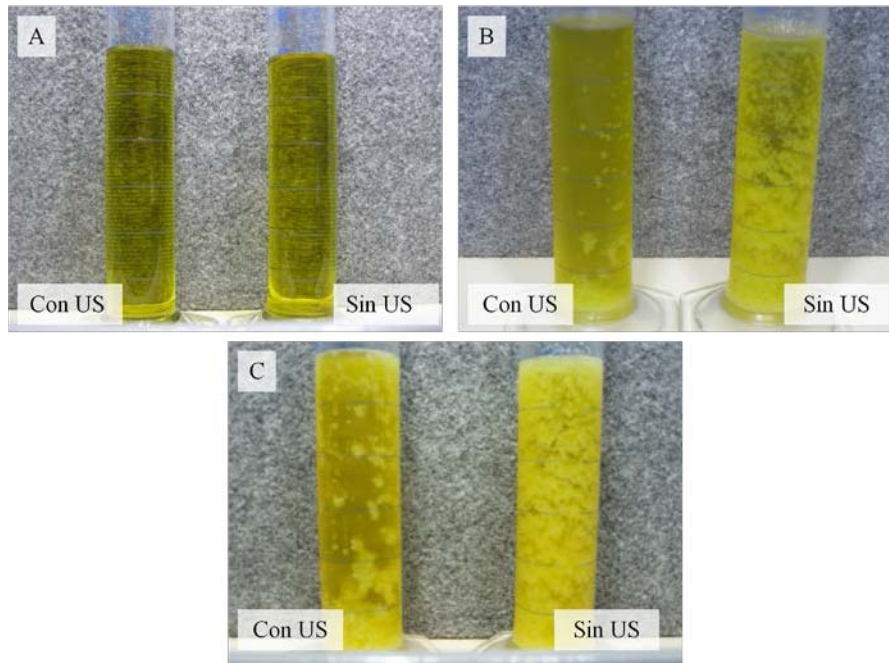


Figura 4.41. Comparación de la cristalización para de aceite de oliva virgen extra de la variedad *empeltre* tratada con y sin US; a) muestra inicial; b) después de 4 meses de almacenamiento a 4 -6°C de temperatura y c) después de 8 meses de almacenamiento a 4 – 6 °C de temperatura.

Una posible explicación de este fenómeno se basa en el hecho que la aplicación de los US pueda afectar a los agentes de nucleación presentes en la matriz del aceite de oliva, reduciendo su capacidad de actuar como tales. No obstante, sería interesante investigar con más profundidad este importante aspecto, dada la importancia de este fenómeno a nivel industrial por los elaboradores de aceite de oliva.

Con lo descrito anteriormente se entiende que realizando un pretratamiento con pulsos ultrasónicos y almacenando el aceite en condiciones óptimas, puede tratarse de un buen método de conservación, ya que aparte de mantener las propiedades fisico-químicas y organolépticas, se mantiene el aceite más tiempo en estado líquido a temperatura de refrigeración, ya que se evita un problema característico de los aceites conservados a baja temperatura como es el de la cristalización de la materia grasa.

Por este motivo, al no tener constancia del uso de US en la conservación del aceite de oliva, se decidió proteger dicha metodología mediante una patente nº P25827ES00 (Femenia *et al.*, 2011).

4.3. Aprovechamiento de los subproductos de almazara. Extracción de compuestos bioactivos asistida acústicamente

En este tercer y último bloque de la presente tesis doctoral se presentan los resultados experimentales obtenidos en el proceso de extracción de compuestos fenólicos del orujo de almazara (OOMW) asistido mediante ultrasonidos (US) de potencia.

4.3.1. Efecto de los US de potencia sobre la extracción de compuestos fenólicos del orujo de almazara

En función de la materia prima, y antes de la aplicación de los US de potencia, la selección del disolvente extractor es fundamental para poder llevar a cabo la extracción de compuestos fenólicos con éxito. En este sentido, y teniendo en cuenta, por una parte, que las mezclas alcohol-agua son los más utilizadas en este tipo de extracciones (Wang *et al.*, 2008; Lafka *et al.*, 2011; Ahmad-Qasem *et al.*, 2013), y por otra, la posibilidad de utilizar los extractos como ingredientes funcionales en la industria agroalimentaria (lo que conlleva la utilización de solventes no tóxicos), hizo que una solución de etanol:agua al 50% (v/v), fuera el disolvente seleccionado para la realización de este tipo de extracciones.

Una vez fijado el tipo de disolvente extractor, se procedió a evaluar el efecto de los US en el proceso de extracción de los compuestos fenólicos del orujo de almazara en función de la potencia aplicada. Tal y como puede observarse en la **Figura 4.42**, a medida que la potencia de US aplicada aumentó de 175 a 425 W/L, se produjo un aumento significativo ($p < 0,05$) en la cantidad de FT extraídos, en concreto se pasó de 2500 hasta 3650 mg ácido cafeico/ kg O OMW (bs). Hay que destacar que estas experiencias se llevaron a cabo a una temperatura controlada de 20°C con la finalidad de minimizar el efecto que ejerce la temperatura sobre la extracción de este tipo de compuestos. Se ha comprobado como los US juegan un papel importante en la ruptura del tejido vegetal aumentando los procesos de transferencia de materia y por tanto el rendimiento de extracción (Ahmad-Qasem *et al.*, 2013). Estos resultados están en concordancia con las observaciones realizadas por Carcel *et al.*, (2010), quienes observaron como los rendimientos de extracción de los FT a partir de hojas de olivo eran superiores cuando el proceso era asistido mediante US en comparación con la extracción convencional (agitación mecánica). De hecho, son numerosos los autores que

han descrito recientemente como los US de potencia mejoran la extracción de diferentes compuestos bioactivos de interés nutricional a partir de diferentes matrices vegetales (Carcel *et al.*, 2010; Hossain *et al.*, 2012; Şahim *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Minjares-Fuentes *et al.*, 2014; González-Centeno *et al.*, 2014)

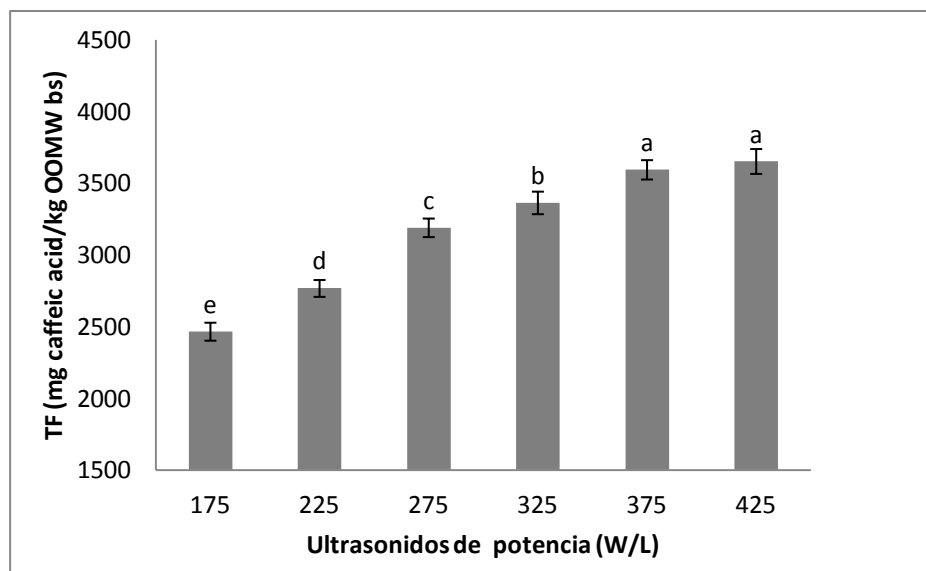


Figura 4.42 Efecto de los ultrasonidos de potencia sobre la extracción de compuestos fenólicos (temperatura constante, 20 °C).

Una vez demostrado la eficacia de la extracción asistida con US de potencia, el objetivo del trabajo fue la optimización del proceso de extracción en función de la densidad de potencia de US aplicada, de la relación disolvente/soluto y del tiempo de extracción. Estas mismas variables han sido estudiadas en la optimización de la extracción, asistida por US, de compuestos fenólicos en granadas (Tabaraki *et al.*, 2012), mejorana (Hossaim *et al.*, 2012) o *Sparganii rhizoma* (Wang *et al.*, 2013).

4.3.2. Aplicación del diseño experimental

Con el objeto de optimizar el proceso de extracción de FT, y a su vez de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir del OOMW, en función de la potencia ultrasónica, de la relación disolvente/soluto y del tiempo de operación, se aplicó la metodología de superficie de respuesta (RSM). Para ello, se utilizó un diseño experimental tipo Box-Behnken (BBD) de tres variables, con tres niveles experimentales para cada una de ellas, realizando un total de 17 experimentos con cinco réplicas del punto central tal como se puede observar en la **Tabla 4.19**.

Tabla 4.19. Condiciones de extracción del diseño Box-Behnken

Exp.	Potencia US (W/L)	Ratio disolvente/soluto (mL/g)	Tiempo de extracción (min)
1	375 (1)	25 (-1)	15 (0)
2	375 (1)	15 (0)	27 (1)
3	375 (1)	5 (1)	27 (1)
4	275 (0)	15 (0)	15 (0)
5	275 (0)	15 (0)	15 (0)
6	275 (0)	5 (1)	3 (-1)
7	275 (0)	25 (-1)	27 (1)
8	275 (0)	15 (0)	15 (0)
9	135 (-1)	25 (-1)	15 (0)
10	135 (-1)	5 (1)	15 (0)
11	375 (1)	15 (0)	3 (-1)
12	275 (0)	15 (0)	15 (0)
13	175 (-1)	15 (0)	3 (-1)
14	275 (0)	15 (0)	15 (0)
15	175 (-1)	15 (0)	27 (1)
16	275 (0)	5 (1)	27 (1)
17	275 (0)	25 (-1)	3 (-1)

Los valores 1, 0, -1 corresponden a las variables codificadas

De acuerdo con el diseño Box-Behnken propuesto en la **Tabla 4.20** se presentan los 17 valores experimentales y calculados del contenido de FT de los extractos obtenidos para cada uno de los experimentos realizados, así como de la capacidad antioxidante de los extractos analizada mediante los métodos ABTS, CUPRAC y FRAP.

Tal y como puede observarse, los valores experimentales obtenidos oscilaron entre 1657,1 y 3596,1 mg ácido cafeico/kg OOMW (bs) para los FT. En cuanto a la capacidad antioxidante de dichos extractos, los resultados estuvieron comprendidos entre 15,99 y 35,72 mM trolox/kg OOMW (bs) para el método CUPRAC, entre 5,92 y 16,58 mM trolox/Kg OOMW (bs) para el método ABTS y entre 7,99 y 16,51 mM trolox/kg OOMW (bs) para el método FRAP.

Tabla 4.20. Valores experimentales y calculados del contenido de FT, y de la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos a partir de la extracción de orujo asistida mediante ultrasonidos de potencia.

Experimento	FT ^b		CUPRAC ^c		ABTS ^c		FRAP ^c	
	Experimental ^a	Calculado	Experimental ^a	Calculado	Experimental ^a	Calculado	Experimental ^a	Calculado
1	3479,2 ± 49,9	3690,7	34,56 ± 1,24	36,16	13,62 ± 0,70	14,14	16,13 ± 0,79	16,81
2	3596,1 ± 78,6	3330,0	35,72 ± 1,68	33,09	16,58 ± 0,68	16,43	16,51 ± 0,61	12,19
3	2958,4 ± 99,5	3198,5	27,75 ± 0,65	30,40	8,36 ± 0,36	8,97	11,08 ± 0,71	12,74
4	3251,5 ± 104,1	3090,0	29,80 ± 1,07	28,92	12,79 ± 0,39	11,81	14,64 ± 0,70	14,43
5	3256,7 ± 22,7	3090,1	30,24 ± 1,09	28,92	12,61 ± 0,57	11,81	14,88 ± 0,75	14,43
6	2133,0 ± 97,9	2078,5	20,23 ± 0,96	19,21	6,87 ± 0,17	6,78	9,23 ± 0,52	11,86
7	3521,7 ± 64,7	3576,3	35,31 ± 1,73	36,01	15,00 ± 0,69	14,46	16,27 ± 0,51	13,65
8	3365,6 ± 57,3	3090,0	30,45 ± 1,35	28,92	12,10 ± 0,50	11,81	15,94 ± 0,58	14,43
9	3529,7 ± 124,3	3289,6	35,71 ± 1,32	32,69	11,35 ± 0,30	10,62	16,31 ± 0,57	14,65
10	2256,6 ± 56,8	2045,1	18,84 ± 0,69	17,24	6,78 ± 0,32	6,32	9,53 ± 0,20	8,87
11	2986,2 ± 62,4	2800,6	27,02 ± 1,56	25,27	9,67 ± 0,44	9,03	14,23 ± 0,57	16,22
12	2892,7 ± 62,9	3090,0	27,86 ± 1,06	28,92	10,51 ± 0,30	11,81	13,91 ± 0,53	14,43
13	1657,1 ± 58,8	1923,2	15,99 ± 0,83	18,58	5,92 ± 0,17	6,46	7,99 ± 0,27	12,32
14	2683,6 ± 129,2	3090,0	25,97 ± 0,85	28,92	10,93 ± 0,52	11,81	12,74 ± 0,43	14,43
15	2467,1 ± 50,4	2652,7	21,35 ± 1,15	23,15	10,19 ± 0,40	10,86	12,05 ± 0,29	10,07
16	2348,9 ± 111,4	2374,8	22,32 ± 1,00	22,20	8,40 ± 0,40	8,31	10,41 ± 0,33	6,79
17	2639,7 ± 90,9	2613,7	26,50 ± 1,32	26,61	8,03 ± 0,29	8,13	11,23 ± 0,49	14,86

^a Todos los resultados se presentan como media ± desviación estándar (n=6); ^b los resultados se expresan en mg ácido cafeico/Kg OOMW (bs); ^c los resultados se expresan en mM trolox/kg OOMW (bs)

De los 17 experimentos realizados, los extractos que presentaron un mayor contenido de FT, y a su vez una capacidad antioxidante más elevada, determinada por las tres técnicas utilizadas, fueron los extractos obtenidos utilizando las condiciones de 375 W/L de potencia, 15 mL/g de grado de dilución y 27 min de extracción (experimento 2).

4.3.3. El ajuste de los modelos de superficie de respuesta

Con la finalidad de evaluar la significancia de los modelos de regresión lineal múltiple generados por la RSM se realizó un análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 4.21). El ANOVA mostró como todos los modelos de regresión lineal múltiple obtenidos tanto para la extracción de FT, así como para la determinación de la capacidad antioxidante (según la metodología CUPRAC, ABTS y FRAP) fueron significativos ($p < 0,05$).

Tabla 4.21. ANOVA del DBB utilizado para la extracción de compuestos fenólicos, asistida con US, a partir del orujo de almazara

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F	<i>p</i>	R ²	Adeq-prec.
FT							
Regresión	9	4473172	497019	4,60	0,028	0,855	9,91
Lineal	3	3509011	1169670	10,82	0,005		
Cuadrado	3	701720	233907	2,16	0,18		
Interacción	3	262441	87480	0,81	0,528		
Falta de ajuste	3	422736	140912	1,69	0,306		
CUPRAC							
Regresión	9	530,44	58,93	7,40	0,008	0,905	12,36
Lineal	3	440,14	146,71	18,41	0,001		
Cuadrado	3	53,87	17,95	2,25	0,169		
Interacción	3	36,42	12,14	1,52	0,290		
Falta de ajuste	3	41,45	13,81	3,86	0,113		
ABTS							
Regresión	9	116,10	12,90	11,71	0,002	0,938	18,83
Lineal	3	95,27	31,75	28,84	0,000		
Cuadrado	3	14,31	4,77	4,33	0,050		
Interacción	3	6,52	2,17	1,97	0,207		
Falta de ajuste	3	3,62	1,20	1,18	0,422		
FRAP							
Regresión	9	108,08	12,01	4,54	0,029	0,854	13,81
Lineal	3	86,42	28,81	10,89	0,005		
Cuadrado	3	16,39	5,46	2,07	0,193		
Interacción	3	5,25	1,75	0,66	0,601		
Falta de ajuste	3	12,87	4,29	3,04	0,155		

Los modelos de regresión lineal múltiple generados mediante la aplicación de la RSM están constituidos por tres componentes que determinan el orden de los mismos: un componente lineal, un componente cuadrático y un componente de interacción lineal. Los cuales a su vez determinan el orden del modelo desarrollado. Los modelos desarrollados para los FT, CUPRAC y FRAP mostraron que solo el componente lineal fue significativo ($p < 0,05$) mientras que para el ABTS los fueron tanto el componente lineal como el cuadrático.

Adicionalmente, se evaluó el análisis de la falta de ajuste (LOF) de los modelos desarrollados, con el objetivo de observar si estos se ajustan correctamente a los datos experimentales. Un valor de $p > 0,05$ en la prueba de LOF indica que el modelo formulado se ajusta a los datos experimentales, y que tiene la capacidad de predecir correctamente la respuesta (Bezerra *et al.*, 2008). En este caso, el análisis de LOF mostró que los modelos formulados para la extracción de FT, así como los correspondientes a la capacidad antioxidante (CUPRAC, ABTS y FRAP), se ajustaron a los datos experimentales ($p > 0,05$).

Por otra parte, el coeficiente de correlación R^2 también fue utilizado para evaluar el porcentaje de respuestas que son explicadas por los modelos formulados. Los valores de R^2 fueron de 0,855 para el modelo de los FT, mientras que para los modelos de la capacidad antioxidante fue de: 0,905 para el método CUPRAC, 0,938 para el método ABTS y 0,854 para el FRAP.

Finalmente, para una mejor validación de los modelos propuestos, se compararon los valores experimentales (X_{exp}) y los calculados (X_{calc}) en base al parámetros estadísticos ‘adequate precision’ (AP, ecuación [3.17]) y error relativo medio (ERM, ecuación [3.18]).

El parámetro AP determina la relación existente entre las respuestas calculadas y el error residual del diseño experimental. Cuando toma valores superiores a 4 se considera que el error residual del conjunto de datos es lo suficientemente pequeño con respecto a los valores calculados, como para que el modelo pueda predecir satisfactoriamente las respuestas en la zona experimental o de operación (Noordin *et al.*, 2004). En el presente estudio, los valores de AP (**Tabla 4.21**) fueron 9,91 para el modelo correspondiente a los FT, mientras que para los modelos de la capacidad antioxidante fue de: 12,36 para el método CUPRAC, 18,83 para el método ABTS y

13,81 para el método FRAP, presentando en todos los casos un ratio señal/ruido superior a 4.

Por su parte, el parámetro ERM permite evaluar la precisión del modelo, debiendo presentar valores reducidos, cuanto más bajo es el valor más preciso es el modelo (Bas y Boyaci, 2007). En el presente estudio, el ERM para el modelos de FT fue de 6,71%, mientras que para la capacidad antioxidante fue de 6,16%, 5,25% y 5,06% para los modelos correspondientes a los métodos CUPRAC, ABTS y FRAP, respectivamente. Confirmando nuevamente la bondad de los modelos propuestos.

En base a los resultados obtenidos en el ANOVA, el coeficiente de correlación, la falta de ajuste, y los parámetros AP y ERM, puede concluirse que los modelos formulados para la extracción asistida por US de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del orujo de almazara, explican satisfactoriamente el comportamiento del sistema, presentando un buen ajuste de los resultados experimentales a la ecuación de segundo orden [4.1] y pueden, en definitiva, utilizarse para la predicción de las respuestas por interpolación en el dominio experimental considerado.

En base a esto, se formularon los modelos para cada una de las respuestas del proceso.

[4.2] Fenólicos totales:

$$FT = 3090,04 + 388,67X_1 - 434,19X_2 + 314,72X_3 - 9,12X_1^2 - 24,93X_2^2 - 404,26X_3^2 + 188,07X_1X_2 - 50,02X_1X_3 - 166,55X_2X_3$$

[4.3] Capacidad antioxidante - CUPRAC:

$$CUPRAC = 28,922 + 4,157X_1 - 5,303X_2 + 3,098X_3 - 0,395X_1^2 + 0,595X_2^2 - 3,509X_3^2 + 2,425X_1X_2 + 0,812X_1X_3 - 1,600X_2X_3$$

[4.4] Capacidad antioxidante - ABTS:

$$ABTS = 11,811 + 1,543X_1 - 2,137X_2 + 2,227X_3 - 0,522X_1^2 - 1,276X_2^2 - 1,088X_3^2 - 0,219X_1X_2 + 0,257X_1X_3 - 1,231X_2X_3$$

[4.5] Capacidad antioxidante - FRAP:

$$FRAP = 14,420 + 1,507X_1 - 2,462X_2 + 1,569X_3 - 0,124X_1^2 - 1,034X_2^2 - 1,601X_3^2 + 0,429X_1X_2 - 0,443X_1X_3 - 0,965X_2X_3$$

A continuación, los términos de cada uno de los componentes de los modelos fueron analizados estadísticamente con el objetivo de observar aquellos que afectan significativamente a la respuesta del modelo. Para ello, se utilizaron los diagramas de Pareto con la finalidad de observar de forma gráfica aquellos términos que fueron estadísticamente significativos ($p < 0,05$). Además, este tipo de gráficos permiten observar la jerarquía en importancia de los diferentes términos del modelo. Este análisis se realizó para cada uno de los modelos, los cuales se muestran en los apartados siguientes.

4.3.3.1. Extracción de compuestos fenólicos

El diagrama de Pareto obtenido para el modelo de extracción de FT (**Figura 4.43**) mostró como el término lineal del grado de dilución (x_2) y de la potencia de US (x_1), en este orden, son responsables de los efectos más importantes involucrados en el modelo. Además, los términos lineales de tiempo (x_3) y el término cuadrático del tiempo de extracción (x_3^2) también mostraron efectos significativos sobre la extracción de FT del orujo de almazara. Por el contrario, el término de interacción entre variables (x_1*x_2 ; x_1*x_3 y x_2*x_3) así como los términos cuadrático del grado de dilución (x_2^2) y de potencia de US (x_1^2) no presentaron efectos significativos ($p > 0,05$) para el modelo de los FT.

No se han encontrado estudios en los cuales se evaluarán los efectos de la EAU de compuestos bioactivos a partir de orujo de almazara. No obstante, estos resultados son similares o comparables a los observados por Ghafoor *et al.*, (2009a y 2009b) quienes indicaron que el tiempo de extracción era el término estadísticamente más significativo en la EAU de FT y en la capacidad antioxidante en pepitas y pieles de uva. Şahim *et al.*, (2013) llegaron a la misma conclusión al estudiar el efecto del grado de dilución, el tiempo de extracción y la concentración de EtOH como disolvente extractor en la EAU de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en hojas de olivo.

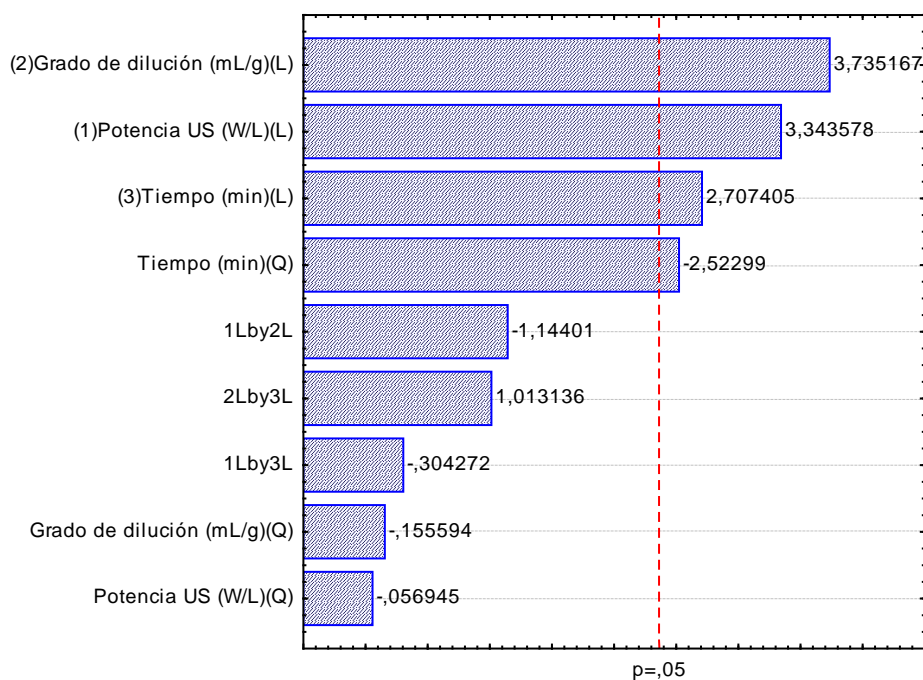


Figura 4.43. Diagrama de Pareto correspondiente a la extracción de FT del orujo de almazara en función de las variables de proceso

4.3.3.2. Capacidad Antioxidante

A continuación se muestran los diagramas de Pareto correspondientes a la capacidad antioxidante del orujo de almazara evaluado según las metodologías CUPRAC, ABTS y FRAP.

a) CUPRAC

La **Figura 4.44** muestra el diagrama de Pareto que permite observar de forma gráfica los diferentes términos que presentaron efectos significativos en el modelo formulado para el método de CUPRAC.

Como puede observarse en la figura, el modelo para el método de CUPRAC mostró una tendencia similar a la descrita para los FT, siendo el término lineal del grado de dilución (x_2) el más representativo, seguido de la potencia de US (x_1) así como de los términos lineal y cuadrático del tiempo de extracción (x_3^2). De forma análoga a los FT los términos de interacción entre variables (x_1*x_2 ; x_1*x_3 y x_2*x_3) así como los términos cuadráticos del grado de dilución (x_2^2) y de la potencia de US (x_1^2) no presentaron efectos significativos ($p > 0,05$).

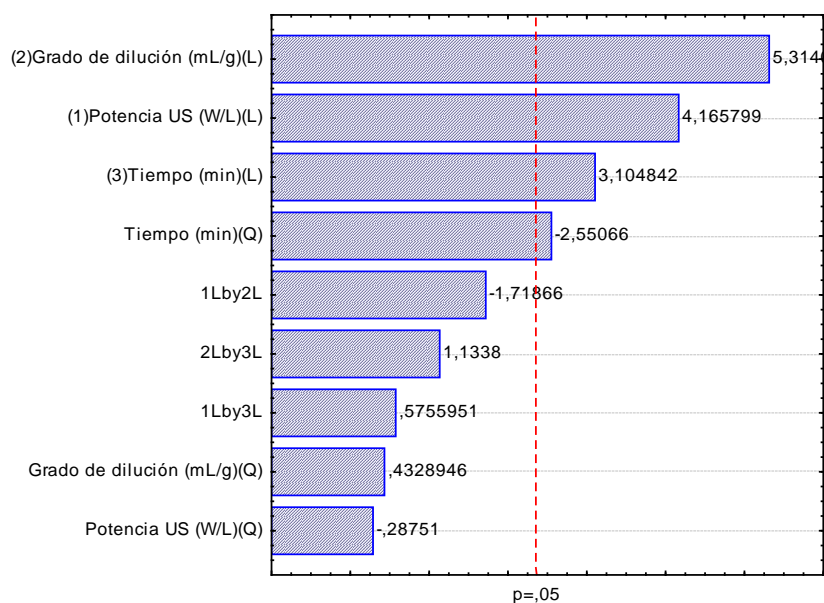


Figura 4.44. Diagrama de Pareto para el modelo correspondiente a la capacidad antioxidante determinada mediante el método de CUPRAC en función de las variables de proceso

b) ABTS

En el caso de la capacidad antioxidante determinada mediante el método del ABTS, el diagrama de Pareto se muestra en la **Figura 4.45**. Según el análisis de varianza de este método, y a diferencia del método CUPRAC, el término lineal del tiempo de extracción (x_3) y grado de dilución de la muestra (x_2) fueron los parámetros que presentaron más significancia del modelo. Además, aunque en menor medida, los términos lineales de la potencia de US (x_1), el término cuadrático del grado de dilución (x_2^2), así como el término de interacción entre el grado de dilución y el tiempo de extracción (x_2*x_3) también mostraron efectos significativos sobre la capacidad antioxidante evaluada según el método ABTS. Por el contrario, los términos de interacción entre variables potencia de US y grado de dilución (x_1*x_2), la interacción entre la potencia de US y el tiempo de extracción (x_1*x_3), así como los términos cuadráticos del tiempo de extracción (x_3^2) y potencia de ultrasonidos (x_1^2) no presentaron efectos significativos ($p > 0,05$).

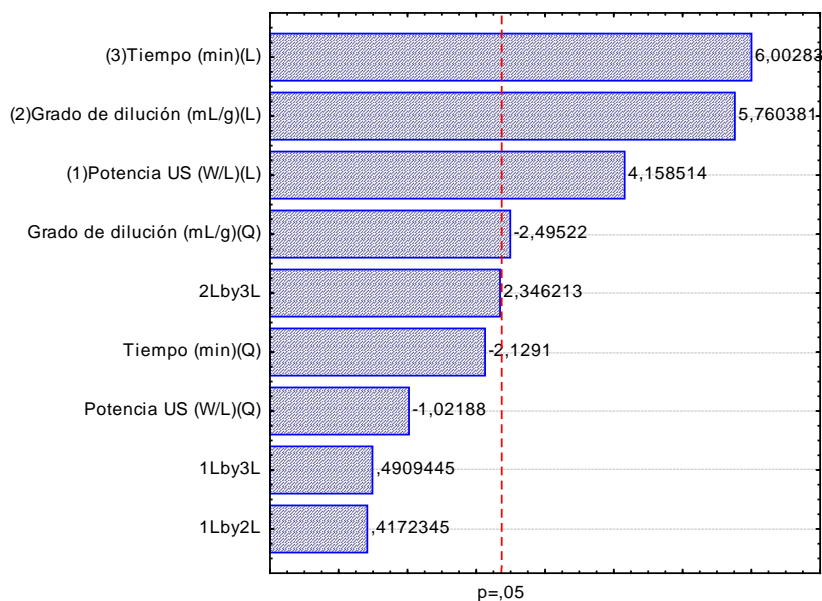


Figura 4.45. Diagrama de Pareto para el modelo correspondiente a la capacidad antioxidante determinada mediante el método de ABTS en función de las variables de proceso

c) FRAP

En la **Figura 4.46** Se representa el diagrama de Pareto para el método FRAP.

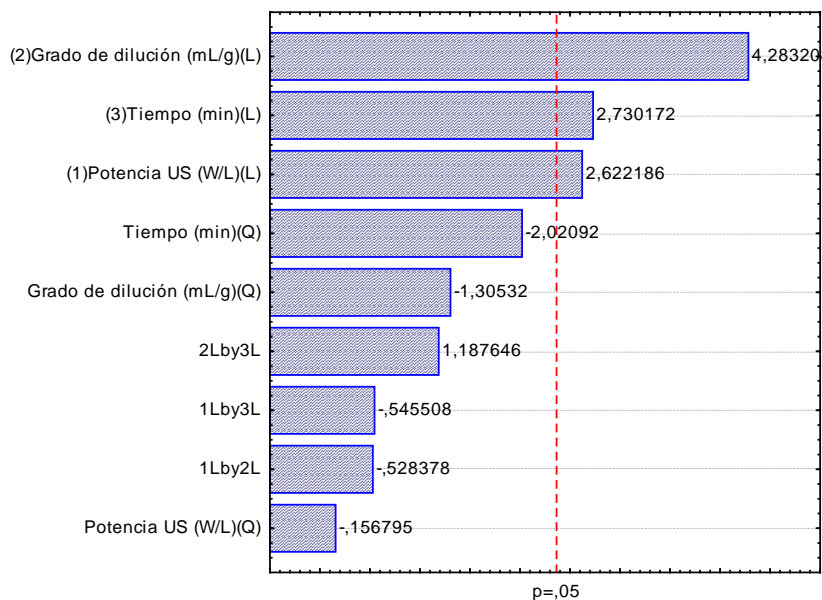


Figura 4.46. Diagrama de Pareto para el modelo correspondiente a la capacidad antioxidante determinada mediante el método de FRAP en función de las variables de proceso

En este caso, solo tuvieron significancia los términos lineales, entre ellos, el más significativo fue el término lineal del grado de dilución (x_2) seguido de los términos

lineales de tiempo de extracción (x_3) y del término lineal de la potencia de US (x_1). Los demás términos (cuadráticos e interacciones entre variables) no fueron significativos.

4.3.4. Superficies de respuesta

La superficie de respuesta es la representación gráfica del modelo generado por la regresión lineal múltiple. De esta forma es posible visualizar la(s) respuesta(s) en función de las variables o factores del proceso estudiado. Estas graficas pueden ser presentadas en dos y tres dimensiones, las cuales son conocidas comúnmente como grafica de contorno y gráfica de superficie, respectivamente.

Las representaciones graficas generadas por los modelos de FT, y de capacidad antioxidante evaluada según los métodos CUPRAC, ABTS y FRAP, de los extractos obtenidos, mediante asistencia ultrasónica, a partir del OOMW, se muestran en las **Figuras 4.47, 4.48, 4.49 y 4.50**, respectivamente. En los gráficos 2D y 3D se muestra la respuesta en función de dos de las tres variables analizadas, mientras que la variable restante se mantiene en el punto intermedio o nivel cero.

4.3.4.1. Efecto de las variables de extracción sobre los fenólicos totales

En las **Figuras 4.47a, b y c** se representa el efecto de la potencia acústica y del grado de dilución, así como del tiempo de procesado sobre la extracción asistida por US de compuestos fenólicos del orujo de almazara. Con respecto al efecto simultáneo del grado de dilución y la potencia acústica (**Figura 4.47a**), se observó un incremento lineal del rendimiento de extracción a medida que aumentaba la potencia de US desde 175 hasta 370 W/L. Este efecto lineal también se observó para el aumento del grado de dilución.

En base a ello, la mayor extracción de compuestos fenólicos del orujo se observa a grados de dilución altos y potencias de US elevadas. Estos resultados coinciden con las observaciones de Ahmad-Qasem *et al.* (2013), los cuales utilizando una sonda de ultrasonidos similar a la utilizada en este trabajo, concluyeron que a medida que aumentaba la potencia ultrasónica aumentaba el rendimiento de extracción de FT utilizando como material de partida hojas de olivo. El hecho de que los mayores rendimientos se consiguieran a grados de dilución altos es consecuencia del gradiente de concentración entre las dos fases (Şahim *et al.*, 2013). Este efecto también ha sido descrito por Wang *et al.*, (2013) quienes observaron que el rendimiento de la extracción

asistida mediante US de FT a partir de “Spargani rhizome” también aumentaba a medida que se incrementaba el grado de dilución de 10 a 30 mL/g.

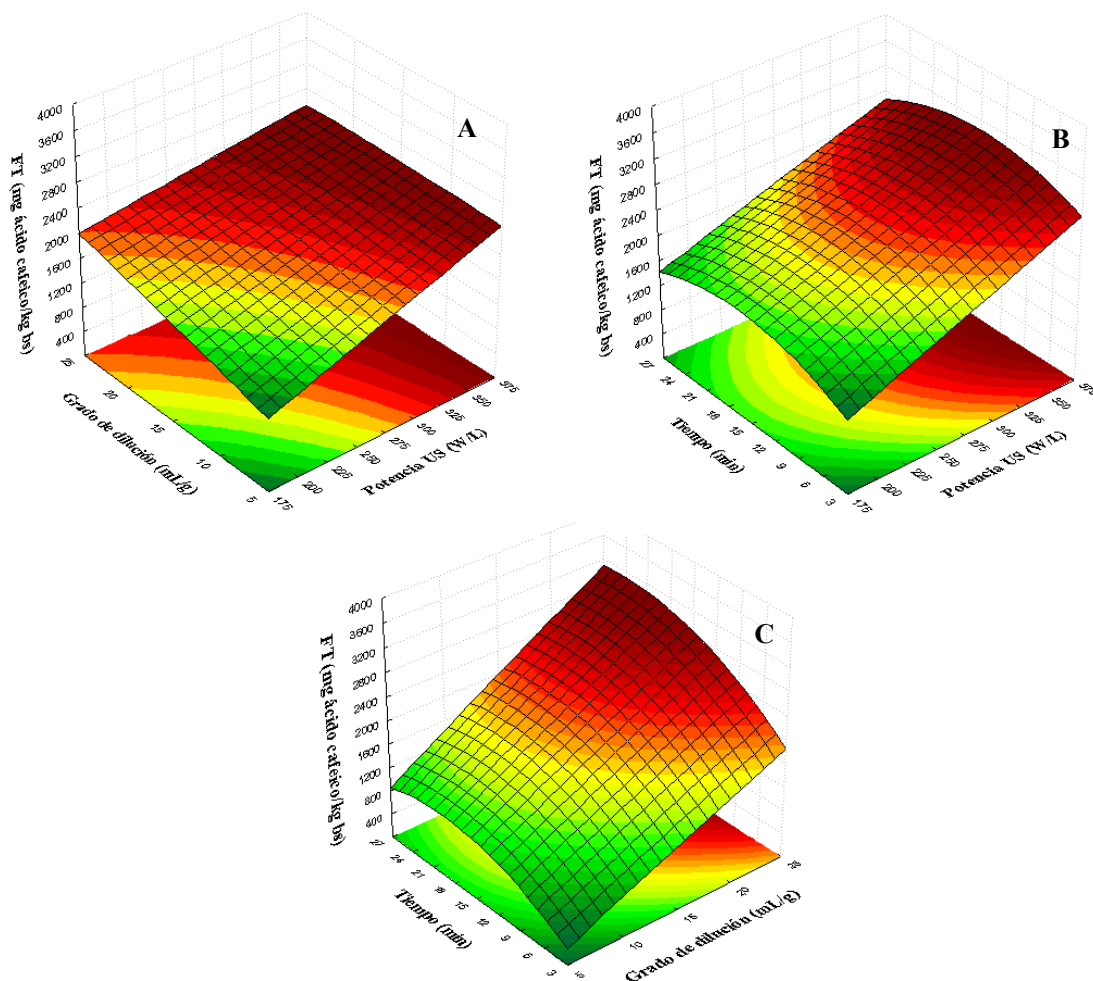


Figura 4.47. Superficies de respuesta para la extracción con asistencia acústica de FT del OOMW en función de (a) la potencia acústica vs. el grado de dilución (tiempo de extracción = 15 min; (b) la potencia acústica vs. el tiempo de extracción (grado de dilución = 15 mL/g y (c) el grado de dilución vs. el tiempo de extracción (potencia de US = 275 W/L)

Por otra parte, las **Figuras 4.47b** y **4.47c** muestran el efecto cuadrático que ejerce el tiempo de extracción sobre la extracción de FT, el cual aumentó cuando el tiempo de extracción se incrementó desde 3 a 20 min hasta llegar a un máximo de extracción alrededor de los 3200 mg ácido cafeico/Kg OOMW (bs); sin embargo tiempos de extracción más prolongados promovieron una ligera disminución en el rendimiento de extracción de compuestos fenólicos.

A partir de las superficies de respuesta de las **Figura 4.47a**, **4.47b** y **4.47c**, puede concluirse que la aplicación de US en combinación con un grado de dilución

comprendido entre 15 y 25 mL/g y un tiempo de operación en torno a los 20 min, serían las condiciones más favorables para la extracción acústica de FT del OOMW.

Estos resultados presentan ciertas similitudes a los descritos por otros autores al estudiar las mismas variables de operación aunque a partir de diferentes productos vegetales tales como hojas de olivo (Ahmad-Qasem *et al.*, 2013; Şahim *et al.*, 2013); mejorana (*Origanum majorana* L.) (Hossain *et al.*, 2012); Sparganii rhizoma (Wang *et al.*, 2013); o pepitas y piel de uva (Chaffoor *et al.*, 2009a; 2009b; Casazza *et al.*, 2010).

Desde un punto de vista medioambiental y económico, este estudio pone de manifiesto la posibilidad de introducir en la industria agroalimentaria sistemas de extracción acústica de compuestos fenólicos de origen vegetal utilizando soluciones etanol/agua como disolvente (disolvente autorizado para la industria alimentaria, según la FAD), dados los aceptables porcentajes de extracción obtenidos con respecto a las extracciones con disolventes como el metanol y trabajando a menor temperatura y con periodos de tiempo más cortos, evitando así la necesidad de costosos post-tratamientos para la eliminación de los disolventes orgánicos.

4.3.4.2. Efecto de las variables de extracción sobre la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante de los extractos de origen vegetal está altamente asociada con su contenido en compuestos fenólicos (González-Centeno *et al.*, 2012). De hecho, los coeficientes de correlación de Pearson (r) entre el contenido de fenólicos totales de los extractos obtenidos en el presente estudio y la capacidad antioxidante determinada a partir de los métodos CUPRAC, ABTS y FRAP fueron de 0,98, 0,93 y 0,98, respectivamente. De ahí que las superficies de respuesta que representan el efecto de las variables experimentales sobre la capacidad antioxidante de los extractos sean similares a las obtenidas para la extracción acústica de los FT.

a) CUPRAC

En las **Figura 4.48a, 4.48b y 4.48c** se representan los efectos de la potencia acústica, del grado de dilución y del tiempo de extracción sobre la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos mediante asistencia acústica.

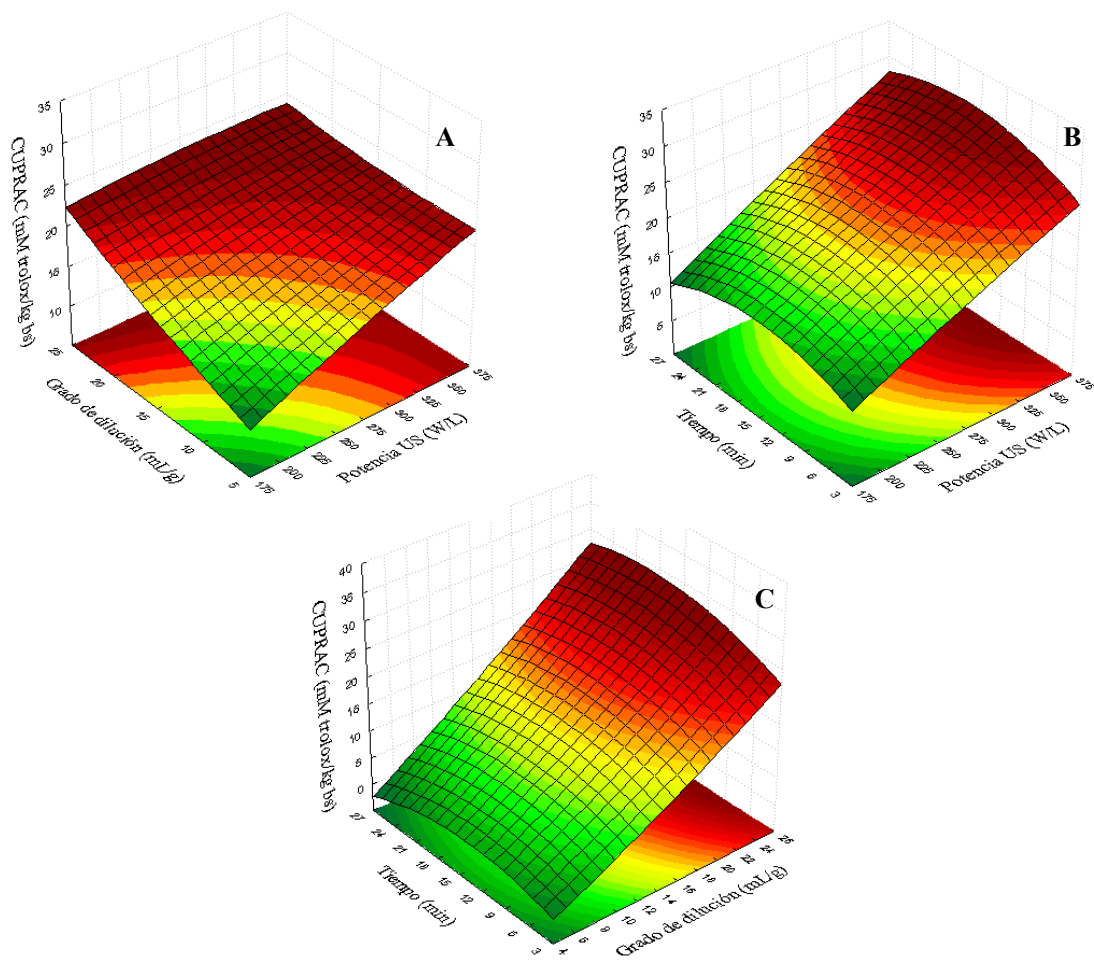


Figura 4.48. Superficies de respuesta para la capacidad antioxidante (CUPRAC) en los extractos asistido con US del OOMW en función de (a) la potencia acústicas vs. el grado de dilución (tiempo de extracción = 15 min; (b) la potencia acústica vs. el tiempo de extracción (grado de dilución = 15 mL/g y (c) el grado de dilución vs. el tiempo de extracción (potencia de US = 275 W/L).

La **Figura 4.48a** muestra los efectos lineales de la potencia de US y del grado de dilución, sobre la capacidad antioxidante determinada mediante la técnica CUPRAC. Tal y como puede observarse, un incremento en la potencia acústica condujo a un incremento lineal de la capacidad antioxidante, desde aproximadamente 10 a 22 mM de trolox/Kg OOMW (bs). Por otro parte, a medida que se incrementó el grado de dilución también se observó un incremento lineal de la capacidad antioxidante CUPRAC, desde los 10 hasta alcanzar los 23 mM trolox/kg OOMW (bs).

Al igual que en el caso de la extracción de FT, se observó el efecto cuadrático debido al tiempo de extracción (**Figura 4.48b y 4.48c**). La capacidad antioxidante aumento hasta llegar a un máximo a los 17 min de extracción con valores cercanos a los 30 mM trolox/Kg OOMW (bs), a partir de este momento la capacidad antioxidante de

los extractos empezó a disminuir a medida que avanzó la extracción. La explicación a este comportamiento podría ser debido a la saturación del disolvente con los compuestos que manifiestan cierta capacidad antioxidante. Este comportamiento ha sido descrito por otros autores tales como Ahmad-Qasem *et al.*, (2013) quienes observaron un máximo de extracción de compuestos antioxidantes procedentes de hojas de olivos alrededor de los 15 min utilizando un equipo de sonda de ultrasonidos muy similar a la utilizada en este estudio, el mismo sonotrodo (3,8 cm²) y trabajando al 100% de la amplitud del equipo (máxima potencia acústica que puede proporcionar el equipo).

b) ABTS

En las **Figuras 4.49a, 4.49b y 4.49c** están representadas las superficies de respuesta en las cuales se puede observar de forma gráfica el efecto de las tres variables de proceso: potencia de US, grado de dilución de la muestra y tiempo de extracción, sobre la capacidad antioxidante medida mediante la técnica ABTS a partir de los extractos del orujo de almazara.

Tal y como puede observarse la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos, determinados mediante el método ABTS, aumentó linealmente con la potencia acústica aplicada (**Figura 4.49a**); e igualmente puede observarse el efecto cuadrático del grado de dilución presentando un máximo de la capacidad antioxidante a los 17 mL/g, con valores cercanos a los 8,5 mM trolox/Kg OOMW (bs).

En la **Figura 4.49b**, puede observarse, de forma análoga al método CUPRAC, un incremento de la capacidad antioxidante hasta llegar a los 17 min de extracción, a partir de este momento, por más que avanzara el tiempo de extracción, la capacidad antioxidante ya no aumentó sino que se produjo un ligero descenso. Tomando en consideración el efecto de la potencia de ultrasonidos, se observó, como era previsible, un incremento lineal de la capacidad antioxidante a medida que se aumentó la potencia acústica aplicada.

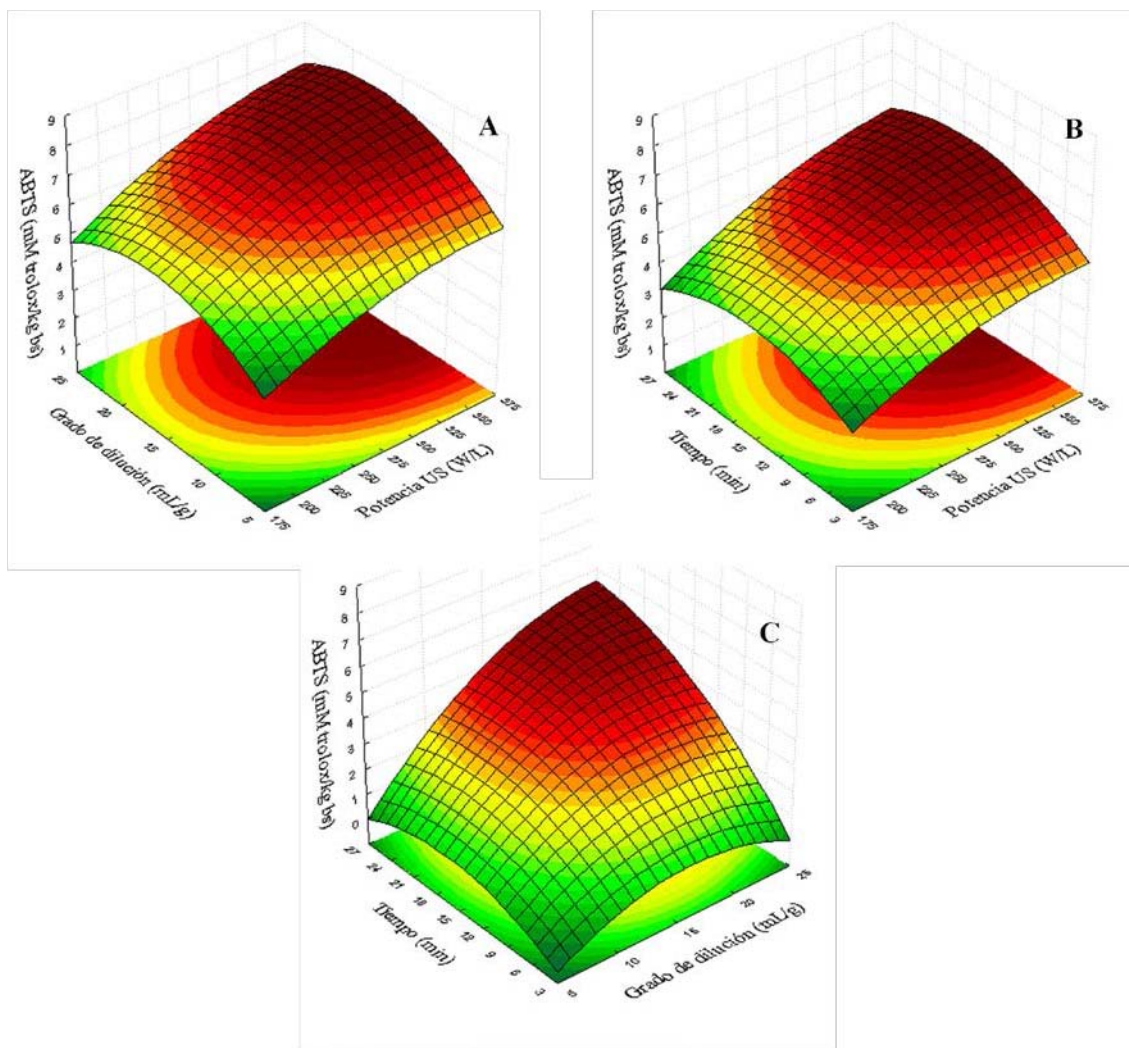


Figura 4.49. Superficies de respuesta para la capacidad antioxidante (ABTS) en los extractos asistido con US del OOMW en función de (a) la potencia acústicas vs. el grado de dilución (tiempo de extracción = 15 min; (b) la potencia acústica vs. el tiempo de extracción (grado de dilución = 15 mL/g y (c) el grado de dilución vs. el tiempo de extracción (potencia de US = 275 W/L).

Finalmente, en la **Figura 4.49c** se muestra el efecto del grado de dilución de la muestra y del tiempo de extracción sobre la capacidad antioxidante de los extractos evaluada según el método ABTS.

En la gráfica se observa como el aumento del grado de dilución de 5 a 25 mL/g provoca un incremento de la capacidad antioxidante de los extractos, medida según el método de ABTS, desde 0 hasta aproximadamente 5,5 mM trolox/Kg orujo (bs). El mismo incremento se produjo al aumentar el tiempo de extracción desde 3 hasta 27 min.

c) FRAP

En la **Figuras 4.50a, 4.50b y 4.50c** se muestran el efecto de la potencia de US, del grado de dilución de las muestra y del tiempo de extracción sobre la capacidad antioxidante de los extractos evaluada mediante el método FRAP.

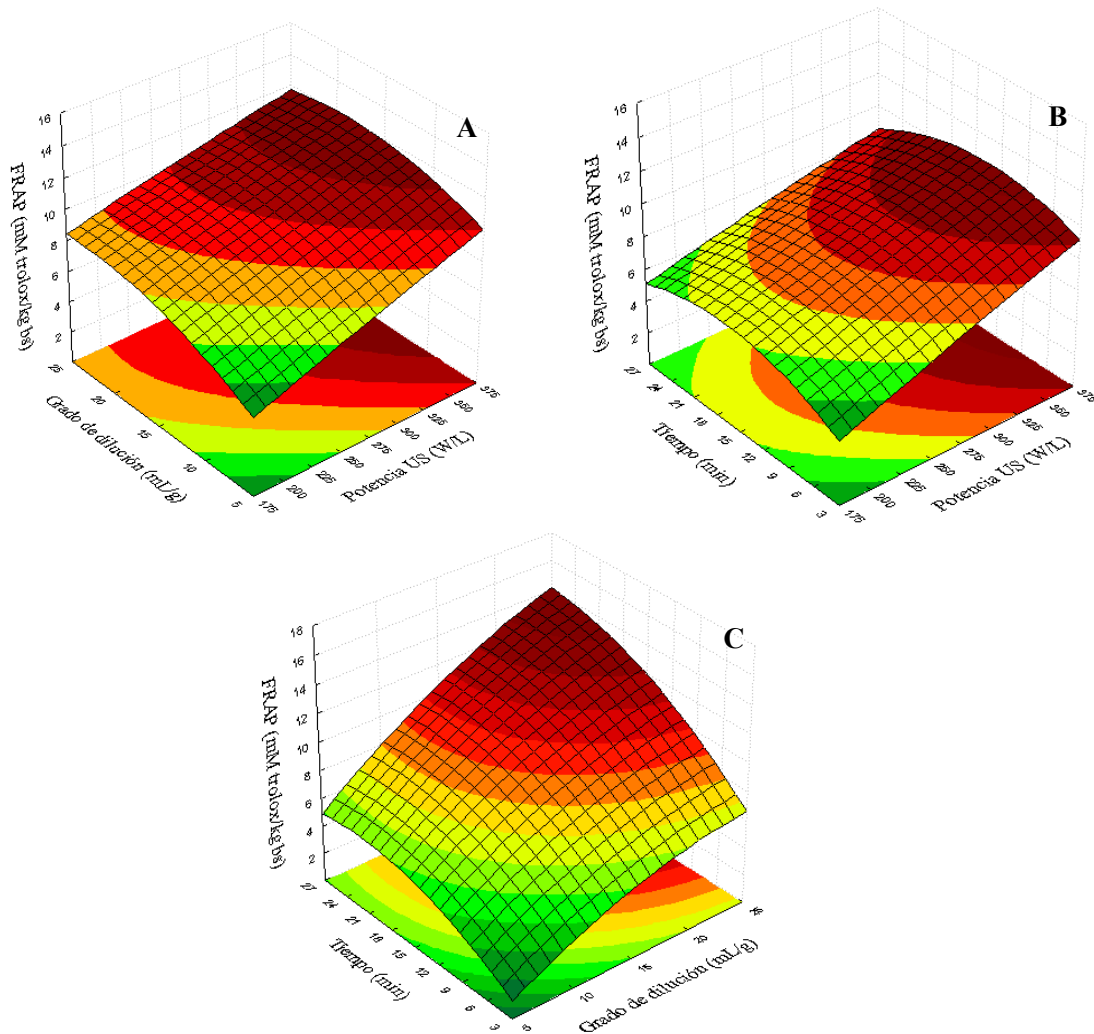


Figura 4.50. Superficies de respuesta para la capacidad antioxidante (FRAP) en los extractos asistido con US del OOMW en función de (a) la potencia acústicas vs. el grado de dilución (tiempo de extracción = 15 min; (b) la potencia acústica vs. el tiempo de extracción (grado de dilución = 15 mL/g y (c) el grado de dilución vs. el tiempo de extracción (potencia de US = 275 W/L).

En la **Figura 4.50a** se observa claramente los efectos lineales ejercidos tanto por el grado de dilución como por la potencia acústica aplicada. Así, a medida que el grado de dilución aumento de 5 a 25 mL/g, se produjo un incremento de la capacidad antioxidante desde 10 h hasta aproximadamente 12 mM de trolox/ Kg OOMW (bs),

mientras que un incremento de 175 a 375 W/L de la potencia de US promovió un incremento desde 8 hasta 12 mM trolox/Kg OOMW (bs).

Por otra parte, evaluando el efecto conjunto de la potencia de US con el tiempo de extracción (**Figura 4.50b**), se observó un máximo en el valor para la capacidad antioxidante de los extractos en torno a los 18 min de extracción coincidiendo con un valor próximo a 11 mM trolox/Kg OOMW. Por otra parte, en la **Figura 4.50b** también quedó patente el efecto lineal de la potencia de ultrasonidos, observándose un aumento de la capacidad antioxidante a medida que la potencia de US aplicada aumentaba.

Finalmente en la **Figura 4.50c** se representa el efecto del tiempo de extracción combinado con el grado de dilución. Como puede observarse, un aumento tanto en el tiempo de extracción como en el grado de dilución de la muestra condujo a un incremento en la capacidad antioxidante desde 0 hasta los 15 mM trolox/Kg OOMW (bs).

4.3.5. Optimización de las condiciones de extracción

Cuando son varias las respuestas evaluadas en un mismo proceso, es necesario alcanzar un compromiso de condiciones óptimas para todas ellas (Krishnaswamy *et al.*, 2013). Para ello, la función de deseabilidad es una de las más utilizadas en la optimización estadística de procesos multi-respuesta. Esta herramienta permite calcular las condiciones óptimas del proceso para una máxima expresión de todas las respuestas consideradas, así como sus valores bajo dichas condiciones. La función de deseabilidad toma valores en una escala de 0 a 1, en la que el cero indica una respuesta totalmente disconforme con la meta deseada y la unidad manifiesta una conformidad total alcanzando la mejor respuesta conjunta posible (Strati y Oreopoulou, 2011).

En el presente estudio, se obtuvo un valor global de deseabilidad de 0,987 para la EAU de fenólicos totales y para la capacidad antioxidante de los extractos de orujo de almazara, aplicando una potencia de ultrasonidos de 375 W/L, un grado de dilución de 25 mL/g y un tiempo de extracción de 27 min. Bajo estas condiciones, el sistema de extracción utilizado sería capaz de alcanzar un valor máximo de extracción de FT correspondiente a 3717,75 mg ácido cafeico/kg OOMW (bs), y en lo que respecta a la capacidad antioxidante de los extractos obtenidos bajo dichas condiciones, los valores máximos estimados fueron de 38,16 mM de trolox/Kg OOMW (bs) para el método CUPRAC; 17,68 mM trolox/Kg OOMW (bs) para el método ABTS y 18,23 mM

trolox/kg OOMW (bs) para el método FRAP. Es importante destacar que al considerar los factores de respuesta de forma individual, las condiciones óptimas de extracción fueron prácticamente idénticas.

El nivel de potencia de US óptimo estimado corresponde al máximo valor que permitió aplicarse con la sonda disponible, aun así en los gráficos de superficie de respuesta se puede observar que no se ha alcanzado el máximo de extracción, por tanto si se dispusiera de una sonda con mayor potencia acústica el nivel de extracción de FT y, en consecuencia, la capacidad antioxidante de los extractos serían probablemente más elevados.

En cuanto al tiempo de extracción en el proceso de EAU, el óptimo se encuentra próximo a los valores recomendados por Shirsath *et al.*, (2012).

En la mayoría de referencias bibliográficas basados en el estudio de la EAU de compuestos de origen vegetal, no se especifica el volumen total tratado en el proceso. Esta falta de información hace que la densidad de potencia acústica que opera en el sistema no pueda ser calculada, dificultando consecuentemente la comparación entre resultados experimentales. Por ejemplo, Virot *et al.* (2010) trabajaron con una frecuencia de 25 kHz y una potencia de 150 W para la extracción acústica de FT del orujo de manzana, pero no especificaron el volumen de extracción considerado. Ghafoor *et al.*, (2009b; 2011) llevaron a cabo la extracción de FT de pepitas de uva y antocianos de piel de uva tinta utilizando un baño de ultrasonidos con una potencia fija de 250 W, sin hacer mención alguna a la potencia realmente transmitida al sistema de extracción. No obstante, Ye *et al.*, (2011) y Ahmad-Qasem *et al.*, (2013) concluyeron que cuanto mayor es la potencia ultrasónica aplicada, mayor es el rendimiento de la extracción, dado que se intensifica el fenómeno de cavitación y los efectos mecánicos derivados del mismo. Dichos autores, no obstante, indicaron que el aumento de la potencia de US también produce un aumento de la temperatura de extracción, lo cual, en ocasiones, puede impedir determinar si el aumento del rendimiento de la extracción es consecuencia del efecto de los US o del incremento de la temperatura del sistema; por este motivo es imprescindible controlar la temperatura durante la totalidad del proceso y optimizar ambas variables junto con el tiempo de procesado, en el caso de la extracción acústica de compuestos bioactivos termolábiles, como en el presente estudio, el control de la temperatura es un factor clave del proceso..

Tal y como se ha mencionado anteriormente, tanto en el caso de los FT como para la capacidad antioxidante de los extractos, se ha observado un incremento lineal y progresivo del rendimiento de extracción con la potencia de US. Esto conlleva que, en próximos trabajos, sería interesante evaluar el comportamiento del sistema a potencias de US más elevadas. En cualquier caso, el presente estudio pone de manifiesto y materializa la importancia y la necesidad de optimizar los parámetros acústicos para mejorar la eficiencia del proceso de extracción, dada su notable influencia sobre el mismo.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

A partir del estudio realizado, se detallan a continuación las conclusiones más relevantes obtenidas en cada una de las etapas del proyecto.

▪ **Influencia de la variedad, el grado de madurez y la procedencia geográfica de las aceitunas sobre la calidad del aceite de oliva**

En esta primera etapa del trabajo se ha propuesto una metodología que permite diferenciar la calidad del aceite de oliva, en función de las características propias de la aceituna (variedad y grado de madurez) y de los atributos agroclimáticos del olivar, sin incluir el factor humano.

Estudio del efecto de la variedad de aceituna y de su grado de madurez sobre la calidad del aceite de oliva

- Todos los aceites de oliva estudiados se clasificaron dentro de la categoría virgen extra, según los parámetros definidos en el Reglamento CEE 2568/91. No obstante, se observaron ligeras variaciones en los parámetros de calidad GA, IP y los coeficientes K_{232} y K_{270} de los aceites en función tanto de la variedad como del grado de maduración de las aceitunas utilizadas.
- Para una misma variedad de aceituna, no se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en los porcentajes de ácidos grasos como el oleico, el esteárico, el linolénico y el araquídico presentes en los aceites obtenidos a partir de aceitunas de diferente grado de maduración. En cambio, sí hubo importantes diferencias varietales, siendo el aceite de oliva de la variedad *picual* el que exhibió los porcentajes más elevados de ácido oleico (~79%), seguido del aceite de la variedad *arbequina* (~67%) y de la variedad *empeltre* (~65%).
- No obstante, para los aceites de las diferentes variedades analizadas, sí se apreció una ligera pero significativa disminución del porcentaje de ácido palmítico, durante el proceso de maduración de las aceitunas. En cambio, el ácido linoleico, presentó una tendencia inversa al palmítico, incrementando ligeramente su porcentaje a medida que el aceite de oliva provenía de aceitunas más maduras. Como resultado de estos cambios en la composición de ácidos grasos, se detectó un pequeño pero significativo descenso en la

relación entre ácidos grasos mono- y poli-insaturados (MUFA/PUFA) para todas las variedades de aceite.

- Las variedades estudiadas se caracterizaron por una elevada presencia de compuestos fenólicos, en particular oleuropeína aglicona, luteolina aglicona, oleuropeína y pinoresinol, siendo en general, la variedad *empeltre* la que presentó los valores más elevados.
- Para las variedades *arbequina* y *picual*, el aceite procedente de las aceitunas recolectadas en la etapa de envero (RI2), fueron las que presentaron los valores más elevados de FT, capacidad antioxidante (determinada mediante las técnicas CUPRAC, ABTS y FRAP) y estabilidad oxidativa. En cambio, para la variedad *empeltre*, no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) para los valores de FT, capacidad antioxidante y estabilidad oxidativa entre los estados de madurez RI1 y RI2, y sí un ligero descenso ($p < 0,05$) para el grado de madurez RI3.
- El aceite procedente de las variedades *arbequina* y *picual*, tuvo como principales atributos organolépticos el *frutado*, el *amargo* y el *picante*, sin presentar diferencias significativas entre los distintos estados de madurez evaluados. Para el aceite elaborado a partir de la variedad *empeltre*, los atributos *amargo* y *picante* predominaron sobre el resto, en particular en el aceite elaborado a partir de aceitunas en envero (RI2).
- Los tres primeros componentes principales resultante de la aplicación del ACP, separaron claramente los diferentes aceites de oliva procedentes de las variedades de aceituna *arbequina*, *picual* y *empeltre* explicando el 78,47% de la varianza total de la base de datos.
- De acuerdo con los resultados del ACP, para una misma variedad de aceituna, no hubo una diferenciación clara entre las propiedades de los aceites elaborados a partir de aceitunas verdes (RI1) y en envero (RI2), y sí con el aceite procedente de aceitunas maduras (RI3), siendo estos aceites los de menor calidad.
- En general, para las variedades de aceituna consideradas, el periodo en envero (RI2) sería el más idóneo para la elaboración del aceite de oliva, ya que es el

momento en el cual existe un mayor equilibrio entre los diferentes parámetros que determinan la calidad global del aceite de oliva.

Estudio del efecto de los factores agroclimáticos y del estado de madurez de las aceitunas sobre la calidad del aceite de oliva

- Los resultados obtenidos muestran como el entorno agroclimático, en el cual se emplaza el olivar, afecta de forma significativa a las características físico-químicas del aceite de oliva, siendo los lugares menos lluviosos, los que confieren al aceite mejores propiedades y mayor estabilidad frente a la oxidación
 - Los tres primeros componentes principales, resultantes de la aplicación del ACP, identificaron conjuntamente los diferentes patrones de comportamiento de los olivares en base a su procedencia geográfica, explicando el 71,07 % de la varianza total de la base de datos estudiados y separando, de forma clara, los aceites en función del olivar de origen.
 - No obstante, para un mismo olivar-muestra no se observó una clara separación entre los aceites elaborados con aceitunas de diferente grado de madurez, lo cual sugiere que la influencia de los factores agroclimáticos es mucho mayor que la influencia del grado de madurez de las aceitunas sobre las características físico-químicas del aceite de oliva.
- **Conservación del aceite de oliva. Influencia de las variables de operación: atmosfera, luz, temperatura y ultrasonidos de potencia**

En esta segunda fase del trabajo se ha desarrollado una metodología innovadora para el proceso de conservación del aceite de oliva virgen extra, basada en la aplicación de US de potencia para la eliminación del oxígeno disuelto en la matriz del aceite de oliva. Con ello se pretende minimizar las reacciones de oxidación, permitiendo, de esta forma, aumentar el período de vida útil del aceite.

- El tratamiento inicial de las muestras de aceite de oliva, de las variedades *arbequina* y *picual*, con pulsos ultrasónicos no provocó cambios significativos en las propiedades físico-químicas y sensoriales de las mismas,

y, por lo tanto, estas muestras pudieran incorporarse al estudio global de conservación.

- El estudio llevado a cabo reveló que cuando el aceite de oliva inicial exhibió valores muy por debajo a los límites establecidos para la categoría virgen extra (en particular un bajo grado de acidez: 0,1-0,2 % ácido oleico), el hecho de conservar el aceite de oliva en condiciones que minimicen las reacciones de oxidación (atmosfera inerte, ausencia de luz, baja temperatura y/o mediante pretratamiento con US de potencia) no tuvo efectos significativos sobre la calidad del mismo, durante al menos un período de 16 meses.
- Sin embargo, cuando el aceite de oliva presentó unos valores correspondientes a los parámetros de calidad próximos a los límites legislados para la categoría virgen extra (en particular un grado de acidez próximo al límite legislado, 0,8% ácido oleico), los procesos de conservación en atmosfera inerte o en ausencia de luz no son eficaces para mantener la calidad de aceite de oliva virgen extra, más allá de los cuatro meses de almacenamiento. En este caso, la conservación del aceite de oliva a baja temperatura (con y sin pretratamiento con US de potencia) parece ser la metodología más eficaz para mantener el aceite de oliva dentro la categoría virgen extra, durante un período de conservación de como mínimo 12 meses.
- Además, en el caso de las muestras almacenadas a baja temperatura, con y sin pretratamiento con US de potencia, cabe destacar el hecho que las muestras pretratadas con pulsos ultrasónicos presentaran, en la parte final del periodo de almacenamiento, valores inferiores para el índice de peróxidos, una mayor estabilidad oxidativa y una mayor intensidad del atributo *frutado*.
- La conservación del aceite de oliva a baja temperatura implica la aparición de un proceso cristalización de los triglicéridos que va en detrimento de la calidad del mismo. En el estudio de conservación llevado a cabo con las variedades *arbequina* y *empeltre* se observó como las muestras pretratadas con US de potencia y conservadas a baja temperatura, presentaron una significativa reducción del proceso de cristalización de los triglicéridos, durante el período de almacenamiento. Este descubrimiento dio lugar a la obtención de una patente (P25827ES00) con el fin de proteger la propiedad intelectual de esta nueva metodología.

▪ **Aprovechamiento de subproductos. Extracción de compuestos bioactivos del orujo de almazara, mediante asistencia acústica**

En esta tercera fase del estudio, se ha evaluado la utilización de los US de potencia como técnica para mejorar el proceso de extracción sólido-líquido de compuestos fenólicos a partir de orujo fresco de almazara.

- Un una fase inicial, se comprobó como un aumento de la potencia de la sonda de US provocaba un significativo aumento del contenido en compuestos fenólicos extraídos a partir del orujo de almazara, utilizando una solución etanol:agua (1:1, v/v).
- El uso de los US de potencia ha permitido la utilización de disolventes de extracción no tóxicos y aptos para su uso en la industria alimentaria, obteniendo porcentajes de extracción similares a los descritos en la bibliografía utilizando disolventes de gran poder extractor pero elevada toxicidad, como por ejemplo el metanol.
- Se ha aplicado la metodología de superficie de respuesta (RSM) para optimizar el proceso de extracción de compuestos bioactivos a partir del orujo de almazara, utilizando como variables la potencia de US, el ratio disolvente/soluto y el tiempo de extracción. Todas las experiencias se llevaron a cabo a una temperatura controlada de 20 °C, utilizando una mezcla etanol:agua (1:1, v/v) como disolvente.
- Los datos experimentales obtenidos, mediante la aplicación de un diseño tipo Box-Behnken, relativos a la extracción de compuestos fenólicos (FT), así como los correspondientes a la capacidad antioxidante de los extractos, determinada mediante las técnicas CUPRAC, y FRAP, se ajustaron de forma significativa a un modelo lineal ($p < 0,05$), capaz de explicar satisfactoriamente el comportamiento del sistema y de predecir las respuestas en el dominio experimental considerado. Por otra parte, para la capacidad antioxidante evaluada mediante la técnica ABTS, los datos experimentales obtenidos se ajustaron de forma significativa ($p < 0,05$) a un modelo cuadrático.
- Las condiciones experimentales que permitieron obtener el máximo rendimiento en FT, así como los extractos de orujo de almazara, con la mayor

capacidad antioxidante fueron los siguientes: 375 W/L de potencia, 25 mL/g en la relación disolvente/soluto y un tiempo de extracción de 27 min.

- Por tanto, se ha establecido una metodología de extracción de compuestos bioactivos a partir de orujo de almazara, mediante asistencia ultrasónica, que permite la extracción de estos compuestos termolábiles a baja temperatura, utilizando un d isolvente no tóxico y con un tiempo de extracción significativamente menor que el requerido en una extracción convencional realizada con agitación mecánica.

RECOMENDACIONES

6. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se plantean a continuación una serie de aspectos a partir de los cuales podría continuar la investigación:

- I. Aplicación de la metodología establecida en el estudio del efecto del entorno agroclimático sobre la calidad del aceite de oliva virgen extra a otras regiones, en condiciones agroclimáticas más extremas (temperatura, pluviometría, altitud sobre el nivel del mar, insolación, viento, etc.) y separadas entre sí.
- II. Evaluación del efecto de la añada sobre las características del aceite de oliva virgen extra procedente de diferentes variedades de aceituna.
- III. Profundización en la investigación sobre el efecto de la aplicación de US en el proceso de conservación, de acuerdo con la metodología recogida en la patente P25827ES00, en depósitos de almacenamiento de aceite de oliva virgen extra de mayor tamaño.
- IV. Estudio de la viabilidad de la incorporación de los extractos de compuestos antioxidantes, procedente del orujo de almazara, como ingrediente funcional en diferentes alimentos.
 - IV.a. Análisis de la influencia del ingrediente funcional sobre la matriz del alimento: modificaciones físicas, químicas y microbiológicas que tienen lugar como consecuencia de la adición.
 - IV.b. Evaluación del grado de aceptación, por parte del consumidor, de los alimentos funcionales diseñados a partir del análisis organoléptico de los mismos.
- V. Evaluación del proceso de extracción sólido-líquido de compuestos antioxidantes a partir del alperujo, mediante asistencia acústica.

NOMENCLATURA

7. NOMENCLATURA

A_i	Área bajo el pico del éster metílico <i>i</i> (ecuación [3.8])
A_T	Área total de todos los ésteres metílicos (ecuación [3.8])
AAO	Agencia para el Aceite de Oliva
ABTS	Ácido 2,2'-Azinobis(3-etilBenzoTiazolina-6-Sulfónico)
ACP	Análisis de Componentes Principales
AG	Ácidos Grasos
AGL	Ácidos Grasos Libres
ANOVA	Análisis de varianza (del inglés <i>ANalysis Of VAriance</i>)
AP	<i>Adequate Precision</i>
bs	Base seca
c	Número de repeticiones del punto central del diseño (Tabla 1.8)
C*	Croma o Saturación de color
c_e	Calor específico del disolvente (J/(kg·K), (ecuación [3.2])
CE	Comunidad Europea
CEE	Comunidad Económica Europea
COI	Consejo Oleícola Internacional
CP	Componente Principal
CUPRAC	CUPric Reducing Antioxidant Capacity
C16:0	Ácido palmítico
C16:1	Ácido palmitoleico
C18:0	Ácido esteárico
C18:1	Ácido oleico
C18:2	Ácido linoleico
C18:3	Ácido linolénico
C20:0	Ácido araquídico
C20:0	Ácido gadoléico
DHPEA	Dihidroxifeniletanol

DBB	Diseño de Box-Behnken
DO	Denominación de Origen
DOP	Denominación de Origen Protegida
e	Espesor de cubeta (ecuación [3.7])
EAU	Extracción Asistida por Ultrasonidos
ERM	Error Relativo Medio (%)
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
ES	Error estándar asociado
EVOO	Aceite de oliva virgen extra (del inglés <i>Extra Virgin Olive Oil</i>)
FRAP	Ferric Reducing Antioxidant Power
FT	Fenólicos Totales
GA	Grado de acidez
GC	Cromatografía de gases (del inglés <i>Gas Chromatography</i>)
h*	Tono de color
HPEA	Hidoxifeniletanol
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (del inglés <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>)
IP	Índice de Peróxidos
ISO	Organización Internacional para la Estandarización (del inglés <i>International Organization Standardization</i>)
K₂₃₂	Coefficiente de extinción a 232 nm
K₂₇₀	Coefficiente de extinción a 270 nm
LDL	Lipoproteínas de baja densidad (del inglés <i>Low Density Lipoprotein</i>)
LOF	Falta de ajuste (del inglés <i>Lack Of Fit</i>)
LOX	Lopoxigenasa
m	Masa de disolvente (kg, ecuación [3.2])
Md	Media de defecto organoléptico
Mf	Media del atributo frutado de aceituna
n	Número de experimentos (ecuación [3.12])

N	Normalidad (equivalentes de soluto/kg disolvente) (ecuación [3.5])
nd	No detectado
OOMW	Orujo de almazara (del inglés <i>Olive Oil Mill Waste</i>)
p	Peso
P	Número de términos estadísticamente significativos del modelo matemático (ecuación [3.12])
Pt	Potencia (W), (ecuación [3.2])
PET	Polietilen terftalato (del inglés <i>Polyethylene Terephtalate</i>)
PP	Polipropileno (del inglés <i>Polypropilene</i>)
PS	Poliestireno (del inglés <i>Polystyrene</i>)
PVC	Policloruro de vinilo (del inglés Polyvinyl Chloride)
r²	Coefficiente de correlación
RSM	Metodología de Superficie de Respuesta (del inglés <i>Response Surface Methodology</i>)
RI	Índice o grado de madurez (del inglés <i>Ripening Index</i>)
S_{calc}	Desviación estándar de los valores calculados por el modelo (ecuación [3.14])
S_{exp}	Desviación estándar de los valores experimentales (ecuación [3.14])
SPE	Extracción en Fase Sólido (del inglés <i>Solid Phase Extraction</i>)
t	Tiempo (min)
T	Temperatura (°C)
TAGs	Triacilglicéridos
TC	Tonalidad de Color
US	Ultrasonidos
UV/Vis	Ultravioleta/Visible
V	Volumen
v/v	relación volumen/volumen
VAR	Varianza explicada (%)
X_{calc}	Valores calculados por un modelo matemático
X_{exp}	Valores experimentales

X_i	Variable independiente del modelo cuadrático utilizado en la RSM (ecuación [1.1])
X_j	Variable independiente del modelo cuadrático utilizado en la RSM (ecuación [1.1])
X_0	Valor experimental de la variable independiente del modelo cuadrático utilizado en la RSM para el punto central
X_1	Variable independiente del modelo cuadrático utilizado en la RSM correspondiente a la frecuencia de ultrasonidos
X_2	Variable independiente del modelo cuadrático utilizado en la RSM correspondiente a la potencia de ultrasonidos
X_3	Variable independiente del modelo cuadrático utilizado en la RSM correspondiente al tiempo de extracción
Y	Respuesta predicha por el modelo (ecuación [1.1])
β_0	Constante del modelo cuadrático obtenido a partir de la RSM (ecuación [1.1])
β_i	Coefficiente de regresión lineal del modelo cuadrático obtenido a partir de la RSM (ecuación [1.1])
β_{ii}	Coefficiente de regresión cuadrática del modelo cuadrático obtenido a partir de la RSM (ecuación [1.1])
β_{ij}	Coefficiente de interacción del modelo cuadrático obtenido a partir de la RSM (ecuación [1.1])
ΔE	Variación de color
Δt	Incremento de tiempo (ecuación [3.2])
ΔT	Incremento de temperatura (ecuación [3.2])
λ_{\max}	Longitud de onda de máxima absorción (nm)

BIBLIOGRAFÍA

8. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad-Qasem, M., Cánovas, J., Barrajon-Catalán, E., Micol, V., Cárcel, J.A., García-Pérez, J.V. (2013). Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 17, 120-129.
- Ajana, H., El Antari, A., Hafidi, A. (1998). Fatty acids and sterols evolution during the ripening of olives from the Moroccan Picholine cultivar. *Grasas y Aceites* 49, 405-410.
- Aktas, E.S., Imre, S., Ersoy, L. (2001). Characterization and lime treatment of olive mill wastewater. *Water Research* 35, 2336-2340.
- Amior, M.J., Fleuriet, A., Macheix, J.J. (1986). Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 34, 823-826.
- Angerosa, F., d'Alessandro, N., Basti, C., Vito, R. (1998). Biogenesis of volatile compounds in virgin olive oil: Their evolution in relation to malaxation time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 2940-2944.
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposito, S., Montedoro, G.F. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. A review. *Journal of Chromatography A* 1054, 17-31.
- Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Ryan, D. (2000). Sample preparation in the determination phenolic compounds in fruits. *Analyst* 125, 989-1009.
- Alonso, M.V., Aparicio, R. (1993). Characterization of European virgin olive oils using fatty acids. *Grasas y Aceites* 44, 18-24.
- Alos, E., Cercos, M., Rodrigo, M.J., Zacarias, L., Talon, M. (2006). Regulation of color break in citrus fruits. Changes in pigments profiling and gene expressions induced by gibberellins and nitrate, two ripening retards. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4888-4895.
- Allouche, Y., Beltran, G., Gaforio, J.J., Uceda, M., Mesa, M.D. (2010). Antioxidant and antiatherogenic activities of pentacyclic triterpenic diols and acids. *Food and Chemical Toxicology* 45, 2885-2890.
- Andrewes, P., Busch, J.L.H.C., De Joode, T., Croenewegen, A., Alexandre, H. (2003). Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: Identification of deacetoxy-ligstroside aglycone as a key contributor to pungency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 1415-1420.
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposito, S., Montedoro, G.F. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A* 1054, 17-31.
- Albuquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J. (2004). Agrochemical characterization of "alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology* 91, 195-200.
- Albuquerque, J.A., González, J., García, D., Cegarra, J. (2006a). Effects of bulking agent on the composition of "alperujo", the solid by-product of the two-phase centrifugation methods for olive oil extraction. *Process Biochemistry* 41, 127-13.

- Albuquerque, J.A., González, J., García, J., Cegarra, J. (2006b). Measuring detoxification and maturity in compost made from “alperujo”, the solid by-product of extraction olive oil by the two-phase centrifugation system. *Chemosphere* 64, 470-477.
- 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, 4150-4155.
- Aparicio, R., Luna, G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104, 614-627.
- Armanio, C., Leardi, R., Lanteri, S., Modi, G., (1989). Chemometric analysis of Tuscan olive oil. *Chemometric and Intelligent Laboratory Systems* 5, 343-354.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Parsalides, E., McDonald, S., Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst* 127, 183-198.
- Arjona, R., García, A., Ollero, P. (1999). The drying of alperujo, a waste product of the olive oil mill industry. *Journal of Food Engineering* 41, 229-234.
- Arjona, R., Ollero, P., Vidal, B.F. (2005). Automation of an olive waste industrial rotary dryer. *Journal of Food Engineering* 68, 329-347.
- 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 effects on bitter index. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 6079-6088.
- Awad, T.S., Moharram, H.A., Shaltout, O.E., Asker, D., Youssef, M.M. (2012). Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. *Food Research International* 48, 410-427.
- Azbar, N., Bayram, A., Felibeli, A., Muezzinoglu, M., Sengul, F., Ozer, A. (2004). A review of waste management options in olive oil production. *Critical Review in Environmental Science and Technology* 34, 209-247.
- Baccouri, B., Zarrouk, W., Krichene, D., Nouairi, I., Youssef, N.B., Daoud, D., Zarrouk, M. (2007). Influence of fruit ripening and crop yield on chemical properties of virgin olive oils from seven selected oleasters (*Olea europea* L.). *Journal of Agronomy* 6, 388-396.
- Baccouri, O., Bendini, A., Cerretani, L., Guertfel, M., Baccouri, B., Lerker, G., Zarrouk, M., Ben Miler, D.D. (2008). Comparative study on volatile compounds from Tunisian and Sicilian monovarietal virgin olive oils. *Food Chemistry* 111, 322-328.
- Baccouri O., Guertfel, M., Baccouri, B., Cerretani, L., Bendini, A., Lercker, G., Zarrouk, M., Ben Miled, D.D. (2008). Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry* 109, 743-754.
- Bhaskaracharya, R.K., Kentish, S., Ashokkumar, M. (2009). Selected applications of ultrasonics in food processing. *Food Engineering Reviews* 1, 31-49.
- Baldioli, M., Servili, M., Perretti, G., Montedoro, G.F. (1996). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73, 1589-1593.
- Ballard, T.S., Mallikarjunan, P., Zhou, K., O'Keefe, S.F. (2009). Optimizing the extraction of phenolic antioxidants from peanut skins using response surface methodology. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 3064-3072.

- Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. (2008). El cultivo del Olivo (6ª Edición). Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. (Sevilla).
- Bas, D., Boyaci, I.H. (2007). Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *Journal of Food Engineering* 78, 836-845.
- Beauchamp, G.K., Keast, R.S.J., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Lee, C., Smith, A.B., Breslim, P.A.S. (2005). Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 437, 45-46.
- Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escaleira, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta* 76, 965-977.
- Beckman, C.H. (2000). Phenolic-storing cells: Keys to programmed cell death and periderm formation in with disease resistance and in general defence responses in plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57, 101-110.
- Beltrán, G., Jiménez, A., Aguilera, M.P., Uceda, M. (2000). Análisis mediante HPLC de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina. Relación con la medida del amargor K_{225} y la estabilidad. *Grasas y Aceites* 5, 320-324.
- Beltrán, G., Aguilera, M.P., Del Rio, C., Sánchez, S., Martínez, L. (2007). Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chemistry* 89, 207-215.
- Bendini, A., Cerretani, L., Vecchi, S., Carrasco-Pancorbo, A., Lercker, G. (2006). Protective effects of extra virgin olive oil phenolics on oxidative stability in the presence or absence of copper ions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4880-4887.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Cerretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Lercker, G. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules* 12, 1679-1719.
- Bendini, A., Cerretani, L., Salvador, M.D., Fregapane, G., Lercker, G. (2009). Stability of the sensory quality of virgin olive oil during storage: An Overview. *Italian Journal of Food Science* 4, 388-406.
- Benedito, J., Mulet, A., Velasco, J., Dobargarnes, M.C. (2002). Ultrasonic assessment of oil quality during frying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4531-4536.
- Benítez, C.C., Gil, T.J., González, F.J.L. (2000). Influencia de la humedad en la evolución de los parámetros químicos de un suelo tras la adición de alperujo. *Edafología* 7, 215-220.
- Benito, M., Oria, R., Sánchez-Gimeno, A.C. (2009). Influencia del retraso en el procesado de la aceituna tras la recolección, en parámetros físico-químicos y nutricionales del aceite de oliva de la variedad Racimilla. *Grasas y Aceites* 60, 382-387.
- Benito M., Lasa, J.M., Gracia, P., Oria, R., Abenoza, M., Varona, L., Sánchez-Gimeno, A.C. (2013). Olive oil quality and ripening in super-high-density Arbequina orchard. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 2207-2220.
- Benjollou, B., Talou, T., Delmas, M., Gaset, A. (1991). Oxidation of rapeseed oils: Effect of metal traces. *Journal of American Oil Chemistry Society* 68, 210-211.

- 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, 427-432.
- Bianchi, G. (1999). Extraction systems and olive oil. *OCL* 6, 49-59.
- Bianco, A., Coccioli, F., Cuiso, M., Marra, C. (2002). The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy-isochromans. *Food Chemistry* 77, 405-411.
- Bianco, A., Buiarelli, F., Cartoni, G.P., Coccioli, F., Jasionowska, R., Margherita, P. (2003). Analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry of phenolic compounds in virgin olive oil, Part II. *Journal of Separation Science* 26, 417-424.
- Borja, R., Rincón, B., Rapaso, F., Alba, J., Martín, A. (2003). Kinetics of mesophilic anaerobic digestion of two-phase olive mill solid waste. *Biochemical Engineering Journal* 15, 139-145.
- Boselli, E., Di Lecce, G., Strabbioli, R., Pieralasis, G., Frega, N.G. (2009). Are virgin olive oils obtained below 27 °C better than those produced at higher temperatures?. *LWT – Food Science and Technology* 42, 758 -757.
- Brenes, M., García, A., Ríos, J.J., Garrido, A. (2002). Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oil. *International Journal of Food Science and Technology* 37, 615-625.
- Cabrera, F., López, R., Martínez-Bordiú, A., Dupuy de Lome, E., Murillo, J.M. (1996). Land treatment of olive oil mill wastewater. *International Biodeterioration and Biodegradation* 38, 215-225.
- Cabrera, F., Martín-Olmedo, O., López, R., Murillo, M.J. (2005). Nitrogen mineralization in soils amended with composted olive mill sludge. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* 71, 249-258.
- Cacace, J.E., Mazza, G. (2003). Mass transfer process during extraction of phenolic compounds from milled berries. *Journal of Food Engineering* 59, 379-389.
- Caponio, F., Gomes, T., Summo, C., Pasqualoni, 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, 201-206.
- Caponio, F., Bilancia, M.T., Pasqualone, A., Sikorska, E., Gomes, T. (2005). Influence of the exposure to light on extra virgin olive oil quality during storage. *European Food Research and Technology* 221, 92-98.
- Caputo, A.C., Scacchia, F., Pelagagge, P. (2003). Disposal of by-products in olive oil industry: waste to energy solutions. *Applied Thermal Engineering* 23, 197-214.
- Caramia, G., Gori, A., Valli, E., Cerretani, L. (2012). Virgin olive oil in preventive medicine: From legend to epigenetics. *Critical Review in European Journal of Lipid Science and Technology* 114, 375-388.
- Cárcel, J.A. (2003). Tesis doctoral: Influencia de los ultrasonidos de potencia en procesos de transferencia de materia. En: Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia (España).
- Cárcel, J.A., García-Pérez, J.V., Benedito, J., Mulet, A. (2012). Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. *Journal of Food Engineering* 110, 200-207.

- Carpio, A., Jiménez, B. (1993). Características organolépticas y análisis sensorial del aceite de olive. Apuntes 10/93. *Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla.*
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Cerretero, A., De Carlo, M. Gallina-Toschi, T., Lercker, G., Compagnone, D., Fernández-Gutiérrez, N.G. (2005). Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 8918-8925.
- Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Cerretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2006). A simple and rapid electrophoretic method to characterize simple phenols, lignans, complex phenols, phenolics acids and flavonoids in extra virgin olive oil. *Journal of Separation Science* 29, 2221-2233.
- Casa, R., d'Annibale, A., Pieruccetti, F., Stazi, S.R., Giovannozzi, S.G., Lo Casio, B. (2003). Reduction of the phenolic components in olive-mill wastewater by an enzymatic treatments and its impact on durum wheat (*Triticum durum Desf.*) germinability. *Chemosphere* 50, 959-966.
- Casazza, A.A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., Perego, P. (2010). Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *Journal of Food Engineering* 100, 50-55.
- Cayuela, M., Bernal, M.P., Roig, A. (2004). Composting olive mill waste and sheep manure for orchard use. *Compost Science and Utilization* 12, 130-136.
- Chemat, S., Lagha, A., Ait-Amar, H., Bastels, P.V., Chemat, F. (2004). Comparison conventional and ultrasound-assisted extraction of carvone and limonene from caraway seeds. *Flavour and Fragrance Journal* 19, 188-195.
- Chemat, F., Zill-e-Huma., Kamran-Khan. (2013). Applications of ultrasound in food technology. Processing preservation and extraction. *Ultrasonic Sonochemistry* 18, 813-835.
- Cecchi, T., Passamintu, P., Cecchi, P. (2010). Study of the quality of extra virgin olive oil stored in PET bottles with or without oxigen scavenger. *Food Chemistry* 120, 730-735.
- Cicerale, S., Conlan, C.A., Sinclair, A.J., Keast, R.S.J. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Review in Food Science and Nutrition* 49, 218-236.
- Cicerale, S., Lucas, L., Keast, R. (2010). Biological activities of phenolic compounds presents in virgin olive oil. *International Journal of Molecular Sciences* 11, 458-479.
- Cinquanta, L., Esti, M., LaNotte, E. (1997). Evolution of phenolic compounds virgin olive oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists Society* 74, 1259-1264.
- Cissé, M., Bohuon, P., Sambe, F., Kane, C., Sakho, M., Dornier, M. (2012). Aqueous extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*: Experimental kinetics and modeling. *Journal of Food Engineering* 109, 16-21.
- Civantos, L. (1999). Obtención del aceite de oliva virgen. Editorial Agrícola Española S.A, 2.
- Civantos, L. (2009). La maduración de las aceitunas. Algunas consideraciones sobre la olivicultura y elaiotecnía desde la perspectiva de la experiencia. GEA Westfalia Separator Andalucía S.L, 1, 121-135.

- Conde, C., Delrot, S., Gerós, H. (2008). Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology* 165, 1545-1562.
- Covas, M. (2008). Bioactive effects of olive oil phenolic compounds in humans: Reduction of heart disease factors and oxidative damage. *Inflammopharmacology* 16, 216-218.
- Chen, Y., Luo, H., Gao, A., Zhu, M. (2011). Ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) seed by response surface methodology and their structural characteristics. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 12, 305-309.
- Cheung, Y.-C., Siu, K.-C., Wu, J.-Y. (2013). Kinetic models for ultrasound-assisted extraction of water-soluble components and polysaccharides from medicinal fungi. *Food and Bioprocess Technology* 6, 2659-2665.
- Cheyrier, V., Fulcrand, H., Sarni, P., Moutounet, M. (1997). Application des techniques analytiques à l'étude des composés phénoliques et de leurs réactions au cours de la vinification. *Analisis Magazine* 25, M14-M21.
- Christophoridou, S., Daris, P., Tseng, L.I., Spraul, M. (2005). Separation and identification of phenolic compounds in olive oil by coupling high-performance liquid chromatography with postcolumn solid-phase extraction to nuclear magnetic resonance spectroscopy (LC-SPE-NMR). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4667-4679.
- Chistopoulou, E., Lazaraki, M., Alexiou, F., Synoury, S., Frangis-Cos, E. (1996). Influence of certain factors on the composition of olive-pomace oils. Part II sterol, triterpenic dialcohols and aliphatic alcohols. *La Revista Italiana Delle Sostanze Grasse* 73, 201-211.
- Criado, M.N., Motilva, M.J., Goñi, M.P., Romero, M.P. (2007). Comparative study of the effect of the maturation process of the olive fruit on the chlorophyll and carotenoid fraction of drupes and virgin oils from *Arbequina* and *Farga* cultivars. *Food Chemistry* 100, 748-755.
- Dabbou, S., Rjiba, I., Nakbi, A., Gazzah, N., Issaoui, M., Mammami, M. (2010). Compositional quality of virgin olive oils from cultivars introduced in Tunisian arid zones in comparison to *Chemlali* cultivars. *Scientia Horticulture* 124, 122-127.
- Dabbous, S., Selvagini, R., Urbani, S., Taticchi, A., Servilli, M., Harmani, H. (2011). Comparison of the chemical composition and the organoleptic profile of virgin olive oil from two wild and two cultivated Tunisian *Olea europaea*. *Chemistry & Biodiversity* 8, 189-202.
- Dais, P., Spyros, A., Christophoridou, S., Hatzakis, E., Fragaki, G., Agiomyrgianaki, A., Salivaras, E., Siragakis, G., Daskalaki, D., Tasioula-Margari, M., Brenes, M (2007). Comparison of analytical methodologies based on H-1 and H-31 NMR spectroscopy with conventional methods of analysis for the determination of some olive oil constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 577-584.
- Deiana, M., Corona, G., Icani, A., Loru, D., Rosa, A., Atzeri, A., Paola-Melis, M., Assumta-Dessi, M. (2010). Protective effect of simple phenols from extra virgin olive oil against lipid peroxidation in intestinal Caco-2 cells. *Food and Chemical Toxicology* 48, 3008-3016.

- De La Fuente, S., Riera, E., Acosta, V.M., Blanco, A., Gallego-Juárez, J.A. (2006). Food drying process by power ultrasound. *Revista de Acústica* 36, 19-25.
- De La Torre-Carbot, K., Jauregui, O., Gimeno, E., Castellote, A.I., Lamuela-Raventos, R.M., López-Sabater, M.C. (2005). Characterization and quantification of phenolic compounds in olive oils by solid-phase extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 4331-4340.
- De La Torre-Carbot, K., Chávez-Servón, J.L., Jauregui, O., Castellote, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., Nurmi, T., Poulsen, H.E., Gaddi, A.V., Kaikkonen, J., Zunft, H., Kiesewetter, H., Fitó, M., Covas, M., López-Sabater, M.-C. (2010). Elevated circulating LDL phenol levels in men who consumed virgin rather than refined olive oil are associated with less oxidation plasma LDL. *Journal of Nutritional* 140, 501-508.
- De Leonardis, A., Angelico, R., Macciola, V., Ceglie, A. (2013). Effect of polyphenols enzymatic-oxidation on the oxidative stability of virgin olive oil. *Food Research International* 54, 2001-2007.
- Del Nobile, M.A., Bove, S., Notte, E., Sacchi, R. (2003). Influence of packaging geometry and material properties on the oxidation kinetics of bottled virgin olive oil. *Journal of Food Engineering* 57, 189-197.
- Dell'Agli, M., Maschi, O., Galli, G.V., Fagnani, R., Dal Cero, E., Caruso, D., Bosisio, E. (2008). Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via cAMP-phosphodiesterase. *British Journal of Nutrition* 99, 945-951.
- Di Giovacchino, L., Mucciarella, M.R., Costantini, N., Ferrante, M.L., Surricchio, G. (2002). Use of nitrogen to improve stability of virgin olive oil during storage. *Journal of the American Oil Chemists Society* 79, 339-344.
- Di Vaio, C., Nocerino, S., Padauno, A., Sacchi, R. (2013). Influence of some environmental factors on drupe maturation and olive oil composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 1134-1143.
- Directiva CEE/344/88 del Consejo de 13 de junio de 1988, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimentarios y sus ingredientes.
- Directiva CE 32/2009 del Consejo de 23 de abril de 2009, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los disolventes de extracción utilizados en la fabricación de productos alimentarios y sus ingredientes.
- Dufossé, L., Galaup, P., Carlet, E., Flamin, C., Valla, A. (2005) Spectrocolorimetry in the CIELab color space as useful tool for monitoring the ripening process and the quality of PDO red-smear soft cheeses. *Food Research International* 38, 919-924.
- Escribano-Bailon, C., Santos-Buelga. (2003). Polyphenol extraction from foods. En: G. Santos-Buelga, C. Williamson (Eds.), *Methods in polyphenol Analysis*, Royal Society of Chemistry, London, United Kingdom, pp.1-16.
- El Riachy, M., Priego-Capote, F., León, L., Rallo, J., Luque de Castro, M.D. (2011). Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part I. Hydrophilic phenols: A key factor for virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113, 678-691.

- Endo, Y., Usuki, R., Kaneda, T. (1984). Pro-oxidant activities of chlorophylls and their decomposition products on the photo-oxidant of methyl linolate. *Journal of American Oil and Chemistry Society* 61, 781-784.
- Esclapez, M.D., García-Pérez, J.V., Mulet, A., Cárcel, J.A. (2011). Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews* 3, 108-120.
- Esti, M., Cinquata, L., Carrone, A., Trivisonno, M.C., Notte, E., Gambacorta, G. (1996). Composti antiossidanti e parametri qualitativi di oli vergini di oliva prodotti in Molise. *La Revista Italiana Delle Sostanze Grasse* 73, 147-150.
- Fabiani, R., Sepporta, M.W., Rosignoli, P., De Bartolomeo, A., Crescimanno, M., Morozzi, G. (2011). Anti-proliferative and pro-apoptotic activities of hydroxytyrosol on different tumour cells: the role of the extracellular production of hydrogen peroxide. *European Journal of Nutrition*, 1-10.
- Fadda, C., Del Caro, A., Sanguinetti, A.M., Urgeghe, P.P., Vacca, V., Arca, P.P., Piga, A. (2012). Changes during storage of quality parameters and in vitro antioxidant activity of extra virgin monovarietal oils obtained with two extraction technologies. *Food Chemistry* 134, 1542-1548.
- Fedelli, E. (1993). Tecnología del aceite de oliva. *Olivae* 45, 20-23.
- Fernández-Jane, E., Martínez-Losa, E., Prado-Santamaria, M., Brugarosa-Brufau, C., Serrano-Martínez, M., Martínez-González, M.A. (2002). Risk of first non-fatal myocardial infarction negative associated with olive oil consumption: A case-control study in Spain. *International Journal of Epidemiology* 31, 474-480.
- Fernández-Martínez, L.A., Moyano, M.J., Hidalgo, F., Cárdenas, R., Hruschka, S. (2011). Elaboración del aceite de oliva virgen en España. El cambio tecnológico. *Ad oleum habendum. GEA Westfalia Separator Ibérica, S.A* 1, 207-229.
- Ferreiro, L., Aparicio, R. (1992). Influencia de la altitud en la composición química de los aceites de oliva vírgenes de Andalucía. Ecuaciones matemáticas de clasificación. *Grasas y Aceites* 43, 149-156.
- Frankel, E.N. (1985). Chemistry of autoxidation: mechanism, products and flavor significance. En "Flavor Chemistry of Fats and Oils". D.B. Min, T.H. Smouse. Eds. P1 AOCS Press, Champaign, IL (USA).
- Frankel, E., Bakhouché, A., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Literature Review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61, 5179-5188.
- Frega, N., Monzon, M., Lercker, G. (1999). Effect of free fatty acids on oxidative stability of vegetable oil. *Journal of American Oil Chemistry Society* 76, 325-329.
- Fregapane, G., Gómez-Rico, A., Salvador, M.D. (2010). Chapter 6 – Influence of irrigation management and ripening on virgin olive oil quality and composition. *Olives and olive oil in Health and Disease Prevention*, 51-58.
- Femenia, A., Adrover-Obrador, S., Simal, S., Rosselló, C. (2011). Procedimiento para evitar la cristalización total o parcial del aceite de oliva durante la conservación a baja temperatura. Patente nº P25827ES00. España.

- Fu, S., Arráez-Román, D., Menéndez, J.A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2009). Characterization of isomers of oleuropein aglycon in olive oils by rapid-resolution liquid chromatography coupled to electrospray time-of-flight and ion trap tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 23, 51-59.
- Gan, C.-Y., Latiff, A.A. (2011). Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. *Food Chemistry* 124, 1277-1283.
- Gandul, B., Mínguez, M.I. (1996). Chlorophyll and carotenoid composition in virgin olive oils from various Spanish olive varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72, 31-39.
- García, L.M., Seller, S., Pérez-Camino, M.C. (1996). Influence of fruit ripening on olive oil quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3516-3520.
- García, M.S., Royo, A., Guillem, M. (2009). Chemical composition of olive oils from Arbequina and Empeltre varieties grown in irrigation. *Grasas y Aceites* 60, 321-329.
- García-Pérez, J.V. (2007). Tesis doctoral: Contribución al estudio de la aplicación de ultrasonidos de potencia en el secado convectivo de alimentos. En: Departamento de Tecnología de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia, Valencia (España).
- García-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferraro, C., Vázquez-Martín, A., Menéndez, J.A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 51, 416-429.
- Georgieva, T.I., Ahring, B.K. (2007). Evaluation of continuous ethanol fermentation of dilute-acid corn stove hydrolysate using thermophilic anaerobic bacterium. *Thermoanaerobacter* BG1L1. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77, 61-68.
- Ghafoor, K., Choi, Y.H. (2009a). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape peel through response surface methodology. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 52, 295-300.
- Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y., Jo, I.H. (2009b). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 4988-4994.
- Ghanbari, R., Arwar, F., Alkharfy, K.M., Galani, A., Saari, N., (2012). Valuable nutrients and functional bioactives in different part of olive (*Olea europaea* L.) -A review. *International Journal of Molecular Sciences* 13, 1291-1340.
- Gómez-Alonso, S., Salvador, M.D., Fregapane, G. (2004). Evolution of the oxidation process in olive oil triacylglycerol under accelerated storage conditions (40-60 °C). *Journal of the American Oil Chemists Society* 81, 177-184.
- Gonçalves, B., Silva, A.P., Moutinho-Pereira, J., Bacelar, E., Meyer, A.S. (2007). Effect of ripeness and postharvest storage on the evolution of colour and anthocyanins in cherries (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry* 103, 976-984.

- González, A., Llorens, A., Cervera, M.L., Armenta, S., De la Guardia, M. (2009). Elemental fingerprint of wines from the protected designation of origin Valencia. *Food Chemistry* 112, 26-34.
- González-Centeno, M.R. (2013). Tesis doctoral: Caracterización de los subproductos de la industria vitivinícom como fuente de fibra dietética y compuestos fenólicos. Uso de la ultrasonidos de potencia para la extracción de la fracción fenólica. En: Departamento de Química. Universidad de las Islas Baleares, Palma de Mallorca (España).
- González-Centeno, M.R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rosselló, C., Teissedre, P.L. (2012). Proantocyanidin composition and antioxidant potencial of the stem winemaking byproducts from 10 different grape varieties (*Vitis vinifera* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 11850-11858.
- González-Centeno, M.R., Knoerzer, K., Sabarez, H., Simal, S., Rosselló, C., Femenia, A. (2014). Effect of acoustic frequency and power density on the aqueous ultrasonic-assisted extraction of grape pomace (*vitis vinifera* L.) – A response surface approach. *Ultrasonic Sonochemistry – In press*.
- Ghafoor, K., Choi, Y.H. (2009a). Optimization of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds and antioxidants from grape peel through response surface methodology. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 52, 295-300.
- Ghafoor, K., Choi, Y.H., Jeon, J.Y., Jo, I.H. (2009b). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 4988-4994.
- Ghafoor, K., Hui, T., Choi, Y.H. (2011). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total anthocyanins from grape peel using response surface methodology. *Journal of Food Biochemistry* 35, 735-746.
- Choe, E., Min, D.B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 5, 169-186.
- Gómez-Alonso, S., Mancebo-Campos, V., Salvador, M.D., Fregamane, G. (2007). Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 month storage at room temperature. *Food Chemistry* 100, 36-42.
- González-Centeno, M.R., Simal, S., Femenia, A., Frau, M., Rosselló, C. (2013). Identification of behaviour patterns of viticultural regions according to their agroclimatic fingerprint and grape characteristics. *Australian Journal of Grape and Wine Research* 19, 53-61.
- Guil-Guerrero, J.L., Urda-Romacho, J. (2009). Quality of extra virgin olive oil affected by several packaging variables. *Grasas y Aceites* 60, 125-133.
- Gutiérrez, R., Janer del Valle, C., Janer del Valle, M.L. Gutiérrez-Rosales, F. (1977). Relación entre los polifenoles y la calidad y estabilidad del aceite de oliva virgen. *Grasas y Aceites* 28, 101-106.
- Gutiérrez, F., Jiménez, B., Ruíz, A., Albi, A. (1999). Effect of olive ripeness of the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on different components involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 121-127.

- Gutiérrez-Rosales, F., Gómez-Herrera, C., Gutiérrez-González-Quijano, R. (1988). Estudio de la cinética de evolución de los índices de calidad del aceite de oliva virgen durante su conservación en envases comerciales. *Grasas y Aceites* 39, 245-252.
- Gutiérrez-Rosales, F., Garrido-Fernández, J., Gallardo-Guerrero, L., Gardol-Rojas, B., Mínguez-Mosquera, M-I (1992). Action of chlorophylls on the stability of virgin olive oil. *Journal of American Oil Chemistry* 69, 866-871.
- Gutiérrez-Rosales, F., Rios, J.J., Gómez-Rey, M.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, 6021-6025.
- Gutiérrez-Rosales, F., Romero, M.P., Casanovas, M., Motilva, M.J., Mínguez-Mosquera, M.I. (2010). Metabolites involved in oleuropein accumulation and degradation in fruits of *Olea europaea* L: Hojiblanca and Arbequina varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 12924-12933.
- Gutfinger, K., Fritsche, S. (1981). Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society* 58, 966-968.
- Hadrami, E.A., Belaqziz, M., Hassni, E.M., Hanifi, S., Abbad, A., Capasso, R., Gianfreda, L., Hadrami, I. (2004). Physico-chemical characterization and effects of olive oil mill wastewater fertirrigation on the growth of some Mediterranean crops. *Journal of Agronomy* 3, 247-254.
- Hafidi, M., Amir, S., Revel, J.C. (2005). Structural characterization of olive mill waste water after aerobic digestion using elemental analysis, FTIR and ¹³C NMR. *Process Biochemistry* 40, 2615-2622.
- Herrero, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2006). Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry* 98, 136-148.
- Herrero, M., Mendiola, J.A., Cifuentes, A., Ibáñez, E. (2010). Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography* 1217, 2495-2511.
- Holman, R.T., Elmer, O.C. (1947). The rates of oxidation of unsaturated fatty acids and esters. *Journal of American Oil Chemistry Society* 24, 127-134.
- Hossain, M.B., Bruton, N.P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C.P., Martin-Diana, B., Barry-Ryan, C. (2012). Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry* 19, 582-590.
- Humanes, M.D., Humanes, L. (2011). El almacenamiento del aceite de oliva: calidad, estabilidad, condiciones y tiempo de conservación. *Ad óleum habendum. GEA Westfalia Separator Iberia, S.A* 1, 231-250.
- Hrnčirik, K., Fritsche, S. (2004). Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive. *European Journal of Lipid Science and Technology* 106, 540-549.
- Ilyasoglu, H., Ozcelik, B., Van Hoed, V., Verhe, R. (2010). Characterization of Aeginan olive oils by their minor compounds. *Journal of American Oil Chemistry Society* 87, 627-636.

- Inajeros-García, A.M., Androulaki, A., Salvador, M.D., Fregapane, G., Tsimidou, M.Z. (2009). Discussion on the objective evaluation of virgin olive oil bitterness. *Food Research International* 42, 279-284.
- 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, 220-225.
- Japón-Lujna, R., Luque de Castro, M.D. (2007). Static-dynamic superheated liquid extraction of hydroxytyrosol and others biophenols from alperujo (a semisolid residue of the olive oil industry). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 2639-2634.
- Jara, R., Rubert, B. (1993) Oli verge de la Serra de Tramuntana. Edicions, Conselleria d'Agricultura i Pesca. Islas Baleares.
- Jiménez, B., Carpio, A. (2008). La cata de aceites. Instituto de Investigación y Formación Agraria y pesquera. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía, 145. Córdoba.
- Jiménez, B., Sánchez-Ortiz, A., Lorenzo, M.L., Rivas, A. (2013). Influence of fruit ripening on agronomic parameters, quality indices, sensory attributes and phenolic compounds of picudo olive oils. *Food Research International* 54, 1860-1867.
- Jung, V., Olsson, E., Caspersen, S., Asp, H., Jensén, P., Alsanius, M.W. (2003). Response of young hydroponically growth tomato plants to phenolic acids. *Scientia Horticulturae* 100, 23-37.
- Kalua, C.M., Allen, M.S., Bedgood Jr, D.R., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., Robars, K. (2007a). Olive oil volatile compounds, flavor development and quality. A critical review. *Food Chemistry* 100, 273-286.
- Kalua, C.M., Bedgood, D.R., Bishop, A.G., Prenzler, P.D. (2007b). Changes in virgin olive oil quality during low-temperature fruit storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 2415-2422.
- Karacabey, E., Mazza, G. (2010). Optimisation of antioxidant activity of grape cane extracts using response surface methodology. *Food Chemistry* 119, 343-348.
- Keys, A., Menotti, A., Aravanis, C., Blackburn, M., Djordjevic, B.S., Buzina, R., Dontas, A.S., Fidanza, F., Karvonen, M.J., Kimura, N. (1984). The seven countries study: 2,289 death in 15-years. *Preventive medicine* 13, 141-145.
- Keys, A., Avartis, C., Blackburn, M., Buzina, R., Dontas, A.S., Fidanza, F., Karvonen, M.J., Menotti, A., Nedeljkovic, S., Punsar, S., Toshima, H. (1985). Serum cholesterol and cancer mortality in the Seven Countries Study. *American Journal of Epidemiology* 121, 870-883.
- Keys, A., Mienotti, A., Karonen, M.J., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Djordjevic, B.S., Dontas, A.S., Fidanza, F., Keys, M.H., Kromhout, D., Nedeljkovic, S., Punsar, S., Seccareccia, F., Toshima, H. (1986). The diet and 15-years rate in the Seven Countries Study. *American Journal of Epidemiology* 124, 903-915.
- Kiritsakis, A.K. (1992). El aceite de olive. Madrid Vicente, Ediciones. Madrid.
- Kiritsakis, A.K. (1998). Flavor components of olive oil – A Review. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 75, 673-681.

- Krichene, D., Allalout, A., Baccouri, B., Fregapane, G.Q., Salvador, M.D., Zarrouk, M. (2009). Territorial investigation base on the chemical composition of Chemlali virgin olive oils. *Asian Journal of Biochemistry* 4, 1-12.
- Krichene, D., Allalout, A., Mancebo-Campos, V., Salvador, M.D., Zarrouk, G., Fregapane, G. (2010). Stability of virgin olive oil and behaviour of its natural antioxidants under medium temperature accelerated storage conditions. *Food Chemistry* 121, 171-177.
- Krishnaswamy, K., Orsat, V., Garipey, Y., Thangavel, K. (2013). Optimization of microwave-assisted extraction of phenolic antioxidants from grape seeds (*Vitis vinifera*). *Food and Bioprocess Technology* 6, 441-455.
- Krokida, M.C., Maroules, Z.B., Kremalis, C. (2002). Process desing of rotatory dryers for alive cake. *Drying Technology* 20, 771-787.
- Komilis, D.P., Karatzas, E., Halvadakis, C.P. (2005). The effect of olive mill wastewater on seed germination after various pre-treatment techniques. *Journal of Environmental Manegement* 74, 339-348.
- Kontou, N., Psaltopoulou, T., Panagiotakos, D., Dimopoulos, M.A., Linos, A. (2011). The Mediterranean diet in cancer prevention: A review. *Journal of Medicinal Food* 14, 1065-1078.
- Ku, C.S., Mun, S.P. (2008). Optimization of the extraction of anthocyanin from Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) marc produced during traditional wine processing and characterization of the extracts. *Bioresource Technology* 99, 8325-8330.
- Lafka, T.I., Lazou, A.E., Sinanoglou, U.J., Lazos, E.S. (2011). Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill waste. *Food Chemistry* 125, 92-98.
- Lazzed, A., Perri, E., Caravita, M.A., Khlif, M., Cossentini, M. (2008). Influence of olive maturity stage and geographical origin on some minors components in virgin olive oil of the Chemlali variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 982-988.
- Lercker, G., Frega, N., Bocci, F., Mozzon, M. (1999). Volatile constituents and oxidative stability of virgin olive oils: influence of the kneading of olive-paste. *Grasas y Aceites* 50, 26-29.
- Lerma-García, M.J., Simó-Alonso, E.F., Bendini, A., Cerretani, L. (2009). Metal oxide semiconductor sensor for monitoring of oxidative status evolution and sensory analysis of virgin olive oils with different phenolic content. *Food Chemistry* 117, 608-614.
- Li, L., Chen, P., Gloyna, E.F. (1993) Kinetic model for wet oxidation of organic compounds in subcritical and supercritical water. In supercritical fluid engineering science: Fundamentals and Applications; Kiran, E., Brennecke, J.F., Eds., ACS Symposium Series 514., American Chemical Society: Washington, DC, p305.
- Loizzo, M.R., Lecce, G.D., Boselli, E., Menichini, F., Frega, N.G. (2011). Inhibitory activity of phenolic compounds from extra virgin olive oils on the enzymes involved in diabetes, obesity and hypertension. *Journal of Food Biochemistry* 35, 381-399.
- López-Miranda, J., Delgado-Lista, J., Pérez-Martínez, P., Jiménez-Gómez, Y., Fuentes, F., Ruano, J., Martín, C. (2007). Olive oil and the harmostatic system. *Molecular Nutrition and Food Research* 51, 1249-1259.

- López-Miranda, J., Pérez-Jiménez, F., Ros, E., De Caterina, R., Badimón, L., Covas, M.I., et al., (2010). Olive oil and health Summary of the II international of conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Cordoba (Spain) 2008. *Nutritional, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 20, 284-294.
- Lotti, G., Izzo, R., Nacolini, F. (1973). Influenza del clima e dell'andamento della maturazione sull'olio dei semi di *Mormodica balsamia* L. *Revista Italiana delle Sostanze Grasse* 50, 425-431.
- Lozano-Sánchez, J., Segura, Carretero, A., Menéndez, J.A., Oliveras-Ferraro, C., Cerretani, L., Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Prediction of extra virgin olive oil varieties through their phenolic profile. Potential cytotoxic activity against human breast cancer cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 9942-9955.
- Luthria, D.L. (2008). Influence of the experimental conditions on the extraction of phenolic compounds from parsley (*Petroselinum crispum*) flakes using pressurized liquid extractor. *Food Chemistry* 107, 745-752.
- Madejón, E., Galli, E., Tomati, U. (1998). Composting of waste produced by low water consuming olive mill technology. *Agrochimica* 42, 173-183.
- Madigan, C., Ryan, M., Owens, D., Collins, P., Tomkim, G.M. (2000). Dietary unsaturated fatty acids in type 2 diabetes: Higher levels of postprandial lipoprotein on a linoleic acid-rich sunflower oil diet compared with an oleic acid rich olive oil diet. *Diabetes Care* 23, 1472-1477.
- Mahugo, C., Sosa, Z., Torres, M.E., Santana, J.J. (2009). Methodologies from the extraction of phenolic compounds from environmental samples. New approaches. *Molecules* 14, 298-320.
- Mancebo-Campos, V., Salvador, M.D., Fregapane, G. (2014). Antioxidant capacity of individual and combined virgin olive oil minor compounds evaluated at mild temperature (25-40°C) as compared to accelerated and antiradical assays. *Food Chemistry* 150, 374-381.
- Mantzavinos, D., Kalogerakis, N. (2005). Treatment of olive oil mill effluents. Part I. Organic matter degradation by chemical and biological processes-an overview. *Environment International* 31, 289-295.
- Manzi, P., Panfili, G., Esti, M.M., Pizzoferrato, L. (1998). Natural Antioxidants in the unsaponifiable fraction of virgin olive oils from different cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 77, 115-120.
- Martaix, J. Rodríguez, G., Barbacho, F.J., Martínez, E. (2009). Aceite de oliva y salud. El aceite de oliva virgen. Tesoro de Andalucía. *Fundación Unicaja* 1, 327-357.
- Martínez, J.M., Muñoz, E., Alba, J., Lanzón, A. (1975). Informe sobre la utilización del analizador de rendimiento Abencor. *Grasas y Aceites* 26, 379-385.
- Martínez-González, M.A., Fernández-Jané, E., Serrano-Martínez, M., Martí, A., Martínez, J.A., Martínez-Moreno, J.M. (2002). Mediterranean diet and reduction on the risk of a first acute myocardial infarction: An operational healthy dietary Score. *European Journal of Nutrition* 41, 153-160.

- Martínez-Niet, L., Hodaifa, G., Lozano, J.L. (2010). Changes in phenolic compounds and Rancimat stability of olive oils from varieties of olive at different stages of ripeness. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 2393-2398.
- Masella, P., Parenti, A., Spugnoli, P. (2012). Glass bottles of different size for the packaging of virgin olive oil: Influence on shelf life. *Revista Italianan delle Sostanze Grasse* 89, 161-165.
- Mason, T.J. (1998). Power ultrasound in food processing. The way forward. En: Povey, M.J.W., Mason, T.J. (Eds.), *Ultrasound in Food Processing Chapman & Hall*, Londres (Reino Unido).
- Mason, T.J., Chemat, F., Vinatoru, M. (2011). The extraction of natural products using ultrasound or microwaves. *Current Organic Chemistry* 15, 237-247.
- Mateos, R., Domínguez, M., Espartero, J., Cert, A. (2003). Antioxidant effect of phenolic compounds, alpha-tocopherol, and others minor components in virgin olive oil. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 51, 7170-7175.
- Mateos, R., Cert, A., Pérez-Camino, M.C., García, J.M. (2004). Evaluation of virgin olive oil bitterness by qualification of secoiridoid derivatives. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 81, 71-75.
- Medina, E., De Castro, A., Romero, C., Brenes, M. (2006). Comparison of the concentration of phenolic compounds in olive oils and others plant oils: Correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4954-4961.
- Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M., Heredia, F.J. (2003). Application of tristimulus colorimetry to estimate the carotenoids and content in ultrafrozen orange juices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 7266-7270.
- Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M., Heredia, F.J. (2007). Carotenoids, color and ascorbic acid content of a novel frozen-marketed orange juice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 1347-1355.
- Mendez, A.I., Flaqué, E. (2007) Effect of storage time and container type on the quality of extra virgin olive oil. *Food Control* 18, 521-529.
- Menéndez, J.A., Vázquez-Martin, A., Colomer, R., Brunet, J., Carrasco-Pancorbo, A., García-Villalba, R., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Cerretero, A. (2007). Olive oil's bitter principle reverse acquired autoresistance to trastuzumab (Herceptin(TM)) in HER2-overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer* 7, 1-19.
- Mendoza, J., Martínez-Román, F., Moyano, M.J., Hidalgo, F. (2009). Tecnología de elaboración del aceite de oliva. Algunas contribuciones sobre olivicultura y elaiotecnica desde la perspectiva de la experiencia. *GEA Westfalia Separator Andalucía, S.L* 1, 137-175.
- Minguez-Mosquera, M.I., Rejano-Navarro, L., Gandul-Rojas, B., Sánchez-Gómez, A.H., Garrido-Fernández, J. (1991). Colour-pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of American in virgin olive oil chemistry society* 68, 332-336.
- Minjares-Fuentes, R., Femenia, A., Garau, C., Meza-Velázquez, J.A., Simal, S., Rosselló, C. (2014). Ultrasound assisted extraction of pectin from grape pomace using citric acid: a response surface methodology approach. *Carbohydrate Polymers, In press*

- Miyashita, K., Takagi, T. (1986). Study on the oxidative rate and pro-oxidant activity of free fatty acids. *Journal of American Oil Chemistry Society* 63, 1380-1384.
- Molina, A.E., Yáñez, R.D., Moumen, A., Martín, G.I. (2003). Chemical composition and nitrogen availability for goats and sheep of some olive by-products. *Small Ruminant Research* 49, 329-336.
- Montedoro, G.F., Servilli, M., Baldioli, M., Miniati, E. (1992) Simple and hydrolysable phenol compounds in olive oil. Note 1. Their extraction, separation and quantitative and semi-quantitative separation and evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 1571-1576.
- Montedoro, G.F., Taticchi, A., Esposto, S., Selevaggini, E., Urbani, S., Servili, M. (2007). Antioxidants in virgin olive oil. *Olea* 26, 5-13.
- Morales, M.T., Ríos, J.J., Aparicio, R. (1997). Changes in volatiles composition of virgin olive oil during oxidation: Flavors and off-flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2666-2673.
- Morelló, J.R., Morilva, M.J., Tovar, M.J., Tomero, M.P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv. Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry* 85, 357-364.
- Morillo, J.A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sánchez, M., Ramos-Comenzana, A., Russell, N.J. (2009). Bioremediation and biovalorisation of olive-mill waste. *Applied Microbiology and Biotechnology* 82, 25-39.
- Motilva, M.J., Ramos, T., Romero, M.P. (2001). Caracterización geográfica de los aceites de oliva vírgenes de las denominaciones de origen protegida "Les Garrigues" por su perfil de ácidos grasos. *Grasas y Aceites* 5, 26-32.
- Moyano, M.J., Meléndez-Martínez, J., Alba, J., Heredia, F.J. (2008). A comprehensive study on the color of virgin olive oils and its relationship with their chlorophylls and carotenoids indexes (II): CIELUV and CIELAB uniform color spaces. *Food Research International* 41, 513-521.
- Mulet, A., Berna, A., Forcén, M., 1992. Differentiation and grouping characteristics of varietal grape musts and wines from majorcan origin. *American Journal of Enology and Viticulture* 43, 221-226.
- Mulet, A., Carcel, J., Benedito, J., Rosselló, C., Simal, S. (2003). Ultrasonic mass transfer enhancement in food processing. In transport Phenomena in Food Processing. Ed Welti-Chanes, J., Vélez-Ruiz, J., Barbosa-Canova, G., CRC Press, New York, EEUU
- Naczki, M., Shahidi, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics on food, *Journal of Chromatography A* 1054, 95-111.
- Nergiz, C., Unal, K. (1991). Determination of phenolic acids in virgin oil. *Food Chemistry* 39, 237-240.
- Noordin, M.Y., Venkatesh, V.C., Sharif, S., Elting, S., Abdullah, A. (2004). Application of response surface methodology in describing the performance of coated carbide tools when turning AISI 1045 steel. *Journal of Materials Processing Technology* 145, 46-58.
- MAPA, 1994. Métodos oficiales de análisis de suelos y aguas para riego. En: Métodos Oficiales de Análisis, Madrid.

- Obied, H.K., Allen, M.S., Bedgood, D.R., Prenzler, P.D., Robards, K., Stockmann, R. (2005). Bioactivity and analysis of biophenols recovered from olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 823-837.
- Oliveras-López, M-J., Innocenti, M., Giacherini, 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, 726-732.
- Ortega-García, F., Peragón, J. (2010). HPLC analysis of oleuropein, hidroxytyrosol, and tirosol in stems and roots of *Olea europea* L. cv. Picual during ripening. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 90, 2295-2300.
- Oueslati, I., Anniva, C., Daoud, D., Tsimidou, M.Z., Zarrouk, M. (2009). Virgin olive oil VOO production en Tunisia: The comercial potential of the major olive varieties from the arid Tataouine zone. *Food Chemistry* 112, 733-741.
- Uni, Y., Flamini, G., Issaoui, M., Nabil, B. Y., Cioni, P. L., Hammami, M., Douja, D., Zarrouk, M. (2011). Volatile compounds and compositional quality of virgin olive oil from Oueslati variety: Influence of geographical origin. *Food Chemistry* 124, 1770-1776.
- Owen, R.W., Mier, W., Giacosa, A., Hull, W.E., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. (2000). Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry* 46, 974-988.
- Ozel, M.Z., Gogus, F., Lewis, A.C. (2003). Subcritical water extraction of essential oils, from *Tymbra spicata*. *Food Chemistry* 82, 381-386.
- Padilla, M.N., Hernández, M.L., Sanz, C., Martínez-Rivas, J.M. (2009). Functional characterization of two 13-lopoxigenase genes from olive fruit in relation to the biosynthesis of volatile compounds of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 9097-9107,
- Pagliarini, E., Stramba, P., Semeria, L. (1994). Study of the subjective affective meaning and motivational aspects towards extra virgin olive oil. *Grasas y Aceites*, 45, 65-67.
- Park, H.S., Im, N.G., Kim, K.H. (2012). Extraction behaviors of caffeine and chlorophylls in supercritical decaffeination of green tea leaves. *LWT-Food Science and Technology* 45, 73-78.
- Pérez, C.R., González, J.L., Benítez, C., Valero, E. (2005). Evolución de polifenoles en un suelo tras la aplicación de orujos de aceituna de dos fases. *Residuos* 85, 54-58.
- Pinelo, M., Sineiro, J., Núñez, M.J. (2006). Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering* 77, 57-63.
- Piras, F., Mazza, R., Consolati, S.G., Cannas, G., Casti, D., Busia, G., Mazzette, R. (2013). Shelf life on fresh air packaged and precooked vacuum packaged quails. *Italian Journal of Food Safety* 2, 165-169.
- Patist, A., Bates, D. (2008). Ultrasonic innovations in the food industry: From the laboratory to commercial production. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 147-154.
- Pridham, J.B. (1965). Low molecular weight phenols on higher plants. *Annual Review of Plant Physiology* 16, 13-36.

- Pristouri, G., Badeka, A., Kontominas, M.G. (2010). Effect of packaging material headspace, oxygen and light transmission, temperature and storage time on quality characteristics of extra virgin olive oil. *Food Control* 21, 412-418.
- Psaltopoulou, T., Kosti, R.I., Haidopoulos, D., Dimopoulos, M., Panagiatokos, D.B. (2011). Olive oil intake is inversely related to cancer prevalence: A systematic review and a meta-analysis of 13800 patients and 23340 controls in 19 observations studies. *Lipids in Health and Disease*, 10.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M., Boskou, D. (2000). α -Tocopherol content of Greek virgin olive oils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48, 1770-1775.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M. (2001). Pigments in Greek virgin olive oils: occurrence and levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 640-647.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M. (2002). Stability of virgin olive oil. Photo-oxidation studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 722-727.
- Ragnarsson, J.O., Labuza, T.P. (1977) Accelerated shelf-life testing for oxidative rancidity on foods- A Review. *Food Chemistry* 2, 291-308.
- Rahmani, L., Saasi-Csallany, A. (1998). Role of minor constituents in the photo-oxidation of virgin olive oil. *Journal of American Oil Chemistry Society* 75, 837-743.
- Ramos, L., Kristenson, E.M., Brinkman, U.A. (2002). Current use of the pressurised liquid extraction and subcritical water extraction in environmental analysis. *Journal of Chromatography A* 975, 3 – 29.
- Rapisarda, P., Bellomo, S.E., Intelisano, S. (2001). Storage temperature effects on blood orange fruit quality. *Journal of the American Oil Chemists Society* 49, 3230-3235.
- Reglamento (CEE) N° 2568/91 de la Comisión, del 11 de julio de 1991, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva sobre sus métodos de análisis DOCE N° L248. Anexos II y III.
- Reglamento (CEE) N° 2081/1992 del Consejo, de 14 de julio de 1992, relativo a la protección de las indicaciones geográficas de las denominaciones de origen de los productos agrícolas y alimentarios.
- Reglamento (CE) N° 1437/2004 de la Comisión, de 11 de agosto de 2004, por el que se completa el anexo del Reglamento (CE) N° 2400/96 relativo a la inscripción de determinadas denominaciones en el Registro de Denominaciones de Origen Protegidas y de Indicaciones Geográficas Protegidas (Valecay, Scottish Farmed Salmon, Ternera de Extremadura y Aceite de Mallorca o A ceite Mallorquí u Oli de Mallorca u Oli mallorquí).
- Reglamento (CE) N° 640/2008 de la Comisión de 4 de julio de 2008, por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- Reglamento (UE) N° 61/2011 de la Comisión de 24 de enero de 2011, por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 2568/91 de la Comisión, de 11 de julio de 1991, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

- Rizzo, V., Torri, L., Licciardello, F., Piergiovanni, L., Marutore, G. (2013). Quality changes of extra virgin olive oil packaged in coloured polyethylene terephthalate bottle stored under different lighting conditions. *Packaging Technology and Science*. DOI: 10.1002/pts.2044.
- 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, 596-601.
- Rodríguez, G., Rodríguez, R., Jiménez, A., Guillém, R., Fernández-Balaños, J. (2007). Effect of steam treatment of Alperujo on the composition, enzymatic saccharification, and in vitro digestibility of Alperujo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 136-142.
- Rodríguez-González, V.M., Femenia, A., Minjares-Fuentes, R., González-Laredo, R.F. (2012). Functional properties of pasteurized samples of *Aloe barbadensis* Miller: Optimization using response surface methodology. *LWT-Food Science and Technology* 47, 225-232.
- Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez, M.M.A. (2004). The use of elemental sulphur as organic alternative to control pH during composting of olive mill waste. *Chemosphere* 57, 1099-1105.
- Roig, A., Cayuela, M.L., Sánchez, M.M.A. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management* 26, 960-969.
- Romero, C., Medina, E., Vargas, J., Brenes, M., De Castro, A. (2007). In vitro activity of olive oil polyphenols against helicobacter pylori. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 680-686.
- Romero-Aroca, A., Díaz, I., Tous, J. (2002). Optimal harvesting period for “Arbequina” olive cultivar in Catalonia (Spain). *Acta Horticulturae* 586, 393-396.
- Romero-Aroca, A., Calvo, M.A., Tous, J. (2009). Uso de muestras de referencia para verificar la fiabilidad de los paneles de cata de aceite acreditados por ISO 17025. IBEROLAB-V, Barcelona.
- Romero-Aroca, A., Tous, J., Gracia, M.S. (2011). Fatty acids and sterol composition of “Empeltre” virgin olive oil in Ebro valley and Balearic Islands. *Acta Horticulturae* 924, 385-392.
- Rosselló, C., Bestard, I., Cañellas, J., Femenia, A., Simal, S. (2003). Conèixer i Gaudir els aliments de les Illes Balears. Universitat de les Illes Balears. Servei de Publicacions i Intercanvi Científic, Palma de Mallorca (España).
- Rotondi, A., Bendini, A., Cerretani, L., Mari, M., Lerker, G., Gallina-Toshi, T. (2004). Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. Nostrana di Brisighella extra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 3649-3654.
- Ruíz, D., Egea, J., Tomás-Barberán, F.A., Gil, M.I. (2005). Carotenoids from new apricot (*Prunus armeniaca* L) varieties and their relationship with and skin color. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 6368-6374.
- Sacchi, R., Savarese, M., Del Regno, A., Paduano, A., Terminiello, R., Ambrosino, M.L. (2008). Shelf life of vegetable oils bottles in different scavenging polyethylene terephthalate (PET) containers. *Packaging Technology Science* 21, 269-276.
- Şahin, S., Şamlı, R. (2013). Optimization of olive leaf extracts obtained by ultrasound-assisted extraction with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry* 20, 595-602.

- Salvador, M.D., Aranda, F., Fregapane, G. (1999). Chemical composition of comercial Cornicabra virgin olive from 1995/96 and 1996/97 crops. *Journal of the American Oil Chemists Society* 75, 1305-1311.
- Salvador, M.D., Aranda, F., Fregapane, G. (2001). Influence of the ripening on Cornicabra virgin olive oil. A study of four crop seasons. *Food Chemistry* 73, 45-53.
- Salvador, M., Aranda, F., 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, 359-366.
- Samaniego-Sánchez, C., Oliveras-López, M.J., Quesada-Granados, J.J., Villalón-Mir, M., López-Serrana, H. (2012). Alterations in picual extra virgin olive oils under different storage conditions. *European Journal of Lipids Science and Technology* 114, 194-204.
- Sánchez, J., De Miguel, C., Osorio, E., Marín, J., Fuentes, M., Ardilla, T., Gallardo, L., Martínez, M. (2009). Characteristics of virgin olive oils from olive zone of Extremadura (Spain), and an approximation to their varietal origin. *Journal of the Americas Oil Chemists Society* 86, 933-940.
- Sánchez, J., Osorio, E., Montaña, A.M., Martínez, 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, J., Osorio, E., Montaña, A.M., Martínez, M. (2004). Sterol and erythodiol+uvaol content of virgin olive oils from cultivars of Extremadura (Spain). *Food Chemistry* 87, 255-230.
- Savarese, M., De Marco, E., Sacchi, R. (2007) Characterization of phenolic extracts from olives (*Olea europaea* cv. *Pisciottana*) by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry* 105, 761-770.
- Servilli, M., Montedoro, G.M. (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive quality. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104, 602-613.
- Servilli, 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 effect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography* 1054, 113-127.
- Servilli, M., Esposito, S., Fabiani, R., Urbani, S., Taticchi, A., Mariucci, E., Selvaggini, R., Montedoro, G.F. (2009). Phenolic ompounds in olive oil: Antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology* 17 76-84.
- Shirsath, S.R., Sonawane, S.H., Gogate, P.R. (2012). Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations. A review of current status. *Chemical Engineering and Processing* 53, 10-23.
- Stefanouadaki, E., Williams, M., Harwood, J. (2010). Changes in virgin olive oil characteristics during different storage conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112, 906-914.
- Strati, I.F., Oreopoulou, V. (2011). Process optimisation for recovery of carotenoids from tomato waste. *Food Chemistry* 129, 747-752.

- Sturzoiu, A., Stroescu, M., Guzun, A.S., Dobre, T. (2011). Empirical models applied for kinetics extraction of beta-carotene from *Rosa canina*. *Revista de Chimie* 62, 344-348.
- Stroneham, M., Goldacre, M., Seagroatt, V., Gill, L. (2000). Olive oil, diet and colorectal cancer: An ecological study and a hypothesis. *Journal Epidemiological Community Health* 54, 756-760.
- Sofi, F., Cesari, F., Abbate, R., Gersini, G.F., Casini, A. (2008). Adherence to Mediterranean diet and health status: Meta-analysis. *British Medical Journal* 337, 673-673.
- Solinas, M., Marsilio, V., Angerosa, F. (1987). Behaviour of some components of virgin olive oil flavor in connection with the ripening of olives. *Revista Italiana delle Sostanze Grasse* 64, 475-480.
- Suárez, M., Macia, A., Romero, M., Motilva, M. (2008). Improve liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Chromatography A* 1214, 90-99.
- Suárez, M., Romero, M.P., Ramo, T., Maciá 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, 1463-1472.
- Tabaraki, R., Heidarzadi, E., Benvidi, A. (2012). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of pomegranate (*Punica granatum L.*) peel antioxidants by response surface methodology. *Separation and Purification Technology* 98, 16-23.
- Tabaraki, R., Nateghi, A. (2011). Optimization of ultrasonic-assisted extraction of natural antioxidants from rice bran using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry* 18, 1279-1286.
- Tawfik, M.S., Huyghebaert, A. (1999). Interaction of packaging materials and vegetable oils: oil stability. *Food Chemistry* 64, 451-459.
- Tiscornia, A., Fiorina, N., Evalgesti, F. (1982). Chemical Composition of Olive Oil and Variations Induce by Refining. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 59, 519.
- Tsimidou, M., Papadopoulos, G., Boskou, D. (1992). Phenolic compounds and stability of virgin olive oil. Part I. *Food Chemistry* 45, 141-144.
- Tous, J., Romero, A., Plana, J., Guerrero, L., Díaz, I., Hermoso, J.F. (1997). Características químico-sensoriales de los aceites de olive "Arbequina" obtenido en distintas zonas de España. *Grasas y Aceites* 48, 415-424.
- Tovar, M.J., Motilva, M., Romero, M.P. (2001). 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, 5502-5508.
- Uceda, M., Frías, L. (1975). Harvest dates: evolution of the fruit oil content, oil composition and oil quality. Proceedings II Seminario Olerícola Internacional. COI, Córdoba. 125-128.
- Vacca, V., Del Caro, A., Poiana, M., Piga, A. (2006). Effect of storage period and exposure conditions on the quality of *bosana* extra virgin olive oil. *Journal of Food Quality* 29, 139-150.

- Van Leeuwen, C., Friant, P., Choné, X., Tregouat, O., Koundouras, S., Dubourdiou, D. (2004). Influence of climate, soil, and cultivar on *terroir*. *American Journal of Enology and Viticulture* 55, 207-217.
- Vázquez-Romero, A., Janer del Valle, C., Janer del Valle, M.L. (1973). Determinación de los polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas y Aceites* 24, 250-257.
- Vekiari, S.A., Oreopoulou, V., Kourkoutas, Y., Kamoun, N., Masallen, M., Psimouli, V., Arapoglu, D. (2010). Characterization and seasonal variation of the quality of virgin olive oil of the Throumbolia and Koroneiki varieties from Southern Greece. *Grasas y Aceites* 61, 221-231.
- Velasco, J., Dobargones, C. (2002) Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104, 661-676.
- Vichi, S., Romero-Aroca, A., Tous, J., López-Tamames, E., Buixaderas, S. (2008). Determination of volatile phenols in virgin olive oil and their sensory significance. *Journal of Chromatography A* 1211, 1-7.
- Vilkhu, K., Mawson, R., Simons, L., Bates, D. (2008). Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 9, 161-169.
- Virot, M., Tomao, V., Le Bourvellec, C., Renard, C.M.C.G., Chemat, F. (2010). Towards the industrial production of antioxidants from food processing by-products with ultrasound-assisted extraction. *Ultrasonics Sonochemistry* 17, 1066-1074.
- Visioli, F., Romani, A., Mulinacci, N., Zarini, S., Conte, D., Vincieri, F.F., Galli, C. (1999). Antioxidant and other biological activities of olive mill waste waters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3397-3401.
- Visolini, F., Galli, G. (1998). Olive oil phenols and their potential effects on human health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 4292-4296
- Wagner, K.H and Elmafda, I. (1999). Nutrient antioxidants and stability of frying oils: tocochromanols, β -carotene, phylloquinone, ubiquinone. En: "Frying Foods". Boskou, D. and Elmafda, I. Eds.p 163. Technomic Publishing, Lancaster, P.E.
- Wang, L.J., Weller, C.L. (2006). Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. *Trends in Food Science and Technology* 17, 300-312.
- Wang, X., Wu, Y., Chen, G., Yue, W., Liang, Wu, Q. (2013). Optimisation of ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from *Sparganii rhizome* with response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry* 20, 846-854.
- Warleta, F., Campos, M., Allouche, Y., Sánchez-Quesada, C., Ruiz-Mora, J., Beltrán, G., Gaforio, J.J. (2010). Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 48, 1092-1100.
- Warleta, F., Quesada, C.S., Campos, M., Allouche, Y., Beltran, G., Gaforio, J.J. (2011). Hydroxytyrosol protect against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients* 3, 839-857.
- Yang, D., Kong, D., Zhang, H. (2007). Multiple pharmacological effects of olive oil phenols. *Food Chemistry* 104, 1269-1271.

- Yang, L., Cao, Y.-L., Jiang, J.-G., Lin, Q.-S., Chen, J., Zhu, L. (2010). Response surface optimization of ultrasound-assisted flavonoids extraction from the flower of *Citrus aurantium* L. var. *amara* Engl. *Journal of Separation Science* 33, 1349-1355.
- Yanishlieva-Maslarova, N.V. (2001) Pokorny, J., Gordon, M. (2001). Inhibiting oxidation. In "Antioxidants in Food". Eds. Wood-head Publishing Ltd. Cambridge. p 22.
- Ye, J., Feng, L., Xiong, J., Xiong, Y. (2011). Ultrasound-assisted extraction of corn carotenoids in ethanol. *International Journal of Food Science and Technology* 46, 2131-2136.
- Youssef, N.B., Zarrouk, W., Carrasco-Pancorbo, A., Ouni, Y., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez A., Daoud, D., Zarrouk, M. (2010). Effect of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of chétoui virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agricultural* 90, 199-204.
- Youssef, O., Guido, F., Manel, I., Youssef, N.B., Luigu, C.P., Mahamed, M., Daoud, D., Mokhtar, Z. (2011). Volatile compounds and compositional quality of virgin olive oil from oueslati variety: Influence of geographical origin. *Food Chemistry* 124, 1770-1776.
- Zou, T.-B., Wang, M., Gan, R.-Y., Ling, W.-H. (2011). Optimization of ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from mulberry, using response surface methodology. *International Journal of Molecular Sciences* 12, 3006-3017.

**CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA ASOCIADA AL
DESARROLLO DE LA TESIS**

9. CONTRIBUCIÓN CIENTÍFICA ASOCIADA AL DESARROLLO DE LA TESIS

Patente nacional

TÍTULO: PROCEDIMIENTO PARA EVITAR LA CRISTALIZACIÓN TOTAL O PARCIAL DEL ACEITE DE OLIVA DURANTE SU CONSERVACIÓN A BAJA TEMPERATURA

INVENTORES: Femenia, A; Adrover-Obrador, S; Simal, S; Rossello, C.

Nº de solicitud: P201130850

País de Prioridad: ESPAÑA

Fecha de Prioridad: 25/05/2011

Nº Patente: P25827ES00

Entidad Titular: Universidad de las Islas Baleares

Artículos científicos enviados para su publicación a revistas indexadas en el Journal of Citation Reports (JCR)

- Storage of Extra Virgin Olive Oil: Focus on Diglycerides. Ayyad, Z., Valli, E., Bendini, A., Adrover-Obrador, S., Femenia, A., Gallina-Toschi, T. *Submitted to Italian Journal of Food Science.*
- Differentiation of Balearic vineyards according to their agroclimatic fingerprint and grape characteristics by using Discriminant Analysis. González-Centeno, M.C., Adrover-Obrador, S., Simal, S., Frau, M., Femenia, A., Rosselló, C. *Submitted to Agronomy for Sustainable Development.*

Artículos científicos en proceso de elaboración

- Influence of storage conditions on the physicochemical and organoleptic properties of extra virgin olive oil. Adrover-Obrador, S., Garau, M.C., Rosselló, C., Femenia, A. (*en preparación para la revista Journal of Agricultural and Food Chemistry*).
- Optimization of ultrasound-assisted extraction of antioxidant compounds from olive oil mill waste. Adrover-Obrador, S., Garau, M.C., Rosselló, C., Femenia, A. (*en preparación para la revista Ultrasonics Sonochemistry*).
- Influence of fruit ripening on physic-chemical and organoleptic properties of *arbequina*, *picual* and *empeltre* olive oils. Adrover-Obrador, S., Garau, C. De Lecce, G., Bendini, A., Femenia, A. (*en preparación para la revista Journal of Agricultural and Food Chemistry*).

