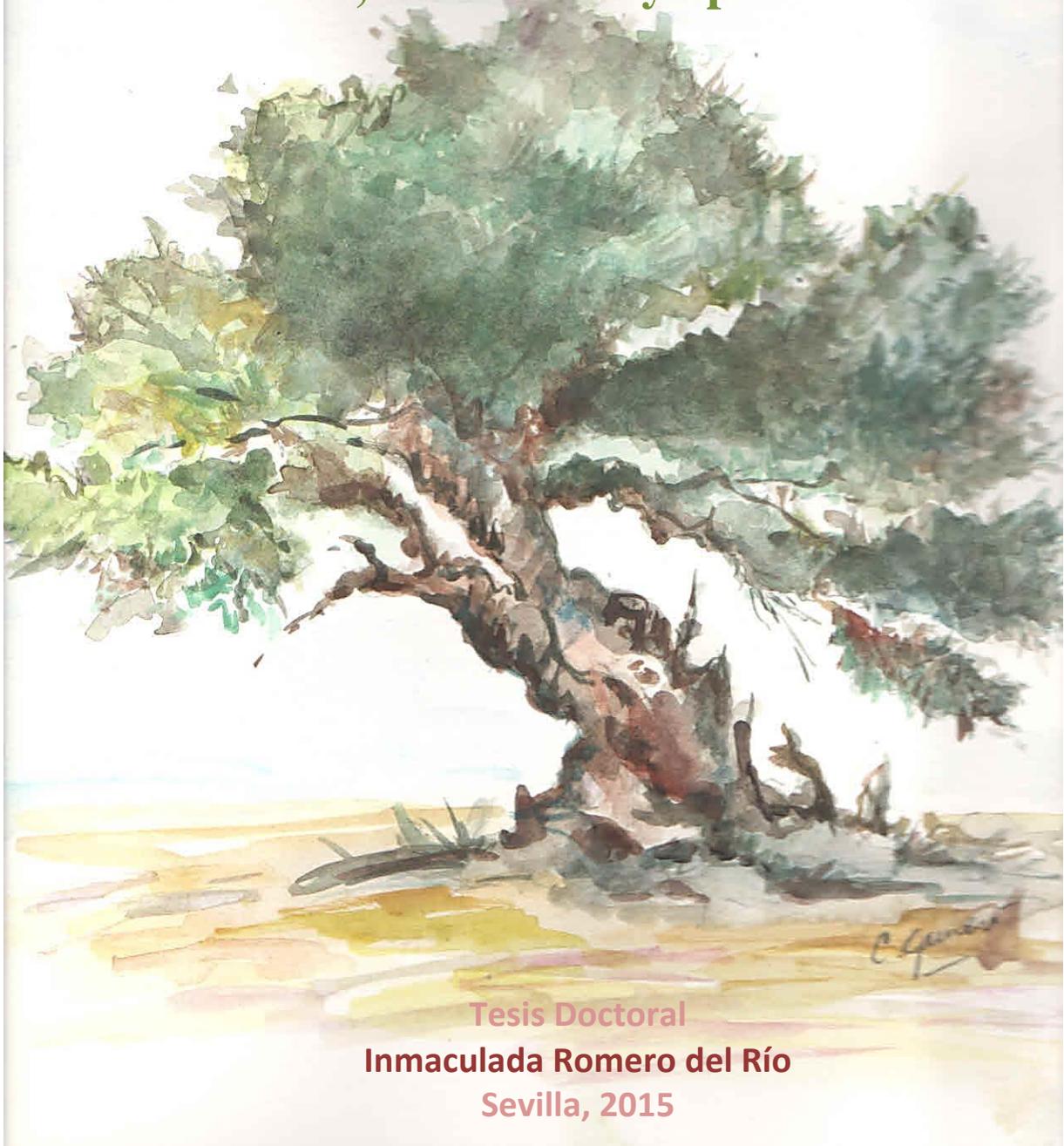




**Evaluación de indicadores
de la calidad del aceite de oliva virgen:
fortalezas, debilidades y oportunidades**



**Tesis Doctoral
Inmaculada Romero del Río
Sevilla, 2015**

Instituto de la Grasa
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(C.S.I.C.)



TESIS DOCTORAL

Evaluación de indicadores
de la calidad del aceite de oliva virgen:
fortalezas, debilidades y oportunidades

Inmaculada Romero del Río

Diciembre, 2015

Sevilla



Instituto de la Grasa
Consejo Superior de Investigaciones Científicas
(C.S.I.C.)

Departamento de Química Analítica
Facultad de Farmacia
Universidad de Sevilla



**“Evaluación de indicadores de la calidad del aceite de oliva
virgen: fortalezas, debilidades y oportunidades”**

Memoria que presenta

Dña. Inmaculada Romero del Río

para optar al grado de doctor por la Universidad de Sevilla
dentro del Programa de Doctorado de *Química*.

Departamento de Química Analítica

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla



D. Diego Luís García González, Contratado Ramón y Cajal del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (Instituto de la Grasa), **D. Ramón Aparicio López**, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C.) y **Dña. María Teresa Morales Millán**, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Sevilla y Doctora vinculada al Instituto de la Grasa (C.S.I.C.).

INFORMAN: Que el presente trabajo ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Caracterización y Calidad de los Alimentos del Instituto de la Grasa (C.S.I.C.), dentro del Programa de Doctorado de Química.

Y para que conste, se expide y firma el presente certificado en Sevilla, Diciembre de 2015.

Fdo. Dr. Diego Luís García González

Fdo. Dr. Ramón Aparicio López

Fdo. Dra. María Teresa Morales Millán



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que de una u otra forma han contribuido a la realización de este trabajo.

En primer lugar al Dr. Diego Luís García González por su gran dedicación e interés, su paciencia, ánimo incondicional, y por su guía y consejo en la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Ramón Aparicio por la dirección y por el apoyo en todas las facetas de este trabajo, sin el cual no hubiera sido posible.

A la Dra. María Teresa Morales por haberme introducido en el mundo de la investigación, por la dedicación y el interés mostrado en la realización de este trabajo. Por las muestras de cariño que me ha dado durante todo este tiempo y sus enseñanzas, tanto en el plano científico como personal.

Al Dr. Vincent Baeten por darme la oportunidad de trabajar en su grupo y conocer los últimos avances en espectroscopia infrarroja y fluorescencia. También al Dr. Juan Antonio Fernández Pierna por la supervisión y toda su ayuda en mi estancia en Bélgica.

A los profesores del Máster en Estudios Avanzados en Química, por iniciarme en el mundo de la investigación, y en general a todo el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Farmacia por mostrar interés en el desarrollo de este trabajo.

Gracias al personal del Instituto de la Grasa por permitir la realización de este trabajo, en especial al Dr. Manuel León Camacho por la ayuda técnica prestada.

A Celia Oliver, por su disposición a prestar ayuda en todo momento, por sus palabras de ánimo, por ser una buena compañera, así como por su amistad.

A mis compañeros Noelia Tena y Ramón Aparicio Ruiz, por su ayuda y apoyo.

Finalmente, de forma muy especial, a Daniel, a mi familia y a mis amigas, por seguir con interés todo el proceso de realización del trabajo, por animarme y creer en mí. Por estar a mi lado en todo momento.

A Daniel y a mi familia

ÍNDICE

ÍNDICE	Página
ABREVIATURAS	1
ABSTRACT	3
RESUMEN	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. El aceite de oliva.	6
1.2. Importancia económica del aceite de oliva a nivel mundial.	6
1.3. Obtención del aceite de oliva virgen.	8
1.4. Definición y clasificación de los aceites de oliva vírgenes.	9
1.5. Composición del aceite de oliva virgen.	11
1.6. Calidad del aceite de oliva virgen.	11
1.6.1. Compuestos volátiles en aceite de oliva virgen.	15
1.6.1.1. Formación de compuestos volátiles.	16
1.6.1.2. Métodos de análisis de compuestos volátiles.	20
1.6.1.2.1. Análisis sensorial.	20
1.6.1.2.2. Análisis químico.	21
1.6.1.3. Estado del arte en la relación entre compuestos volátiles y calidad del aceite de oliva virgen.	27
1.6.2. Compuestos fenólicos en aceite de oliva virgen.	36
1.6.2.1. Formación de compuestos fenólicos.	36
1.6.2.2. Métodos de análisis de compuestos fenólicos.	38
1.6.2.3. Estado del arte en la relación entre compuestos fenólicos y calidad del aceite de oliva virgen.	41
1.6.3. Clorofilas y derivados en el aceite de oliva virgen.	43
1.6.3.1. Formación de las clorofilas y derivados.	43
1.6.3.2. Métodos de análisis de clorofilas y sus derivados.	44
1.6.3.3. Estado del arte en la relación entre clorofila y derivados y calidad del aceite de oliva virgen.	46
1.6.4. Ésteres alquílicos en aceite de oliva virgen.	47
1.6.4.1. Formación de ésteres alquílicos en aceite de oliva virgen.	47
1.6.4.2. Métodos de análisis de ésteres alquílicos.	48
1.6.4.3. Estado del arte en la relación entre ésteres alquílicos y calidad del aceite de oliva virgen.	49
1.6.5. Diacilgliceroles en aceite de oliva virgen.	50
1.6.5.1. Formación diacilgliceroles.	50
1.6.5.2. Métodos de análisis de diacilgliceroles.	51
1.6.5.3. Estado del arte en la relación entre diacilgliceroles y calidad del aceite de oliva virgen.	52
1.7. Estudio de las normativas vigentes del aceite de oliva virgen.	53
2. OBJETIVOS	58
3. MATERIALES Y MÉTODOS	61
3.1. Muestras y Reactivos.	62
3.1.1. Muestras.	62

	Página
3.1.1.1. Muestras ensayo aceitunas congeladas.	64
3.1.2. Reactivos.	65
3.1.2.1. Análisis de compuestos volátiles.	65
3.1.2.2. Análisis de compuestos fenólicos.	65
3.1.2.3. Análisis de clorofilas y derivados.	65
3.1.2.4. Análisis de ésteres alquílicos.	66
3.1.2.5. Análisis de diacilgliceroles.	67
3.2. Materiales, instrumentación y procedimientos analíticos.	67
3.2.1. Análisis de compuestos volátiles.	67
3.2.1.1. Materiales.	67
3.2.1.2. Aparatos.	67
3.2.1.3. Instrumentación.	69
3.2.1.4. Procedimientos analíticos.	71
3.2.1.4.2. Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)	71
3.2.1.4.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. (GCMS)	72
3.2.1.4.3. Cromatografía de gases bidimensional acoplada a espectrometría de masas (GC×GCMS).	73
3.2.1.4.4. Olfatometría acoplada a cromatografía de gases (GC-O).	73
3.2.2. Análisis de compuestos fenólicos.	74
3.2.2.1. Materiales.	74
3.2.2.2. Aparatos.	74
3.2.2.3. Instrumentación.	74
3.2.2.4. Procedimiento analítico.	74
3.2.2.4.1. Cromatografía líquida con detector de matriz de diodos (HPLC-DAD).	75
3.2.3. Análisis de clorofilas y derivados.	76
3.2.3.1. Materiales.	76
3.2.3.2. Aparatos.	76
3.2.3.3. Instrumentación.	77
3.2.3.4. Procedimiento analítico.	77
3.2.3.4.1. Cromatografía líquida con detector de matriz de diodos (HPLC-DAD).	77
3.2.3.4.2. Determinación cuantitativa.	77
3.2.4. Análisis de ésteres alquílicos.	78
3.2.4.1. Materiales.	78
3.2.4.2. Aparatos.	79
3.2.4.3. Instrumentación.	79
3.2.4.4. Procedimiento analítico.	79
3.2.4.4.1. Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID).	79
3.2.5. Análisis de diacilgliceroles.	80
3.2.5.1. Materiales.	80
3.2.5.2. Aparatos.	80

	Página
3.2.5.3. Instrumentación.	81
3.2.5.4. Procedimiento analítico.	81
3.2.5.4.1. Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID).	81
3.3 Tratamiento matemático de los datos.	81
3.3.1. Algoritmos univariantes.	82
3.3.2. Procedimientos multivariantes.	82
3.3.2.1. Análisis de componentes principales (PCA).	82
3.3.2.2. Análisis discriminante lineal por pasos (SLDA).	83
3.3.2.3. Análisis de agrupamiento (cluster).	83
3.3.2.4. Análisis de la varianza (ANOVA).	84
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
4.1. Compuestos volátiles.	86
4.1.1. Puesta a punto y validación del método analítico basado en GCMS y comparación con el método basado en GC-FID.	86
4.1.1.1. Estudio de los espectros de masas de compuestos volátiles.	87
4.1.1.2. Validación del método analítico.	91
4.1.1.3. Parámetros de calidad analíticos.	92
4.1.1.3.1. Precisión.	92
4.1.1.3.2. Linealidad.	95
4.1.1.3.3. Límite de detección y cuantificación.	100
4.1.1.3.4. Intervalo dinámico de trabajo.	101
4.1.1.3.5. Exactitud.	101
4.1.1.3.6. Selectividad.	104
4.1.1.3.7. Sensibilidad.	106
4.1.2. Evaluación de defectos sensoriales en aceite de oliva virgen mediante GCMS y GC-FID.	106
4.2. Compuestos fenólicos.	119
4.2.1. Validación del método.	122
4.2.1.1. Precisión.	122
4.2.1.2. Linealidad.	123
4.2.1.3. Límite de detección y cuantificación.	123
4.2.1.4. Intervalo dinámico de trabajo.	124
4.2.1.5. Exactitud.	124
4.2.1.6. Sensibilidad.	124
4.2.2. Compuestos fenólicos en aceite de oliva virgen.	125
4.3. Caracterización del defecto helada.	132
4.4. Clorofilas y derivados.	169
4.4.1. Validación del método.	170
4.4.1.1. Precisión.	171
4.4.1.2. Linealidad y sensibilidad.	171
4.4.1.3. Límite de detección y cuantificación.	172
4.4.1.4. Intervalo dinámico de trabajo.	172
4.4.2. Pigmentos clorofílicos en aceite de oliva virgen.	172

	Página
4.5. Ésteres alquílicos.	179
4.6. Diacilgliceroles.	196
4.6.1. Validación del método.	197
4.6.2. Diacilgliceroles en el aceite de oliva virgen.	198
5. CONCLUSIONS/ CONCLUSIONES	214
6. BIBLIOGRAFÍA	219
7. ANEXO	244

ÍNDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1.1. Esquema del proceso de elaboración del aceite de oliva y los puntos críticos que afectan a la calidad.	9
Figura 1.2. Interacción entre las distintas facetas de calidad y seguridad de los alimentos.	12
Figura 1.3. Árbol de decisiones para la comprobación de la conformidad de una muestra de aceite de oliva virgen extra con la categoría declarada. Fuente: CE, 2013.	14
Figura 1.4. Biogénesis de los compuestos volátiles en aceite de oliva virgen.	17
Figura 1.5. Esquema de la ruta de la lipoxigenasa (LOX).	19
Figura 1.6. Esquema del análisis de compuestos volátiles en el aceite de oliva.	21
Figura 1.7. Esquema de la extracción mediante SPME.	22
Figura 1.8. Perfiles de compuestos volátiles de aceites de oliva vírgenes con diferentes atributos sensoriales. Nota; EVOO, aceite de oliva virgen extra.	30
Figura 1.9. Contenido total de volátiles correspondientes a la media elaborada de muestras de aceite de oliva virgen extra (EVOO) y cinco muestras estándares de defectos sensoriales (R, rancio; Av, avinado-avinagrado; A, atrojado-borras; M, moho-humedad; MH, madera-humedad).	30
Figura 1.10. Depósitos de almacenamiento de las aceitunas antes de la molienda.	32
Figura 1.11. Rueda sensorial que describe los principales defectos sensoriales del aceite de oliva.	36
Figura 1.12. Rutas biosintéticas implicadas en la formación de compuestos fenólicos.	37
Figura 1.13. Esquema de formación de los derivados clorofílicos formados por la pérdida del ion Mg^{2+} y calor.	44
Figura 1.14. Espectros de absorción de clorofila <i>a</i> , feofitina <i>a</i> y pirofeofitina <i>a</i> .	45
Figura 2.1. Plan de trabajo para el logro de los objetivos.	60
Figura 3.1. Abencor®. (A) Molino de martillos, (B) termobatidora, (C) centrífuga.	68
Figura 3.2. Muestreador automático CombiPal, cromatógrafo Varian 3900 GC y generador de hidrógeno Clan Hidrógeno AD-260.	68
Figura 3.3. Dispositivo de espacio de cabeza estático para pre-concentración manual de los compuestos volátiles con fibra SPME.	69
Figura 3.4. Esquema del acoplamiento del sistema de detección olfatométrica y cromatógrafo de gases.	70
Figura 3.5. Cromatógrafo de gases 7820A Agilent Technologies acoplado a espectrómetro de masas 5975 MSD Agilent Technologies con inyector split-splitless adaptado para SPME.	70
Figura 3.6. Cromatógrafo de gases bidimensional 450GC×450GC Bruker acoplado a espectrómetro de masas 300MS Bruker con inyector split-splitless adaptado para SPME y muestreador automático CombiPal.	71
Figura 3.7. Cromatógrafo HPLC LaChrom Elite de Hitachi.	75
Figura 3.8. Cromatógrafo de gases 5890 Series II Hewlett-Packard con inyector on-column.	79

	Página
Figura 4.1. Espectro de masas del ácido butanoico, etanol y E-2-hexanal.	89
Figura 4.2. Espectro de masas del octanal y 3-pentanona.	90
Figura 4.3. Espectro de masas del acetato de etilo, octano y tolueno.	91
Figura 4.4. (A) Recta de calibrado del heptanal para el intervalo de concentraciones 0,10-15,00 mg/kg estudiado en GCMS. (B) Recta de calibrado de la 2-heptanona para el intervalo de concentraciones 0,10-15,00 mg/kg estudiado en GCMS.	98
Figura 4.5. Recta de calibrado de la 2-heptanona para el intervalo de concentraciones 0,10-3,00 mg/kg estudiado en GCMS.	99
Figura 4.6. Cromatograma del hexanal obtenido mediante GC×GCMS y GCMS.	104
Figura 4.7. Ejemplos de resolución de picos cromatográficos, con valores de resolución (R) igual (A), mayor (B) y menor (C) que 1,5.	105
Figura 4.8. Cromatograma de los compuestos volátiles mediante SPME-GCMS de un LVOO (A) y un EVOO (B). Los códigos se muestran en la Tabla 4.5.	108
Figura 4.9. Análisis de componentes principales de las 22 muestras comerciales de aceites de oliva vírgenes extra (EVOO) y aceites de oliva vírgenes caracterizados con defectos sensoriales helada (H), avinado-avinagrado (Av), moho-humedad-tierra mojada (M), madera-humedad (MH) y atrojado-borras (A) mediante GCMS.	111
Figura 4.10. Análisis de componentes principales de las 22 muestras comerciales de aceites de oliva vírgenes extra (EVOO) y aceites de oliva vírgenes caracterizados con defectos sensoriales helada (H), avinado-avinagrado (Av), moho-humedad-tierra mojada (M), madera-humedad (MH) y atrojado-borras (A) mediante GC-FID.	112
Figura 4.11. Análisis de componentes principales de 22 muestras de aceites de oliva vírgenes extra (EVOO) y aceites de oliva vírgenes caracterizados con defectos sensoriales helada (H), avinado-avinagrado (Av), moho-humedad-tierra mojada (M), madera-humedad (MH) y atrojado-borras (A) teniendo en cuenta los volátiles con OAV >1.	116
Figura 4.12. Análisis de componentes principales de las 38 muestras de aceites de oliva vírgenes extra (EVOO) y aceites de oliva vírgenes caracterizados con defectos sensoriales helada (H), avinado-avinagrado (Av), moho-humedad-tierra mojada (M), madera-humedad (MH) y atrojado-borras (A) teniendo en cuenta los volátiles con OAV >1.	117
Figura 4.13. Cromatogramas a $\lambda = 280$ nm (A), 235 nm (B) y 335 nm (C) de compuestos fenólicos identificados en una muestra de EVOO. Los códigos se muestran en la Tabla 4.6.	121
Figura 4.14. (A) Resultado de un análisis de agrupamiento arborescente de las concentraciones de los compuestos fenólicos de las 22 muestras comerciales analizadas. (B) Análisis de componentes principales de aceites de oliva extra vírgenes (EVOO) y aceites caracterizados con los defectos sensoriales helada (H), avinado-avinagrado (Av), moho-humedad-tierra mojada (M), madera-humedad (MH) y atrojado-borras (A).	130

	Página
Figura 4.15. Análisis de componentes principales de las 22 muestras de aceites caracterizados con los defectos sensoriales helada (H), avinado-avinagrado (Av), moho-humedad-tierra mojada (M), madera-humedad (MH) y atrojado-borras (A) según la concentración de fenoles.	131
Figura 4.32. Cromatograma de pigmentos clorofílicos estudiados en las muestras de EVOO.	170
Figura 4.33. Representación de la concentración de clorofila a (A), feofitina a (B) y pirofeofitina a (C) de aceites caracterizados con los defectos sensoriales helada (H), avinado-avinagrado (Av), moho-humedad-tierra mojada (M), madera-humedad (MH) y atrojado-borras (A) y sin defectos (EVOO).	176
Figura 4.41. Cromatograma de los isómeros de diacilgliceroles identificados en una muestra de EVOO. Nota: IS, patrón interno; O: oleico; P: palmítico. Los códigos se muestran en la Tabla 4.34.	197
Figura 4.42. Diagrama de barras del contenido en porcentaje de 1,2-DAG de las 38 muestras comerciales analizadas. La línea discontinua corresponde al contenido máximo de 1,2-DAG según la normativa DGE (2012) y la continua al contenido máximo según las normativas AS (2011), CDFA (2014) y SANS (2013).	199
Figura 4.43. Diagrama de barras del contenido en porcentaje de 1,2-DAG y 1,3-DAG de los defectos fermentativos y no fermentativos.	200
Figura 4.44. Diagrama de barras de la razón $\sum 1,3 / \sum 1,2$ de las muestras con defectos y las muestras de EVOO.	201

ÍNDICE DE TABLAS	Página
Tabla 1.1. Producción (x 1,000 toneladas) de aceite de oliva por países productores. (Fuente: Consejo Oleícola Internacional, 2014).	6
Tabla 1.2. Exportación (x 1,000 toneladas) de aceite de oliva por países productores europeos. (Fuente: Consejo Oleícola Internacional, 2014).	7
Tabla 1.3. Importación (x 1,000 toneladas) de aceite de oliva por países productores (Fuente: Consejo Oleícola Internacional, 2014).	8
Tabla 1.4. Categorías de aceites de oliva virgen definidos por la Norma de comercialización del COI (COI, 2015a) y la CE (CE, 2013).	10
Tabla 1.5. Compuestos volátiles identificados en diferentes tipos de aceites de oliva virgen.	15
Tabla 1.6. Causas y etapas de desarrollo de algunos defectos sensoriales del aceite de oliva virgen (COI, 2015a).	29
Tabla 1.7. Compuestos responsables de los principales defectos sensoriales y descriptores sensoriales.	34
Tabla 1.8. Compuestos fenólicos en aceite de oliva virgen.	37
Tabla 1.9. Criterios de calidad establecidos por diferentes normativas para aceites de oliva vírgenes extra.	55
Tabla 3.1. Variedad, categoría y defectos sensoriales de las muestras procedentes de diferentes cooperativas usadas en el estudio de la	62
Tabla 3.2. Variedad, categoría y defectos sensoriales de las muestras procedentes de diferentes productores.	63
Tabla 3.3. Variedad, categoría y origen geográfico de las muestras caracterizadas con el defecto helada.	64
Tabla 3.4. Características químicas, sensoriales y de seguridad de los compuestos volátiles.	66
Tabla 3.5. Gradiente de elución de los disolventes A y B.	76
Tabla 4.1. Repetibilidad, precisión intermedia y selectividad del método en GCMS y GC-FID.	94
Tabla 4.2. Resumen de los parámetros de calidad del método GCMS.	96
Tabla 4.3. Resumen de los parámetros de calidad del método GC-FID.	97
Tabla 4.4. Categorías, atributos sensoriales y parámetros de calidad de aceites de oliva vírgenes.	107
Tabla 4.5. Concentraciones (media \pm desviación estándar) (mg/kg) de los compuestos volátiles en las muestras de aceite de oliva virgen con y sin defectos sensoriales.	109
Tabla 4.6. Compuestos responsables de los principales defectos sensoriales, la concentración (mg/kg), el umbral de olor (mg/kg) y OAV (mg/kg) de cada uno de los compuestos volátiles.	113
Tabla 4.7. Compuestos fenólicos identificados en aceite de oliva virgen en los cromatogramas obtenidos a $\lambda = 280$ y 335 nm.	120
Tabla 4.8. Repetibilidad, precisión intermedia y recuperación del método.	122
Tabla 4.9. Resumen de los parámetros de calidad analíticos del método basado en HPLC-DAD.	123

	Página
Tabla 4.10. Concentraciones (media \pm desviación estándar) (mg/kg) de los compuestos fenólicos en las muestras comerciales de aceite de oliva virgen agrupadas en defectos.	126
Tabla 4.19. Repetibilidad y precisión intermedia del método.	171
Tabla 4.20. Resumen de los valores de linealidad y sensibilidad del método.	172
Tabla 4.21. Concentración (media \pm desviación estándar) (mg/kg) de clorofila a, feofitina a y pirofeofitina a, y el porcentaje en área de pirofeofitina a en las muestras comerciales con defectos sensoriales.	173
Tabla 4.22. Concentraciones (media \pm desviación estándar ¹) (mg/kg) de clorofila a, feofitina a y pirofeofitina a, y porcentaje de área de pirofeofitina a de las muestras de EVOO después de ser almacenadas durante cuatro años.	177
Tabla 4.34. Diacilgliceroles identificados en muestras de aceite de oliva virgen.	197
Tabla 4.35. Repetibilidad y precisión intermedia del método.	198
Tabla 4.36. Porcentaje de área (media \pm desviación estándar) de 1,2 y 1,3-DAG, porcentaje total de diacilgliceroles (peso/peso) (media \pm desviación estándar), y la razón $\sum 1,3/\sum 1,2$ en las muestras comerciales.	199

ABREVIATURAS

1,2-OO: 1,2-Dioleoil-glicerol.

1,2-OP: 1,2-Oleoil-palmitoil-glicerol.

1,3-OO: 1,3-Dioleoil-glicerol.

1,3-OP: 1,3-Oleoil-palmitoil-glicerol.

3,4-DHPEA-AC: Acetato de hidroxitirosol.

3,4-DHPEA-EA: Forma aldehídica e hidroxílica de aglucona de oleuropeína.

3,4-DHPEA-EDA: Forma dialdehídica de descarboximetil aglucona de oleuropeína.

AAT: Alcohol acetil transferasa.

ADH: Alcohol deshidrogenasa.

AEDA: Aroma Extract Dilution Analysis.

ANOVA: Análisis de la varianza.

C_{ap}: Concentración aparente.

CHARM: Combined Hedonic Aroma Response Measurements.

CO: Grupo carbonilo.

COI: Consejo Oleícola Internacional.

C_{ref}: Concentración de referencia.

DAD: Detector de matriz de diodos.

DAG: Diacilgliceroles.

DHS: Espacio de cabeza dinámico.

DMF: N,N-dimetilformamida.

DVD/CAR/PDMS: Divinilbenceno-carboxeno-polidimetilsiloxano.

EFSA: European Food Safety Authority.

EVOO: Aceite de oliva virgen extra.

FA: Análisis factorial.

FAAEs: Ésteres alquílicos de ácidos grasos.

FAEEs: Ésteres etílicos.

FAMEs: Ésteres metílicos.

FD: Factor de dilución.

fMRI: Functional Magnetic Resonance Imaging.

GC×GCMS: Cromatografía bidimensional acoplada espectrometría de masas.

GC-FID: Cromatografía de gases con detector de ionización de llamas.

GCMS: Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas.

GC-O: Olfatometría acoplada a la cromatografía de gases.

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución.

HS: Espacio de cabeza estático

Hty: Hidroxitirosol.

LC: Cromatografía líquida.

LLE: Extracción líquido-líquido.

LOD: Límite de detección.

LOQ: Límite de cuantificación.

LOX: Lipoxigenasa.

LVOO: Aceite de oliva virgen lampante.

MF%: Frecuencia modificada.

OAV: Odour Activity Value.

OVOO: Aceite de oliva virgen ordinario.

PAL: Fenilalanina amonioliasa.

PCA: Análisis de componentes principales.

PEM: Electrolito polimérico de estado sólido.

***p*-HPEA-AC:** Acetato de Tirosol.

***p*-HPEA-EA:** Forma aldehídica e hidroxílica de aglucona de ligustrósido.

***p*-HPEA-EDA:** Forma dialdehídica de descarboximetil aglucona de ligustrósido.

PPO: Polifenol oxidasa.

R²aj: Coeficiente de regresión ajustada.

RMN: Resonancia magnética nuclear.

RSD: Desviación estándar relativa.

SLDA: Análisis discriminante lineal por pasos.

SPE: Extracción en fase sólida.

SPME: Microextracción en fase sólida.

TAG: Triglicéridos.

Ty: Tirosol.

UHPLC: Cromatografía líquida de alto rendimiento.

UV: Ultravioleta.

VOO: Aceite de oliva virgen.

W_R: Intervalo dinámico de trabajo.

ABSTRACT

The quality of virgin olive oil (VOO) is evaluated by physical-chemical parameters together with a sensory assessment carried out by trained assessors, the so-called “panel test”. Panel test is the method recognized by international organizations to qualify VOOs from organoleptic aspects. However, panel test is not exempt of some disadvantages like the subjectivity of panelists evaluating the samples, the time of analysis and its cost. For these reasons, new parameters have being suggested for evaluating VOO quality although some of them have a casual relationship with the sensory quality. Therefore, the information provided by each parameter about sensory quality has to be carefully analyzed to select only relevant information that complements panel test.

The main objective of this thesis is to evaluate, by means of different analytical strategies, the validity of different chemical compounds (volatiles, phenols, alkyl esters, diacylglycerols and pyropheophytin) as trustworthy indicators of VOO sensory quality. Thus, the study emphasizes the weaknesses, strengths and opportunities of each one of the compounds from their applicability to the classification of VOO samples in their correct categories.

Different analytical methodologies, based on spectroscopic and chromatographic techniques (GC, HPLC), have been used to quantify the different markers, using several sample preparation procedures such as solid phase extraction and microextraction, and column chromatography. Other methodologies (i.e. GC×GC chromatography and GC-olfactometry) have been used to go in depth in the chemical characterization of some sensory defects.

The relationship between the described chemical compounds and the sensory quality has been evaluated, and three different behaviors that clarify their reliable utility from the point of view of quality have been detected. Thus, flavor compounds (volatiles and phenols) are directly responsible for VOO sensory descriptors; it means that they have a causal relation with the sensory quality. They could be used to give support or complement or even replace the panel test. In the case of alkyl esters and diacylglycerols, it has been pointed out the existence of an apparently causal relation, considering that these compounds are associated with VOO sensory quality but they are not directly responsible for their sensory descriptors; in fact, they are related to fermentative processes but they are not responsible for the aroma originated from these processes. Therefore, the information that they provide may be useful in evaluating only some aspects of VOO quality. Finally, pyropheophytin a (PPP) has a casual relation with sensory quality because it is not responsible for sensory descriptors of VOO aroma though a mathematical correlation with VOO quality categories has been described. PPP is not a marker to assess VOO sensory quality but VOO freshness on the basis of chemical and mathematical backgrounds. In conclusion, compounds that have a causal relation are the only ones that provide objective information about VOO sensory quality, because they are the stimulus of the sensations perceived by the consumers.

RESUMEN

La calidad del aceite de oliva virgen (VOO) se evalúa, además de por parámetros físico-químicos, a través de análisis sensorial mediante panel de cata, siendo éste el único método oficial reconocido por las normativas internacionales vigentes para evaluar la calidad sensorial. No obstante, la utilización del panel de cata presenta ciertos inconvenientes como la subjetividad de los panelistas, el tiempo de análisis y su coste. Por esas razones, se han sugerido nuevos parámetros para la evaluación de la calidad del aceite de oliva aunque algunos de ellos presenten una relación meramente casual con la calidad sensorial. Por todo ello, existe la necesidad de conocer el tipo de información que aporta cada uno de los parámetros sobre el aspecto sensorial de la calidad, con el fin de establecer procedimientos que permitan evaluar la calidad sensorial mediante información objetiva que complemente la aportada por el panel de cata.

El objetivo principal de esta tesis consiste en evaluar, mediante la implementación de diferentes estrategias analíticas, la validez de distintos marcadores del aceite de oliva virgen (compuestos volátiles, compuestos fenólicos, ésteres alquílicos, diacilgliceroles y pirofeofitinas) como verdaderos indicadores de calidad, estableciendo en cada caso su utilidad real y haciendo especial hincapié en las debilidades, fortalezas y oportunidades de cada uno de ellos.

Se han utilizado diferentes metodologías analíticas basadas en técnicas espectroscópicas y cromatográficas (GC, HPLC) para llevar a cabo la determinación de los distintos marcadores, utilizando varios procedimientos de preparación de muestra, como extracción y microextracción en fase sólida o cromatografía en columna. Asimismo se han utilizado otras metodologías como la cromatografía de gases bidimensional y la olfatometría para profundizar en la caracterización de algunos defectos sensoriales.

Se ha evaluado la relación de los indicadores estudiados con la calidad sensorial, y se han observado tres comportamientos diferentes que clarifican la utilidad real de estos marcadores desde el punto de vista de la calidad. Los compuestos de flavor, volátiles y fenoles, son directamente responsables de los atributos sensoriales de los aceites, por lo que presentan una relación causal con el aspecto sensorial de la calidad del aceite y podrían ser utilizados para dar soporte, complementar o incluso reemplazar al análisis sensorial mediante panel de cata. Por otro lado, en el caso de ésteres alquílicos y diacilgliceroles, se ha puesto de manifiesto la existencia de un tipo de relación aparentemente causal, ya que estos indicadores muestran relación con la calidad sensorial del aceite de oliva virgen, pero no son los responsables directos de la producción de los atributos sensoriales. Tanto ésteres alquílicos como diacilgliceroles están relacionados con procesos fermentativos, pero no son los responsables de la percepción de defectos sensoriales originados por estos procesos, por tanto, la información que aportan puede ser útil para evaluar sólo algunos aspectos de la calidad. Por último, las pirofeofitinas no son buenos marcadores para evaluar la calidad sensorial sino la frescura del VOO en base a evidencias químicas y matemáticas. En conclusión, los compuestos que poseen una relación causal son los únicos que proporcionan información objetiva sobre la calidad sensorial del aceite, debido a que actúan como estímulos de las sensaciones percibidas por los consumidores.



Introducción

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El aceite de oliva

Según el Consejo Oleícola Internacional (COI) el aceite de oliva “es el aceite procedente del fruto de olivo (*Olea europea Link*), con exclusión de los aceites obtenidos por disolventes o por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza”. Este aceite se puede comercializar bajo distintas denominaciones, siendo el aceite de oliva virgen el aceite obtenido a partir del fruto exclusivamente por procedimientos mecánicos u otros medios físicos, en condiciones térmicas que no produzcan la alteración del aceite, sin más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado (COI, 2015a).

1.2 Importancia económica del aceite de oliva a nivel mundial

El aceite de oliva virgen posee unas propiedades saludables y organolépticas que incrementan su valor comercial. Cerca del 98,7% de los olivos plantados en el mundo se encuentran en la cuenca del Mediterráneo. El otro 1,3% se distribuye básicamente en países del continente americano como Estados Unidos, Argentina o Chile, y Australia (COI, 2014).

La producción mundial media de aceite de oliva virgen en los últimos seis años (cosecha 2009-2010 a 2014-2015) fue de 1.794.200 toneladas, siendo los países miembros de la Unión Europea responsables de más del 72% de dicha producción (COI, 2014). En la Tabla 1.1 se muestra la información correspondiente a los principales productores; siendo España el primer productor mundial con una cuota mínima del 61%.

Tabla 1.1. Producción (x 1,000 toneladas) de aceite de oliva por países productores. (Fuente: Consejo Oleícola Internacional, 2014).

País productor	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14 (prov.) ¹	2014/15 (prev.) ²
España	1.401,5	1.391,9	1.615,0	618,2	1.775,8	825,7
Italia	5,7	6,1	3,2	5,1	4,9	5,0
Grecia	320,0	301,0	294,6	357,9	131,9	300,0
Túnez	150,0	120,0	182,0	220,0	70,0	260,0
Marruecos	140,0	130,0	120,0	100,0	120,0	110,0
Turquía	147,0	160,0	191,0	195,0	190,0	160,0

Nota: ¹, provisional; ², previsto.

El incremento de la producción, fundamentalmente en España y Túnez, junto con países productores fuera de la cuenca mediterránea, ha venido acompañado de un incremento constante del consumo, con una media del 20% de incremento cada década desde los años 60 hasta la actualidad. Este incremento fue mayor en la década de los 1990s por la demanda de Estados Unidos, Australia y Canadá (COI, 2014).

Aproximadamente el 78% del consumo mundial de aceite corresponde a los países productores, siendo Italia el primer país consumidor (38,5%) seguido de España (28,4%). Sin embargo, el mayor incremento del consumo del aceite de oliva se está produciendo en los países no productores (COI, 2014), y en consecuencia, los países productores europeos se han convertido también en exportadores de aceite de oliva. La Tabla 1.2 muestra la información correspondiente a la exportación de los países productores europeos.

Tabla 1.2. Exportación (x 1,000 toneladas) de aceite de oliva por países productores europeos. (Fuente: Consejo Oleícola Internacional, 2014).

País exportador	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14 (prov.) ¹	2014/15 (prev.) ²
España	196,5	196,2	248,0	197,6	310,0	225,0
Italia	1,4	1,8	1,9	1,7	2,0	2,5
Portugal	12,0	13,0	15,5	18,0	3,7	11,6
Grecia	195,1	223,5	233,2	217,6	245,0	243,7
Francia	35,8	42,7	51,6	50,5	54,3	53,3

Nota: ¹, provisional; ², previsto.

Fuera de las zonas tradicionalmente productoras situadas en la cuenca del Mediterráneo, destacan las importaciones a Estados Unidos, Australia, Japón, Canadá y Brasil. Estados Unidos, que es el primer país importador, como muestra la Tabla 1.3, también es productor con olivares principalmente localizados en California. Las importaciones han aumentado de forma significativa desde 1982, pasando de 29 millones de kg a 300 millones de kg en 2013 (COI, 2014); estas importaciones provienen mayoritariamente de los productores europeos.

Tabla 1.3. Importación (x 1,000 toneladas) de aceite de oliva por países productores (Fuente: Consejo Oleícola Internacional, 2014).

País importador	2009/10	2010/11	2011/12	2012/13	2013/14 (prov.) ¹	2014/15 (prev.) ²
Australia	35,0	32,0	31,5	28,5	28,0	28,0
Brasil	50,5	61,5	68,0	73,0	72,5	72,0
Canadá	37,0	40,0	39,5	37,5	40,5	37,5
Japón	40,5	35,5	43,0	51,0	54,0	51,0
EEUU	258,0	275,0	300,0	288,0	302,5	290,0

Nota: ¹, provisional; ², previsto.

1.3 Obtención del aceite de oliva virgen

La obtención del aceite de oliva virgen consta de tres fases fundamentales: la molienda, el batido y la separación de fases, generalmente mediante centrifugación. El objetivo de la molienda es liberar gotas de aceite de oliva, que en su mayor parte se localiza dentro de las vacuolas del mesocarpio, mediante la destrucción de la estructura y tejidos vegetales de la aceituna (Di Giovacchino, 2013). Estas gotas se unen formando una fase oleosa continua durante la etapa del batido, en la cual se calienta la pasta de aceitunas para disminuir la viscosidad y facilitar la formación de la fase oleosa.

Una vez batida la pasta, se pueden seguir tres procedimientos de extracción del aceite o procesos de separación de fases (Di Giovacchino, 2013): presión, percolación y centrifugación; las dos primeras están en desuso en España y los principales países productores. La extracción por centrifugación se puede llevar a cabo con centrífugas de dos o tres fases. En las centrífugas de dos fases (aceite y fase sólida) no se añade agua a la pasta, de manera que se obtiene un orujo más seco (alperujo), mientras que en las de tres fases (aceite, agua y orujo) si se añade una cantidad elevada de agua (1 l/kg de aceitunas) por lo que está en retroceso su implementación, ya que el agua es un bien escaso. Además, como consecuencia de la adición de agua, las centrífugas de tres fases generan aceites con menor contenido en fenoles, es decir, aceites menos estables y saludables.

La Figura 1.1 muestra las diferentes fases de la elaboración del aceite de oliva virgen. En rojo están marcadas las fases en las cuales la calidad del aceite obtenido puede verse afectada cuando se llevan a cabo prácticas inapropiadas. Antes de ser procesadas las aceitunas, durante el transporte o en el almacenamiento, pueden sufrir fermentación. Esta

fermentación puede ser anaeróbica, por apilamiento de las aceitunas, o aeróbica, producida por la presencia de acetobacterias u hongos.

Un proceso de lavado en condiciones inadecuadas podría producirse un aceite con defectos sensoriales; por ejemplo, olor a tierra y/o humedad. Por otro lado, el proceso de molienda es fundamental en la calidad posterior del aceite, y debe programarse cuidadosamente en función, al menos, de la madurez de la aceituna. Una molienda agresiva o muy fina puede producir un aceite con defecto a quemado y/o metálico, en el primer caso, o dificultar el batido, en el segundo caso. La calidad del aceite de oliva también puede disminuir si en el proceso de batido se aumenta la temperatura (Di Giovacchino, 2013) aunque se incremente el rendimiento industrial.

Finalmente, una vez elaborado el aceite, el almacenamiento prolongado en contenedores disminuye paulatinamente la calidad sensorial inicial. Disminución que se acelera en depósitos aéreos (incremento de temperatura en verano) o sin espacio de cabeza con nitrógeno. El aceite al ser una grasa, tanto el tiempo como el oxígeno o la elevada temperatura son sus mayores enemigos para el mantenimiento de la calidad sensorial desde su elaboración hasta su consumo.



Figura 1.1. Esquema del proceso de elaboración del aceite de oliva y los puntos críticos que afectan a la calidad. Fuente: García-González *et al.*, 2009b.

1.4 Definición y clasificación de los aceites de oliva vírgenes

Como se ha descrito con anterioridad, el aceite de oliva es, según el COI el aceite procedente del fruto de olivo (*Olea europea Link*), con exclusión de los aceites obtenidos por disolventes o por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza. El aceite de oliva virgen extra (EVOO), es el aceite obtenido sin procedimientos físicos o mecánicos, siendo la categoría definida con mayor calidad. Por otro lado, el aceite de oliva virgen (VOO) es el aceite que presenta un ligero aumento de la mediana de defectos disminuyendo así su calidad total. En el caso del aceite de oliva virgen corriente (OVOO),

definido según COI (COI, 2015a) sólo puede ser vendido directamente al consumidor si está permitido en el país de venta. De no estarlo, la denominación de este producto se ajustará a las disposiciones legales del país en cuestión. Esta categoría de aceite presenta una calidad inferior al aceite de oliva virgen debido a su elevada acidez. La categoría lampante (LVOO) define al aceite no apto para consumo humano. El aceite de oliva virgen lampante necesita una refinación previa al consumo humano.

El aceite de oliva virgen, desde el punto de vista de sus parámetros físico-químico-sensoriales se clasifica, según la normativa vigente (CE, 2013; COI, 2015a), en función de los valores de su acidez, índice de peróxidos, espectroscopía ultravioleta (K_{270} , K_{232} y ΔK), ésteres alquílicos y características organolépticas. Las características organolépticas se determinan con la mediana de los defectos y mediana del atributo frutado; entendiéndose por mediana de defectos, la mediana del defecto percibido con mayor intensidad. La Tabla 1.4 muestra las categorías de aceites de oliva vírgenes definidos según los parámetros descritos por las normativas vigentes.

Tabla 1.4. Categorías de aceites de oliva virgen definidos por la Norma de comercialización del COI (COI, 2015a) y la CE (CE, 2013).

Categorías	Ésteres alquílicos	Acidez	Índice peróxidos ⁵	Absorbancia en UV	Mediana defectos	Mediana aroma frutado	CE, 2013
EVOO ¹	≤35	≤ 0,8	≤ 20	$K_{270} \leq 0,22$ $K_{232} \leq 2,50$ $\Delta K \leq 0,01$	$Me_d = 0$	$Me_f > 0$	$Me_d = 0$
VOO ²	-	≤ 2,0	≤ 20	$K_{270} \leq 0,25$ $K_{232} \leq 2,60$ $\Delta K \leq 0,01$	$0 < Me_d \leq 3,5$	$Me_f > 0$	$Me_d \leq 3,5$
OVOO ³	-	≤ 3,3	≤ 20	$K_{270} \leq 0,30$ $\Delta K \leq 0,01$	$3,5 < Me_d \leq 6,0$	-	-
LVOO ⁴	-	> 3,0	-	-	$Me_d > 6,0$	$Me_f > 2,0$	$Me_d > 3,5$

Nota: ¹, aceite de oliva virgen extra; ², aceite de oliva virgen; ³, aceite de oliva virgen corriente; ⁴, aceite de oliva virgen lampante; ⁵, en mEq. O₂/kg de aceite.

1.5 Composición del aceite de oliva virgen

El aceite de oliva, como todos los aceites vegetales, está constituido por dos grupos de compuestos: mayoritarios y minoritarios. La fracción mayoritaria, que se compone principalmente de triglicéridos, diglicéridos, ceras y ácidos grasos libres, representa más del 98%, mientras del 2% del aceite corresponde a la fracción minoritaria. Esta última fracción está formada por componentes menores, que pueden variar tanto cualitativa como cuantitativamente en función de la variedad, los procedimientos de extracción, las condiciones de almacenamiento y las condiciones pedoclimáticas (Aparicio y García-González, 2013; Aparicio *et al.*, 2013). Los compuestos minoritarios están constituidos por esteroides, dialcoholes terpénicos, alcoholes triterpénicos, alcoholes alifáticos, tocoferoles, hidrocarburos esteroideos, hidrocarburos triterpénicos, 4-4-metil-esteroides, compuestos fenólicos, flavonoides, pigmentos y compuestos volátiles responsables del aroma (León-Camacho *et al.*, 2013; Morales *et al.*, 2013; Gandul-Rojas *et al.*, 2013; Tsimidou, 2013). Esta fracción constituye la “huella digital” del aceite debido a su gran importancia desde el punto de vista biológico y sus componentes pueden ser utilizados para la autenticación (Alkan *et al.*, 2012; Aparicio y Aparicio-Ruiz, 2000), caracterización (García-González *et al.*, 2010a) e identificación del origen geográfico del aceite de oliva virgen (Bajoub *et al.*, 2015; García-González *et al.*, 2009a).

1.6 Calidad del aceite de oliva virgen

La calidad es un concepto multifacético, difuso y jerárquico. Este concepto puede ser definido desde diferentes perspectivas. La Norma UNE-EN ISO 9000:2015 define la calidad como el grado en el que un conjunto de características inherentes cumple con la necesidad o expectativa establecida, generalmente implícita u obligatoria.

En base a la definición anterior, la calidad se podría dividir en dos grandes niveles. Un primer nivel centrado en la seguridad de los alimentos, que deben ser autenticados y controlados por las autoridades y los organismos reguladores; y, por otro lado, un segundo nivel formado por la calidad en sus diferentes facetas: calidad sensorial, calidad y salud, calidad relacionada con aspectos prácticos de utilización del producto (tipo de envase, precio, etc.) y calidad emocional (Figura 1.2).



Figura 1.2. Interacción entre las distintas facetas de calidad y seguridad de los alimentos.

Hace algunas décadas los esfuerzos de los organismos reguladores estaban centrados, principalmente, en controlar todos aquellos aspectos relacionados con la seguridad y autenticidad de los aceites. Actualmente, además, se contemplan otros parámetros relacionados con la calidad, existiendo una tendencia a la regulación de aspectos vinculados con las propiedades sensoriales y saludables. En la regulación de estos aspectos hay que tener en cuenta que el concepto de calidad evoluciona a lo largo del tiempo. Así por ejemplo, hoy en día existe una preferencia hacia aceites obtenidos de aceitunas recolectadas no muy maduras para realzar algunos atributos sensoriales positivos.

En el caso del aceite de oliva virgen, el concepto de calidad agrupa a la calidad definida mediante parámetros organolépticos (atributos sensoriales) y no organolépticos (físico-químicos).

La calidad organoléptica del aceite de oliva virgen se determina mediante una serie de atributos sensoriales de color, viscosidad, olor, sabor y sensaciones quinestésicas, táctiles y quimiostésicas (Angerosa y Campestre, 2013). El método oficial descrito por las normativas vigentes (CE, 2013; COI, 2015a) se basa en la evaluación organoléptica del “flavor” (aroma y olor) del aceite de oliva virgen mediante un panel de cata. Breslin (2001) define el “flavor” como una sensación compleja formada por la combinación e integración del olor, el sabor y las sensaciones quinestésicas que surgen con un alimento.

Dentro de la calidad no organoléptica del aceite se incluirían los criterios de calidad físico-químicos descritos por los diferentes organismos reguladores (CE, 2013; COI, 2015a). Estos parámetros, como son la acidez libre, el índice de peróxidos o las medidas espectrofotométricas K230 y K272, proporcionan información sobre la calidad del aceite de oliva. El grado de acidez mide el porcentaje de ácidos grasos libres, expresados en ácido oleico. El índice de peróxidos evalúa el estado de oxidación primaria del aceite a través de la cuantificación del contenido en hidroperóxidos. La existencia de compuestos oxidados en el aceite también se evalúa con los coeficientes de extinción en el ultravioleta. Así, el K_{232} es una medida de la espectrofotometría realizada a la longitud de onda de 232 nm en la que se absorben los dienos conjugados formados generalmente por una mala manipulación del aceite; mientras que el K_{270} absorben a 270 nm los trienos conjugados, lo que indica el estado de oxidación secundaria del aceite.

La información de los parámetros organolépticos y no organolépticos o físico-químicos permite clasificar un aceite de oliva virgen en una de las diferentes categorías establecidas (EVOO, VOO, OVOO y LVOO), que se evalúa a través de una serie de parámetros químicos y sensoriales descritos en diferentes normativas europeas y normas comerciales del Consejo Oleícola Internacional (COI). El Reglamento (CE) 2568/1991 describe las características químicas y/o sensoriales de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sus métodos de análisis. Posteriores modificaciones en Reglamento (CE) 1989/2003, Reglamento (CE) 640/2008 en lo que se refiere al análisis sensorial, Reglamento (CE) 338/2013, referente a los métodos de análisis. Respecto al COI, el Reglamento T.15/ n°3/Rev.8 (2015a) establece la clasificación comercial de los aceites en función de los parámetros: acidez libre, índice de peróxidos, coeficientes de extinción en el ultravioleta (K_{270} y K_{232}) y características organolépticas (COI, 2105a) y el Reglamento T.20/ n°15/Rev.7 se refiere al análisis sensorial (COI, 2015b)

Además de por sus parámetros fisicoquímicos, los aceites de oliva vírgenes se clasifican por sus características organolépticas, determinadas por panel de cata oficial. Se realiza, a través de pruebas de panel, por un grupo de catadores previamente seleccionados y entrenados, de acuerdo con técnicas sensoriales preestablecidas. La normativa europea (CE, 2013) describe árboles de decisión para la comprobación de la conformidad de los aceites de oliva vírgenes con la categoría declarada (Figura 1.3).

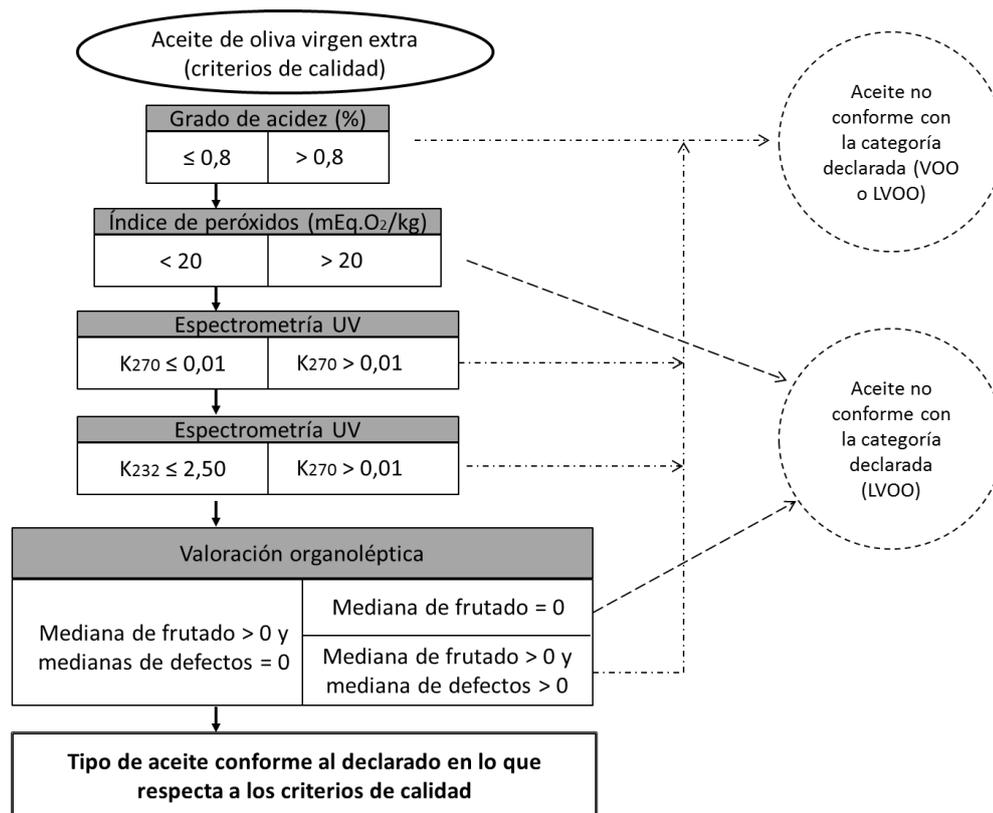


Figura 1.3. Árbol de decisión para la comprobación de la conformidad de una muestra de aceite de oliva virgen extra con la categoría declarada. Fuente: CE, 2013.

Dentro de la evaluación sensorial, la valoración del color, en general, no es requerida por la normativa vigente. El color depende del contenido en pigmentos, clorofilas y carotenoides, presentes en el fruto.

En cuanto al sabor, existen cinco sabores básicos característicos: dulce, salado, ácido, amargo y umami. La mezcla de ellos origina toda la gama de sabores posibles. De estos cinco sabores en el aceite tienen especial importancia los sabores dulce y amargo, que son identificados y evaluados por los catadores del panel de cata (Angerosa y Campestre, 2013). El aroma es determinante no sólo por su responsabilidad en las percepciones agradables del aceite -por ejemplo frutado y verde- sino fundamentalmente por su contribución a percepciones indeseables e inaceptables en el EVOO; por ejemplo, rancio, quemado, humedad, atrojado, avinado, moho, etc. Los compuestos volátiles son los responsables de las diferentes percepciones del aroma.

1.6.1 Compuestos volátiles en aceite de oliva virgen

Los volátiles son compuestos de bajo peso molecular, menos de 300 Da, que tienen una baja presión de vapor y en condiciones normales de presión y temperatura pasan al estado gaseoso (Angerosa *et al.*, 2004). El único y apreciado “flavor” del aceite de oliva virgen es atribuido a los compuestos volátiles producidos durante y tras la extracción del aceite del fruto (Morales *et al.*, 2013). Se han identificados más de 100 compuestos volátiles en el aroma del aceite (Morales *et al.*, 2013). En este grupo pueden encontrarse: hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, ácidos, compuestos terpénicos y derivados de furano. Algunos compuestos volátiles identificados en diferentes categorías del aceite de oliva se muestran en la Tabla 1.5 (Morales *et al.*, 2013).

Tabla 1.5. Compuestos volátiles identificados en diferentes tipos de aceites de oliva virgen.

<u>Aldehídos</u>	<u>Alcoholes</u>	<u>Ésteres</u>	<u>Hidrocarburos</u>	<u>Cetonas</u>
Acetaldehído	Metanol	Acetato de Metilo	2-Metilbutano	2-Butanona
2-Metilbutanal	Etanol	Acetato de Etilo	2-Metilpentano	3-Metil-2-Butanona
3-Metilbutanal	2-Metil-1-Butanol	Acetato de Butilo	3-Metilpentano	3-Pentanona
2-Metil-2-Butenal	3-Metil-1-Butanol	Acetato de 2-Metilbutilo	Hexano	4-Metil-2-Pentanona
Pentanal	2-Metil-3-Butenol	Acetato de Isopentilo	Hexeno	1-Penten-3-ona
E-2-Pentenal	1-Pentanol	Acetato de Hexilo	Heptano	2-Hexanona
Z-2-Pentenal	3-Pentanol	Acetato de 2-Hexenilo	Octano	2-Heptanona
Hexanal	3-Hexen-1-ol	Acetato de 3-Hexenilo	1-Octeno	6-Metil-5-Hepten-2-ona
2-Hexenal	E-3-Hexen-1-ol	Acetato de Z-3-Hexenilo	Nonano	
E-2-Hexenal	Z-3-Hexen-1-ol	Acetato de Octilo	Trideceno	2-Octanona
Z-2-Hexenal	2-Hexen-1-ol	Acetato de 2-Etilfenilo	Dímeros del	3-Octanona
3-Hexenal	E-2-Hexen-1-ol	Acetato de Bencilo	Penteno	2-Nonanona
Z-3-Hexenal	Z-2-Hexen-1-ol	Acetato de Fenetilo	Metilbeceno	Acetofenona
2,4-Hexadienal	4-Hexen-1-ol	Propanoato de Etilo	Estireno	
Heptanal	1-Heptanol	Propanoato de Propilo		<u>Compuestos Azufrados</u>
E-2-Heptenal	1-Octanol	2-Metilpropanoato de Etilo	<u>Fenoles</u>	3-Isopropeniltiofeno
Z-2-Heptenal	1-Octen-3-ol	2-Metilpropanoato de Propilo	Anisol	2,5-Dietiltiofeno
2,4-Heptadienal	2-Octen-1-ol	Butanoato de Metilo		2-Etil-5-Hexiltiofeno
Octanal	1-Nonanol	Butanoato de Etilo		
E-2-Octenal	1-Decanol	2-Metilbutanoato de Metilo		<u>Furanos</u>
Nonanal	Lavandulol	2-Metilbutanoato de Etilo		Etilfurano
E-2-Nonenal	Linalool	3-Metilbutanoato de Metilo		2-Propilfurano
2,4-Nonadienal	Alcohol Bencílico	3-Metilbutanoato de Etilo		3-Propilfurano
E-2-Undecenal	2-Fenil Etanol	3-Metilbutanoato de Butilo		3-Metil-2-Penilfurano
Benzaldehído	A-Terpineol	Hexanoato de Metilo		2-Propildihidrofurano
		Hexanoato de Hexilo		3,4-Metil-2-Pentenilfurano
		Heptanoato de Metilo		
		Octanoato de Metilo		<u>Ésteres</u>
				Éter Etilico
				1,8-Cineol

1.6.1.1. Formación de compuestos volátiles

La composición del aroma depende de la calidad del aceite y viceversa. Cuando el aceite se obtiene a partir de frutos sanos, recolectados en un grado de madurez óptimo y siguiendo un procedimiento de extracción apropiado, los compuestos que forman su aroma proceden del propio fruto y son los volátiles responsables de los atributos sensoriales apreciados por el consumidor o “positivos”. Éstos contribuyen al aroma frutado y fresco que caracteriza a los aceites de buena calidad; como son las notas sensoriales verde, dulce, frutado verde, fruta madura, aceituna madura y amargo-picante (Aparicio *et al.*, 1996; Morales *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2013) que son las más destacadas desde el punto de vista de los consumidores. Cuando las condiciones de recolección, extracción o almacenamiento del aceite son inapropiadas, el aceite presenta características sensoriales diferentes a los aceites de buena calidad, es cuando aparecen los compuestos volátiles responsables de los atributos sensoriales rechazados por el consumidor o “negativos” (Morales *et al.*, 2005).

Los compuestos volátiles presentes en el aroma del aceite de oliva virgen se pueden originar por distintos mecanismos. Es en la fase del climaterio donde el fruto produce etileno induciendo cambios bioquímicos, físicos y químicos que incrementan la actividad de algunas enzimas responsables de los compuestos volátiles.

En el caso de los aceites de buena calidad, los compuestos volátiles son generados principalmente a partir de las rutas metabólicas del propio fruto, mientras que en los aceites de baja calidad existen otros mecanismos productores que contribuyen a la formación de volátiles (Morales *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2013).

La Figura 1.4 muestra la biogénesis de la mayoría de los compuestos volátiles del aceite de oliva virgen; en verde se representan las rutas que contribuyen a la producción de volátiles responsables a atributos positivos y en rojo los responsables de los atributos negativos o defectos sensoriales relacionados en la molienda de aceitunas imperfectas, o una producción o almacenamiento inadecuados. A continuación se describen las rutas implicados en la biogénesis de los compuestos volátiles.



Figura 1.4. Biogénesis de los compuestos volátiles en aceite de oliva virgen. Fuente: Morales *et al.*, 2013.

Metabolismo de ácidos grasos. Es responsable de la formación de volátiles tales como alcoholes primarios y secundarios en aceitunas durante sus primeros estadios de maduración. Además, producen ácidos grasos. Durante la maduración, el fruto desarrolla la capacidad de convertir algunos de estos ácidos en cetonas, ésteres y alcoholes (Luna, 2003). En consecuencia, en el aceite de oliva virgen se pueden encontrar ésteres alifáticos, alcoholes, ácidos y compuestos carbonílicos derivados del metabolismo de los ácidos grasos.

Ruta de la lipoxigenasa (LOX). Es la principal ruta bioquímica implicada en la formación de los compuestos volátiles mayoritarios del aceite y es responsable de la producción de los llamados compuestos volátiles secundarios. Los principales precursores de esta ruta son los ácidos grasos poliinsaturados de 18 átomos de carbono, linoleico y α -linolénico. La ruta de la lipoxigenasa se inicia por la liberación de enzimas que se produce cuando los tejidos del fruto se ven alterados en las fases de molienda y batido (Clodoveo, 2012). La actividad de las enzimas implicadas influye de manera importante en el aroma del aceite y depende de la variedad de la aceituna, del estado de maduración del fruto (Pardo *et al.*, 2011) y de las condiciones de elaboración del aceite (Allouche *et al.*, 2010).

En general en las plantas, la mayor parte de los ácidos grasos poliinsaturados se encuentran formando parte de los lípidos de membrana (fosfolípidos, glicolípidos) o de reserva (triacilgliceroles) y para que éstos puedan ser empleados por la enzima deben ser previamente liberados. Esta función la ejerce un grupo de enzimas denominados acil-

hidralasas (Luna, 2003; Kalua *et al.*, 2007). Una vez liberados los ácidos grasos, la ruta comienza con la producción de los 9- y 13-hidroperóxidos de los ácidos linoleico y linolénico mediada por la lipoxigenasa (Angerosa *et al.*, 2004; Kalua *et al.*, 2007; Morales *et al.*, 2013). Debido a su alta reactividad, estos compuestos se degradan en metabolitos rápidamente, siendo los aldehídos volátiles de gran importancia desde el punto de vista organoléptico (Williams *et al.*, 2000).

La lipoxigenasa presenta regioespecificidad en la posición Δ -13 de ambos ácidos grasos, proporcionando 13-hidroperóxido como producto mayoritario (75-90%) (Kalua *et al.*, 2007). Sobre los hidroperóxidos actúan las denominadas hidroperóxido liasas (HPL) catalizando la lisis del enlace situado entre el carbono portador de la función hidroperóxido y el doble enlace de configuración E del 9 (S)- y 13(S)-hidroperóxido. Esta rotura del enlace da lugar a un aldehído volátil de 6 átomos de carbonos (C₆), si proviene del 13-hidroperóxido, o de 9 átomos de carbonos (C₉), si proviene del 9-hidroperóxido. Como la enzima HPL presenta regioespecificidad, los aldehídos formados de C₆ serán los principales componentes del aroma del aceite de oliva.

Como se observa en la Figura 1.5, los aldehídos formados por la acción de la lipoxigenasa y la hidroperóxido liasa son hexanal y Z-3-hexenal, siendo este último isomerizado rápidamente a E-2-hexenal, que en muchas ocasiones corresponde al componente en mayor proporción encontrado en el aceite. Posteriormente, los aldehídos son transformados por medio de una alcohol deshidrogenasa (ADH) en sus correspondientes alcoholes, que finalmente pueden reaccionar con un acil-CoA por la acción de la enzima alcohol acetil transferasa (AAT), formando los correspondientes ésteres (Luna, 2003; Morales *et al.*, 2013).

La ruta de la lipoxigenasa es la productora de los compuestos responsables del aroma “verde o césped recién cortado” del aceite como muestra la Figura 1.5. Los aldehídos C₆ (hexanal, Z-3-hexenal y E-2-hexenal), sus alcoholes (hexanol, Z-3-hexen-1-ol y E-2-hexen-1-ol) y sus ésteres de acetilo (acetato de hexilo, acetato de Z-3-hexenilo y acetato de E-2-hexenilo) son los compuestos que se encuentran en mayor proporción en el aceite de oliva virgen, constituyendo un 60-80% del total de compuestos volátiles.

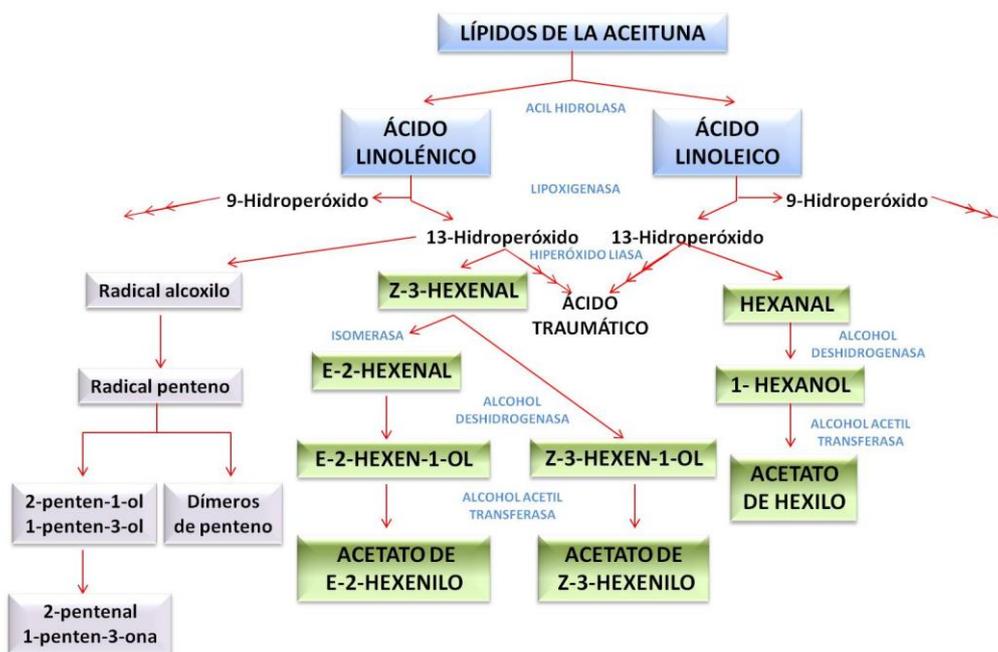


Figura 1.5. Esquema de la ruta de la lipoxigenasa (LOX). Fuente: García-González *et al.*, 2010a.

Rotura del 13-hidroperóxido del ácido linolénico. Es una reacción adicional de la ruta de la lipoxigenasa cuando el sustrato es el ácido linolénico. LOX cataliza, además de la formación del hidroperóxido, la escisión de un radical alcoxilo, dando lugar a la formación de radicales 1,3-penteno. La acción posterior de la alcohol deshidrogenasa es la responsable de la formación de aldehídos de 5 átomos de carbonos (C₅), también encontrados en el aceite de oliva virgen (Angerosa *et al.*, 2004; Morales *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2013).

Metabolismo de los aminoácidos. Los aminoácidos son los precursores de algunos compuestos volátiles encontrados en el aceite cuyos esqueletos estructurales pueden derivar de la cadena ramificada de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina mediante una serie de transformaciones químicas (Luna, 2003). Estos aminoácidos son transformados en aldehídos ramificados (2-metilpropanal, 3-metilbutanal y 2-metilbutanal) sobre los que actúa la enzima alcohol deshidrogenasa convirtiendo dichos aldehídos en sus correspondientes alcoholes. Finalmente, la acción de la alcohol acetil transferasa da lugar a la formación del éster (Morales *et al.*, 2005; Kalua *et al.*, 2007; Morales *et al.*, 2013).

Cuando los aceites presentan baja calidad sus características sensoriales básicas se modifican de manera que las habituales notas frutadas, verdes y amargo-picantes del aceite de buena calidad disminuyen de intensidad e incluso desaparecen, y aparecen otras notas

sensoriales negativas dando lugar a una serie de sensaciones desagradables conocidas como defectos sensoriales.

Como muestran las Figuras 1.4 y 1.5, las enzimas endógenas, a través de la ruta de la lipoxigenasa, son las responsables del aroma positivo del aceite de oliva virgen, mientras que la fermentación de azúcares, la actividad de enzimas exógenas que provienen de microorganismos y la oxidación química están asociadas principalmente a los defectos sensoriales (Kotti *et al.*, 2010).

1.6.1.2. Métodos de análisis de compuestos volátiles

1.6.1.2.1 Análisis sensorial

La evaluación sensorial del aceite de oliva a través del panel de cata es el único método oficial reconocido por el COI y las normativas europeas (COI, 2015b; CE, 2013). Es un análisis descriptivo-cuantitativo basado en el uso de un vocabulario consensuado de atributos sensoriales, desarrollado específicamente para los aceites de oliva vírgenes. El Reglamento (CE) n° 1348/2013 (CE, 2013) y la Norma Comercial COI T.20/ n°15/Rev.8 (COI, 2015b) en el caso del COI describen el modelo oficial de perfil para realizar la clasificación comercial de los aceites de oliva virgen, el vocabulario, la técnica de cata y las instalaciones necesarias. Cada panel debe estar formado por un grupo de 8 a 12 personas, seleccionadas de una manera reglada y entrenadas convenientemente, para identificar y medir la intensidad de las diferentes sensaciones positivas y negativas percibidas por los sentidos. Las sensaciones percibidas y su intensidad, tanto de los atributos positivos como negativos, se indican en una hoja pre-establecida (COI, 2015a).

Las valoraciones de este sistema de análisis pueden estar sujetas a cierta subjetividad, por lo que para evitarla se hace necesario el entrenamiento continuado de los panelistas o asesores, además de precisa definición de los atributos sensoriales. Pero aun así, no siempre se consigue la eliminación de la subjetividad inherente de cada catador entrenado. El análisis sensorial, también tiene otros inconvenientes como: su elevado costo, un tiempo de análisis largo que impide su aplicación *on-line* en una cadena de producción, seria limitación en su frecuencia de uso por fatiga de los panelistas, potencial influencia de las condiciones ambientales y de los panelistas (por ejemplo, estado anímico y horario, etc.).

1.6.1.2.2 Análisis químico

Aunque panel de cata es el único método oficial para el análisis sensorial del aceite, la medida objetiva de la calidad sensorial de los aceites de oliva vírgenes debería basarse en la cuantificación de sus compuestos volátiles que son los responsables exclusivos del aroma.

Se han desarrollado diversos métodos para el análisis de los compuestos volátiles del aceite de oliva virgen. Los métodos generalmente aceptados incluyen cuatro fases: preconcentración, aislamiento, separación y cuantificación e identificación (Figura 1.6).

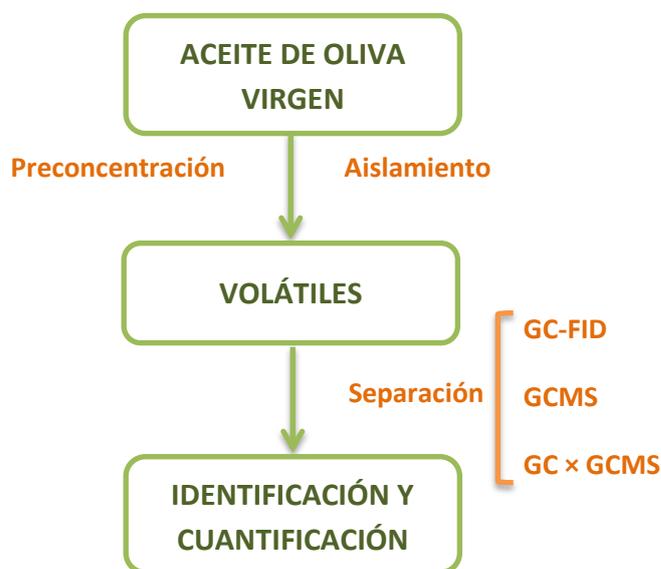


Figura 1.6. Esquema del análisis de compuestos volátiles en el aceite de oliva.

Antes del análisis de los compuestos volátiles se deben tener en cuenta ciertos aspectos, como el amplio rango de concentraciones de los volátiles en el aceite de oliva, o la importancia de sus umbrales de olor. Además, se debería tener en cuenta la posible formación de artefactos durante el análisis, que puede provocar resultados incorrectos y la baja concentración de algunos compuestos volátiles que necesariamente requieren de una preconcentración de la muestra previa al análisis (Morales *et al.*, 1992).

La etapa de preconcentración es una etapa de enriquecimiento de compuestos volátiles para evitar trabajar cerca del límite de cuantificación del método cromatográfico. Existen diversas técnicas de preconcentración, pero las más utilizadas en el aceite de oliva son, el espacio de cabeza dinámico (DHS) y el espacio de cabeza estático con microextracción en fase sólida (HS-SPME).

Preconcentración y aislamiento

Microextracción en fase sólida (SPME)

La microextracción en fase sólida (SPME) se basa en la partición de los componentes orgánicos entre una muestra líquida o su fase vapor y una fina fase de revestimiento de las fibras de sílice fundida. En esta técnica, el recubrimiento de la fibra de SPME se expone en el espacio de cabeza de un vial cerrado herméticamente (Figura 1.7), hasta alcanzar un proceso de equilibrio de reparto de volátiles entre la muestra y el recubrimiento de la fibra que constituye la trampa. La adsorción del analito depende de dos equilibrios estrechamente ligados pero diferentes. El primero es el equilibrio entre la matriz y el espacio de cabeza; el segundo es el equilibrio correspondiente al espacio de cabeza y el recubrimiento polimérico de la fibra. Una vez alcanzado el equilibrio, la fibra se retrae y el analito se desorbe en el portal de inyección mediante desorción térmica. La desorción térmica de los volátiles en el portal de inyección depende de varios factores: la volatilidad del analito, el grosor de la fibra, la profundidad de la inyección, la temperatura del inyector y el tiempo de exposición (Vas y Vékey, 2004).

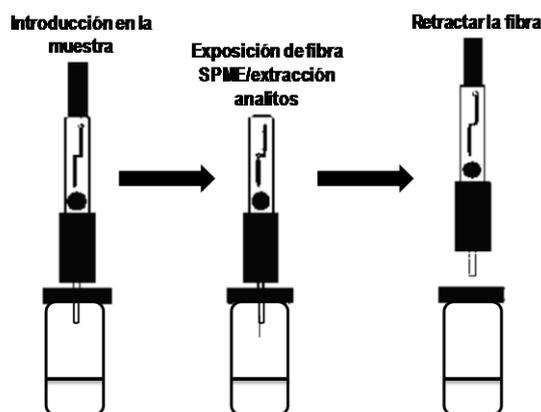


Figura 1.7. Esquema de la extracción mediante SPME. Fuente: Chatonnet *et al.*, 2009.

La principal ventaja de SPME es su simplicidad y bajo coste, además de que la gran variedad de tipos de fibras proporciona una elevada versatilidad en sus aplicaciones. Otras ventajas son la buena repetibilidad que, en general, presenta esta técnica en la cuantificación de volátiles con alto peso molecular, la posibilidad de automatizarla y la reducción del tiempo

de muestreo. No obstante, esta técnica también presenta inconvenientes, como la presencia de artefactos proporcionados por el septum; ajustados valores de repetibilidad en la cuantificación de volátiles de bajo peso molecular; una moderada reproducibilidad y problemas de competencia entre volátiles en su adsorción por la fibra. Todos estos inconvenientes son inherentes al espacio de cabeza estático.

La microextracción en fase sólida como método de preconcentración de compuestos volátiles se ha usado en numerosos estudios de aceite de oliva virgen. El polímero formado por DVD/CAR/PDMS (divinilbenceno-carboxeno-polidimetilsiloxano) es uno de los más empleados en el análisis de los volátiles del aceite de oliva virgen. HS-SPME se ha usado en la caracterización de diversos aceites (Tena *et al.*, 2007; García-González *et al.*, 2010c; Peres *et al.*, 2013; Fernández *et al.*, 2014); en estudios de oxidación (Vichi *et al.*, 2003a); origen geográfico (Vichi *et al.*, 2003b; Kandyliis *et al.*, 2011) o en análisis de la calidad sensorial (Romero *et al.*, 2015).

Espacio de cabeza dinámico (DHS)

Esta técnica consiste en arrastrar, con un flujo controlado de gas inerte, los volátiles de la muestra hasta una trampa donde quedan retenidos. El proceso se lleva a cabo con el vial de la muestra termostatzado a una temperatura máxima de 45°C.

Las tres variables más importantes que afectan al DHS son la temperatura, el tiempo y el flujo de arrastre. Estas dos últimas deben ser optimizadas teniendo presente que valores demasiados bajos pueden conducir a un arrastre defectuoso y valores demasiado altos a pérdida de volátiles. La temperatura está condicionada por el tipo de compuestos que se desee analizar. Si se trabaja a baja temperatura, los volátiles que se identifican corresponden a los realmente presentes en la muestra (García-González *et al.*, 2010a; Morales *et al.*, 2013). Por el contrario, el uso de temperaturas elevadas incrementa el riesgo de formación de compuestos de degradación (artefactos) y pérdida de compuestos naturalmente presentes en la muestra original (Luna, 2003; García-González *et al.*, 2010a).

El método DHS necesita una etapa de enriquecimiento que puede llevarse a cabo con trampas de materiales adsorbentes o con trampas criogénicas. Las trampas adsorbentes están constituidas por un tubo de vidrio o acero inoxidable relleno de una determinada cantidad de material adsorbente (carbón activo o polímeros), de manera que cuando el gas inerte cargado

de volátiles pasa a través de ellas éstos quedan retenidos en dicho material. Aunque se han usado diversos materiales, el TenaxTA™ es el más utilizado en el aceite de oliva virgen por su alta estabilidad térmica (hasta 350°C) y su alta capacidad de adsorción de numerosos compuestos (Aparicio y Morales, 1998; Luna *et al.*, 2006a; Morales *et al.*, 1994, 2005, 2013).

Uno de los puntos críticos de la técnica DHS es la capacidad de carga de la trampa. Ésta se puede sobrecargar cuando el volumen de la fase gaseosa supera el volumen recomendado, con la consiguiente pérdida de analitos. Otro inconveniente del uso de trampas en DHS, es la alta afinidad de estas trampas con el agua, aunque no es un inconveniente relevante para el análisis de aceite de oliva debido a la baja cantidad de agua de esta matriz. A pesar de los inconvenientes, el espacio de cabeza dinámico tiene la ventaja de poder aplicarse diversas cantidades de muestra y en un amplio rango de temperaturas, lo cual, unido al enriquecimiento de volátiles en las trampas, permite un aumento de la sensibilidad.

El método DHS usando como trampa TenaxTA™ ha sido empleado para el estudio de la fracción volátil del aceite de oliva virgen (Morales *et al.*, 1994), para establecer la relación entre los compuestos volátiles y los atributos sensoriales (Aparicio *et al.*, 1996; Morales *et al.*, 1995), para caracterizar diferentes variedades europeas (Aparicio *et al.*, 1997; Luna *et al.*, 2006a) para conocer la importancia de los sistemas de extracción (Morales y Aparicio, 1999) y los grados de madurez (Morales *et al.*, 1996) en la calidad sensorial del aceite y para estudiar los cambios en la calidad del aceite de oliva durante el almacenamiento (Luna *et al.*, 2006b).

Separación

Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)

Existen distintas metodologías adaptadas para la evaluación objetiva del aroma. Una de las metodologías más empleadas es la identificación y cuantificación de compuestos volátiles mediante cromatografía de gases (GC) con detector de ionización de llama (FID). GC es una poderosa técnica separativa con una alta capacidad para separar mezclas complejas de componentes similares, como es el aceite de oliva virgen (Escudero, 2011).

GC-FID se ha utilizado en numerosas aplicaciones para la clasificación o la caracterización del aceite (Luna *et al.*, 2006a; Tena *et al.*, 2007; García-González *et al.*,

2010a); para diferenciación geográfica de aceites de oliva (García-González *et al.*, 2010c). Además, se ha empleado para la autenticación del aceite de oliva virgen (Aparicio *et al.*, 2013).

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GCMS)

El acoplamiento entre cromatografía de gases y espectrometría de masas (GCMS) ofrece un alto poder de resolución y una elevada velocidad de análisis debido a la cromatografía de gases, y una buena identificación y buena sensibilidad gracias a la espectrometría de masas.

Una de las ventajas de GCMS en cuantificación es la confirmación del analito. En GCMS, además del tiempo de retención del analito, el valor m/z del ion es utilizado para el cálculo y la cuantificación de la intensidad de los picos espectrales de picos que son únicos para cada analito.

El acoplamiento GCMS se ha empleado para la identificación de compuestos volátiles con y sin el uso de patrones (Morales *et al.*, 1994). Cavalli *et al.* (2004) identificaron y caracterizaron 41 compuestos volátiles en aceite de oliva virgen, alguno de estos compuestos se utilizaron como marcadores para la evaluación de calidad del aceite. Gilbert-López *et al.* (2010) llevaron a cabo la separación, identificación y cuantificación de los compuestos volátiles tolueno, benceno, etilbenceno, o-, m- y p-xilenos y estireno en aceite de oliva virgen. Además, se ha descrito métodos basados en GCMS capaces de discriminar aceites de diversas zonas geográficas (Kesen *et al.*, 2014; Pouliarekou *et al.*, 2011), así como en diferenciar variedades de aceituna (Reboredo-Rodríguez *et al.*, 2012) o en la identificación de compuestos volátiles como marcadores de la calidad sensorial (Romero *et al.*, 2015), entre otras aplicaciones.

Cromatografía bidimensional acoplada espectrometría de masas (GC×GCMS)

La cromatografía bidimensional se basa en el uso de dos columnas con una selectividad tan diferente como sea posible, y unidas en serie. El dispositivo de transferencia, conocido como modulador, se encuentra entre las dos dimensiones permitiendo de manera simultánea el aislamiento y la reinyección de las bandas cromatográficas de la primera a la segunda columna a lo largo del análisis (Tranchida *et al.*, 2013). Las principales ventajas de la

GC×GC son su mayor poder de separación, selectividad y sensibilidad en comparación con la cromatografía unidimensional.

Dimandja *et al.* (2000) son los autores de la primera aplicación de la cromatografía bidimensional en aceites esenciales. En la actualidad, GC×GCMS ha permitido diferenciar aceites de oliva virgen de diversas zonas geográficas (Vaz-Freire *et al.*, 2009; Peres *et al.*, 2013) y profundizar en el estudio de la huella química exclusiva del aceite de oliva virgen (Purcaro *et al.*, 2014).

Olfatometría

La olfatometría acoplada a la cromatografía de gases (GC-O) es la técnica más adecuada para calificar el aroma de zonas del cromatograma y, además, ayuda a caracterizar individualmente ciertos volátiles con descriptores sensoriales. La técnica GC-O contribuye, por tanto, a resolver el problema de compuestos que contribuyen al aroma debido a su elevado OAV (Odour Activity Value) pero son muy minoritarios y no fácilmente cuantificables mediante GC. El perfil obtenido mediante GC-O no refleja necesariamente el perfil del aroma de la muestra de aceite, ya que no es fácil asignar un descriptor sensorial a cada uno de los volátiles determinado mediante GC-O (Blank, 2002). Varios procedimientos han sido desarrollados para obtener datos a partir de la GC-O y, poder así, estimar la contribución sensorial individual de los volátiles al aroma. Los dos métodos principales son las técnicas de dilución y las técnicas de tiempo-intensidad.

Técnicas de tiempo-intensidad. Con esta técnica, los analistas evalúan la intensidad del olor percibido, lo describen y registran su duración. La primera técnica conocida como Osme (McDaniel *et al.*, 1990; Da Silva *et al.*, 1994), se basa en la evaluación del olor por el analista en un rango de 0 a 15. Al comparar las intensidades de los olores con el tiempo de retención se obtiene una representación gráfica de la importancia sensorial de los compuestos en el aroma global que se denomina “osmeograma”.

Técnicas de dilución. En este tipo de técnicas se concentran los volátiles en un extracto que se analiza mediante GC-O para determinar los tiempos de retención en los que aparecen olores. A continuación, se diluye sucesivamente el extracto y se analiza olfatométricamente cada dilución, hasta que no se detecte ningún olor; es decir, un extracto en el que la concentración del odorante que origina el olor es inferior a su umbral de olor. Para cada olor percibido se

determina el factor de dilución (FD), que es la relación entre la concentración del odorante en el extracto inicial y su concentración en el extracto más diluido en el cual el olor es aun detectado por GC-O. Cuanto mayor es el FD de un volátil, mayor es su contribución al aroma.

Las dos técnicas de dilución más conocidas son CHARM (Combined Hedonic Aroma Response Measurements) desarrollado por Acree *et al.* (1984) y AEDA (Aroma Extract Dilution Analysis) desarrollado por Grosch (1994). Ambas técnicas presentan ciertas limitaciones, por ejemplo, el analista puede no percibir un odorante en una dilución, pero sí detectarlo en diluciones superiores (Chaintreau, 2002). Por otro lado, las técnicas que miden intensidades poseen mejor repetibilidad (Van Ruth y O'Connor, 2001) pero la información que proporcionan no es una medida real del aroma del compuesto en el aroma global. Estas técnicas no pueden asegurar que la concentración del compuesto, detectada por el analista durante el análisis cromatográfico, sea la misma que cuando se huele directamente la muestra.

Los procedimientos estadísticos multivariantes han demostrado ser herramientas útiles para establecer las relaciones entre el aroma y los atributos sensoriales del aceite de oliva virgen. Ya que estos procedimientos se basan en los datos obtenidos mediante cromatografía de gases y los datos sensoriales obtenidos por GC-O (Morales *et al.*, 1995; Aparicio *et al.*, 1996). Se han descrito numerosos artículos para la caracterización de aceites de oliva vírgenes basados en GC-O con el fin de evaluar el aroma correspondiente a los compuestos volátiles del aceite (Luna *et al.*, 2006a; Peres *et al.*, 2013; Kesen *et al.*, 2014).

1.6.1.3. Estado del arte en la relación entre compuestos volátiles y calidad del aceite de oliva virgen

La normativa europea (CE, 2013) y el COI (COI, 2015b) recogen el análisis sensorial mediante el asesoramiento del panel de cata como el método oficial de evaluación de la calidad sensorial del aceite de oliva virgen. El aroma del aceite de oliva virgen se debe a la presencia de los compuestos volátiles. Según el perfil de compuestos volátiles que presente el aceite, el COI (COI, 2015b) clasifica los defectos sensoriales más frecuentes en 5 grupos: atrojado-borras, moho-humedad-tierra mojada, avinado-avinagrado/ácido-amargo, madera-humedad y rancio. Los tres primeros defectos se deben a una inadecuada conservación del fruto o de la pasta, antes de procesar el aceite; madera-humedad se debe a la congelación del fruto en el propio árbol; mientras que el último defecto se produce durante un

almacenamiento prolongado y/o inapropiado del aceite. Bajo estas condiciones la lipólisis y la oxidación son los procesos que conducen al deterioro más grave del aceite. La lipólisis, por lo general, se inicia cuando el aceite aún no ha sido extraído del fruto (Morales *et al.*, 1997); mientras que la oxidación comienza después de la extracción y se desarrolla principalmente durante el almacenamiento. Ambos procesos afectan a la composición y a las características sensoriales del aceite (Morales *et al.*, 2005). La Tabla 1.6 muestra la información recogida en la norma del COI (COI, 2015b) sobre los atributos negativos detectados en el aceite de oliva virgen.

Desde un punto de vista económico, es importante detectar la presencia de defectos sensoriales en los aceites de oliva ya que su clasificación como lampante implica una devaluación del producto y plantea un problema a los productores (Morales *et al.*, 2005). Como consecuencia, existe un interés creciente en conocer los agentes químicos responsables de los defectos sensoriales.

La presencia de defectos sensoriales no solo se debe a la alta concentración de algunos volátiles frente al perfil de volátiles habitual de los aceites de oliva virgen extra, sino también a la presencia de diferentes compuestos volátiles. En consecuencia, cada uno de los defectos detectados en el aceite de oliva virgen tiene un perfil de volátiles diferente a los demás, como muestra la Figura 1.8, que nos permite la caracterización independiente de cada uno de ellos.

Además, no sólo varía en el perfil de los compuestos volátiles, sino también varía en el contenido total de estos compuestos. En la Figura 1.9 se representa el contenido total de compuestos volátiles de diferentes muestras de aceites de oliva vírgenes. Como puede observarse, un EVOO presenta un bajo contenido en compuestos volátiles, así como el defecto moho-humedad. Por el contrario, los defectos avinado-avinagrado y atrojado-borras presentan un contenido total de volátiles mayor que los casos anteriores, siendo al defecto rancio el que muestra un mayor contenido.

Tabla 1.6. Causas y etapas de desarrollo de algunos defectos sensoriales del aceite de oliva virgen (COI, 2015a).

Causa en origen	Aparición del "flavor"	Defecto
Condiciones inapropiadas del fruto	Aceites obtenidos de aceitunas atacadas por larvas de la mosca del olivo (<i>Bactrocera Oleae</i>)	Gusano
	Aceites obtenidos de aceitunas secas	Heno-madera
	Aceites obtenidos de aceitunas heladas en el árbol y/o descongeladas	Helada/Madera-humedad
	Producido por algunos aceites viejos	Áspero
Almacenamiento inapropiado del fruto	Aceites obtenidos de aceitunas que sufren fermentación anaeróbica debido a su almacenamiento en pilas durante largo tiempo o en contacto con sedimentos fermentados (lodos de decantación) de los depósitos	Atrojado-borras
	Aceites obtenidos de aceitunas que sufren fermentación aeróbica por la presencia de acetobacterias y levaduras debido a una largo almacenamiento	Avinado-avinagrado
	Aceites obtenidos de aceitunas que sufren invasión por hongos como <i>Aspergillus</i> o <i>Penicillium</i> tras almacenamiento a baja temperatura y elevada humedad y/o recogidas con tierra o barro y procesadas sin lavar	Moho-humedad-tierra mojada
	Aceites obtenidos en plantas nuevas y/o usadas por primera vez en la campaña	Metálico
	Aceites obtenidos de aceitunas de verdeo almacenadas en salmuera.	Salmuera
Inadecuada tecnología de obtención del aceite	Aceites obtenidos de aceitunas sometidas a condiciones térmicas excesivas durante el batido	Cocido o quemado
	Aceites obtenidos de aceitunas prensadas en capachos de esparto nuevos	Esparto
Condiciones inapropiadas de almacenamiento del aceite	Aceite almacenado herméticamente durante un tiempo prolongado, sobretodo en latas	Pepino
	Proceso autooxidativo del aceite debido a un exceso de temperatura, luz o prolongado contacto con aire	Rancio

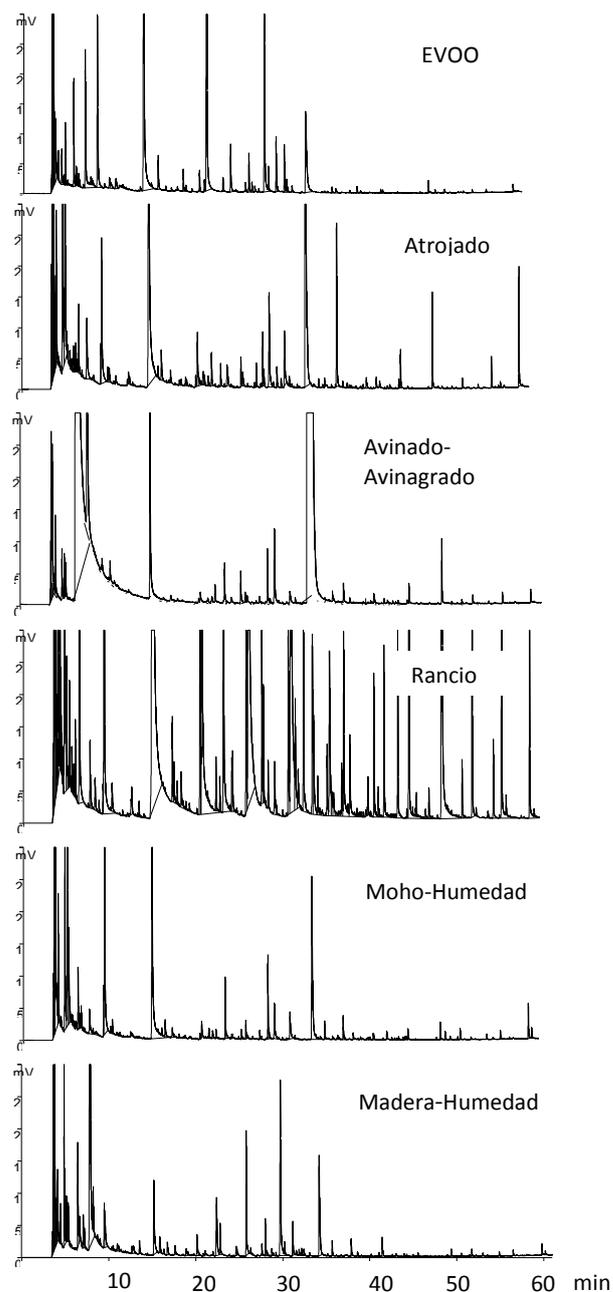


Figura 1.8. Perfiles de compuestos volátiles de aceites de oliva vírgenes con diferentes atributos sensoriales. Nota; EVOO, aceite de oliva virgen extra.

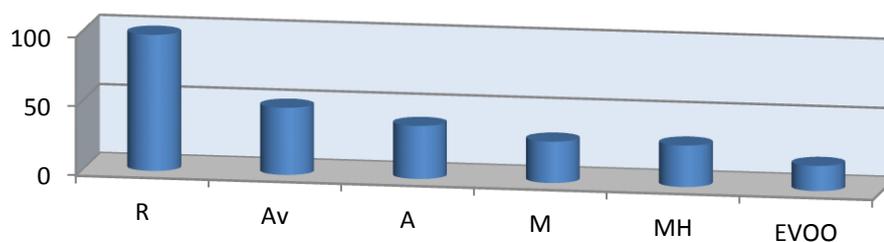


Figura 1.9. Contenido total de volátiles correspondientes a la media elaborada de muestras de aceite de oliva virgen extra (EVOO) y cinco muestras estándares de defectos sensoriales (R, rancio; Av, avinado-avinagrado; A, atrojado-borras; M, moho-humedad; MH, madera-humedad).

Moho-humedad-tierra mojada

Característico aroma de aceites obtenidos con aceitunas apiladas bajo condiciones de alta humedad o aceite obtenido a partir de aceitunas con tierra, que no han sido lavadas (COI, 2015b). Se ha demostrado la presencia de diferentes especies del género *Aspergillus*, junto con ascomicetos, y *Penicillium notatum* en estas condiciones de almacenamiento.

Estos microorganismos tienen la capacidad de oxidar los ácidos grasos libres, produciendo compuestos volátiles como metilcetonas (2-heptanona, 2-nonanona) (Tabla 1.7). Por otro lado, las levaduras pueden reducir los carbonilos y esterificar parcialmente los alquilos funcionales. Los géneros *Candida*, *Pichia* y *Saccharomyces* también han sido detectados bajo estas condiciones (Morales *et al.*, 2005).

Es interesante destacar la presencia de compuestos volátiles que no aparecen en el EVOO, como compuestos volátiles de 8 átomos de carbono (C₈) o ácidos grasos de cadena corta. Además, de la baja concentración que presenta de E-2-hexenal y la alta concentración de hexanal en comparación con EVOO. Este hecho se explica por la acción de las enzimas de los microorganismos en la ruta de la lipoxigenasa en aceitunas (Schnürer *et al.*, 1999). La actividad de los microorganismos también puede explicar la alta concentración de 1-octen-3-ol, 3-metil-1-butanol y 6-metil-5-hepten-2-ona.

Atrojado-borras

Característico aroma de aceites obtenidos de aceitunas apiladas bajo condiciones que favorecen la fermentación anaeróbica o aceites que han estado en contacto con los sedimentos generados en los depósitos de almacenamiento de las aceitunas antes de la molienda (COI, 2105a) (Figura 1.10). Los microorganismos encontrados en las aceitunas responsables de este defecto sensorial dependen del tiempo de almacenamiento del fruto. *Aerobacter* y *Escherichia* son microorganismos encontrados al inicio del almacenamiento, mientras que los géneros *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Serratia* aparecen de forma más significativa después de un largo periodo de almacenamiento. Las concentraciones de los compuestos volátiles originados por la ruta de la lipoxigenasa son bajas en comparación con las altas concentraciones de los compuestos de nueva formación. En almacenamientos prolongados, es destacable la elevada concentración de ésteres debido a la actividad enzimática de los microorganismos *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Serratia* (Tabla 1.7).



Figura 1.10. Depósitos de almacenamiento de las aceitunas antes de la molienda.

El butanoato de etilo se ha detectado en aceites caracterizados con este defecto. Además, las concentraciones de propanoato de etilo, acetato de butilo, octano o el 3-metil-1-butanol, también presentes en aceites de buena calidad, se cuantifican a mayores concentraciones en aceites atrojados. Por el contrario, los compuestos producidos a través de la ruta de la lipoxigenasa presentan bajas concentraciones (Morales *et al.*, 2005). La elevada concentración del 6-metil-5-hepten-2-ona puede explicarse por la presencia de *Pseudomonas* responsables de degradar alcoholes terpénicos, geraniol y otros terpenoles abundantes en el aceite de oliva virgen (Berger, 1995). Los ácidos butanoico y propanoico presentan una elevada concentración en comparación con sus niveles trazas en EVOO. Este incremento se explica por los procesos inducidos por ciertas especies de *Clostridium* y *Propionibacterium* (Angerosa *et al.*, 1996).

Avinado-avinagrado

Característico aroma de ciertos aceites que se asemeja al vino o al vinagre. La principal razón es la producción de compuestos volátiles asociada con los procesos fermentativos debido a la contaminación microbiológica de las aceitunas que no han sido lavadas adecuadamente (COI, 2015a). La bacteria productora de ácido láctico, *Lactobacillus*, y la productora del ácido acético, *Acetobacter*, han sido detectadas en las aceitunas usadas para la obtención de aceites de oliva virgen (Angerosa *et al.*, 1996). Las acetobacterias son microorganismos que inducen procesos fermentativos y obtienen su energía a través de la oxidación de etanol a ácido acético, aumentando la producción de acetato de etilo y ácido acético (Tabla 1.7). Estos compuestos volátiles son los principales responsables de los descriptores sensoriales para este defecto. Además, hay que destacar la elevada concentración de octano (aunque menor concentración que en el defecto atrojado) y la concentración de nuevos compuestos como 1,3-butanediol y ácidos de 2 a 7 carbonos (Morales *et al.*, 2005).

Rancio

Es el aroma característico de aceites que al ser almacenados inadecuadamente estimulan el proceso de oxidación. La rancidez es uno de los problemas más importantes en el almacenamiento de alimentos, siendo el defecto sensorial más estudiado. El número y la concentración de volátiles dependen de la intensidad de la alteración del aceite. En aceites con este defecto sensorial predominan compuestos volátiles producidos por autooxidación frente a los producidos por biogénesis. Así, se ha observado una elevada concentración de aldehídos, principalmente producidos por la oxidación de los ácidos grasos insaturados, mientras que la presencia de ácidos se debe a la oxidación de los aldehídos previamente formados (Tabla 1.7); que indica una elevada alteración del aceite apareciendo estos compuestos al final del proceso oxidativo (Morales *et al.*, 2005).

En resumen, la percepción sensorial de defectos está relacionada con el número y el tipo de compuestos volátiles presentes en el aceite de oliva virgen. Sin embargo, no todos los compuestos de la fracción volátil tienen influencia en la calidad sensorial porque la contribución del volátil al aroma no depende sólo de su concentración sino también de su umbral del olor. Se entiende por umbral de olor, la menor concentración a la que se puede percibir el compuesto volátil en una matriz adecuada, aceite refinado en el caso del aceite de oliva virgen (Luna, 2003; Morales *et al.*, 2005; Morales *et al.*, 2013). La aportación de cada compuesto volátil al aroma depende, por tanto, del valor de la relación entre la concentración del compuesto en el aceite de oliva virgen y su umbral de olor determinado por asesores. Esta relación, denominada OAV (Odour Activity Value), debe ser mayor de la unidad para que el compuesto volátil contribuya al aroma; cuanto mayor sea el valor del OAV mayor será la influencia del compuesto en el aroma. La Tabla 1.7 muestra los compuestos volátiles que más influencia tienen en los cuatro defectos sensoriales mayoritarios en el aceite de oliva virgen. El descriptor sensorial corresponde a la caracterización como compuesto puro, ya que el descriptor puede variar dependiendo de su concentración; por ejemplo, el hexanal se caracteriza como “sebo, grasa” al 100% y “césped, hierba” en porcentajes inferiores.

El análisis sensorial del aceite de oliva virgen puede presentar un cierto componente subjetivo al trabajar con personas. La componente de incertidumbre y el error en la valuación se debe a que los seres humanos son bastante hábiles en detección y discriminación de olores, pero menos hábiles en identificación y denominación de olores (Yeshurun y Sobel, 2010). Además el sentido de olfacción se ve afectado por la existencia de un componente hedónico

del olor que depende de varios factores, como la intensidad del olor, la familiaridad, el nivel cultural y el tiempo de exposición al olor.

Tabla 1.7. Compuestos responsables de los principales defectos sensoriales y descriptores sensoriales.

Defecto sensorial	Compuesto químico	Descriptor sensorial
Atrojado-Borras	Octano	Alcano
	Butanoato de Etilo	Frutado
	Ácido Butanoico	Rancio
	Ácido Propanoico	Agrio, Moho
	3-Metil-1-Butanol	Avinado
Moho-Humedad-Tierra mojada	2-Metil-1-Propanol	Irritante, Pescado
	1-Octen-3-ol	Moho, Tierra
	1-Octen-3-ona	Seta, Moho
	Acetato de Etilo	Pegamento, Piña
	2-Heptanol	Tierra
	Ácido Acético	Avinagrado, Agrio
	E-2-Heptenal	Grasa, Oxidado
Ácido Propanoico	Agrio, Moho	
Avinado-Avinagrado	Ácido Acético	Avinagrado, Agrio
	Acetato de Etilo	Pegamento, Piña
	3-Metil-1-Butanol	Alcohol
Rancio	Pentanal	Aceitoso
	Hexanal	Sebo, Grasa
	Heptanal	Aceitoso, Grasa
	E-2-Heptenal	Grasa, Oxidado
	Octanal	Grasa
	Nonanal	Grasa

Existe pues, la necesidad de sustituir, o en su defecto acompañar, el sistema de evaluación sensorial del aroma (panel de cata) con la determinación de compuestos volátiles. Pero ese reto lleva aparejado dos desafíos: la determinación de los compuestos volátiles responsables del “flavor” y explicar la relación entre los compuestos volátiles y los atributos sensoriales del aceite. Desafíos que deben ser abordados mediante la combinación de técnicas analíticas y procedimientos estadísticos.

El principal desafío de la determinación de los volátiles es la perfección de la resolución cromatográfica que permita obtener valores óptimos de precisión, repetibilidad y reproducibilidad (Morales *et al.*, 2013) y un porcentaje de recuperación de los compuestos adecuada, además de determinar sus umbrales de olor (García-González y Aparicio, 2010). Numerosos artículos sobre la cuantificación de volátiles, en el aceite, no tienen en cuenta los porcentajes de recuperación antes de comparar las concentraciones con sus umbrales de olor.

Muy a menudo se asigna una recuperación del 100% cuando es, en la práctica, muy inferior. En esos casos, el potencial de contribución de volátiles al aroma puede estar subestimado cuando se calcula la actividad del olor (OAV).

Algunos autores usan relaciones entre áreas de compuestos para establecer categorías al aceite (VOO o EVOO). Así, si la razón entre etanol y E-2-hexenal es menor que 1, se ha propuesto que el aceite se categorice como aceite de oliva virgen extra (Bendini *et al.*, 2009). Sin embargo, esa propuesta no tiene en cuenta que la razón entre sus factores de respuesta es ya menor de la unidad (0,80), ni tampoco que el etanol difícilmente contribuye al aroma (OAV > 30 mg/kg), lo que convierte a la propuesta en una medida indirecta de la calidad con elevadas posibilidades de tener numerosos falsos positivos. La formación de etanol como consecuencia de procesos fermentativos, por encima de su concentración basal al ser la aceituna un vegetal, está en la base de la propuesta de usar la relación entre las concentraciones de metanol y etanol como un índice de calidad (Gómez-Coca *et al.*, 2014). La propuesta, sin embargo, no sólo adolece de los problemas citados de elevado valor de OAV sino también del método de determinación que no usa preconcentración, hecho inusual y rechazable en el aceite de oliva. Las medidas cuantitativas de esos compuestos tienen, por tanto, pésimos factores de respuesta.

La más amplia y profunda relación entre calidad y atributos sensoriales aparece descrita en la rueda sensorial de la Figura 1.11 de la empresa Sensory Applied Ltd que resume los resultados obtenidos por Aparicio *et al.* para explicar los principales defectos sensoriales del aceite de oliva con marcadores de compuestos volátiles, incluyendo su concentración mínima, umbral de olor, su etiología etc.

Por otro lado, los procesos fisiológicos implicados en la percepción del aroma y el sabor, que han sido poco explorados, forman parte de la información sensorial difusa asociada con la evaluación organoléptica del aceite por los panelistas y su percepción sensorial por los consumidores. La única referencia son los estudios para medir la respuesta hemodinámica del cerebro, mediante fMRI (Functional Magnetic Resonance Imaging) durante la exposición de sujetos (consumidores y panelistas expertos) a aromas del aceite y compuestos químicos responsables del aroma (García-González *et al.*, 2011). Los resultados preliminares con esta técnica están contribuyendo a una mejor comprensión de la percepción sensorial del aceite de oliva virgen.

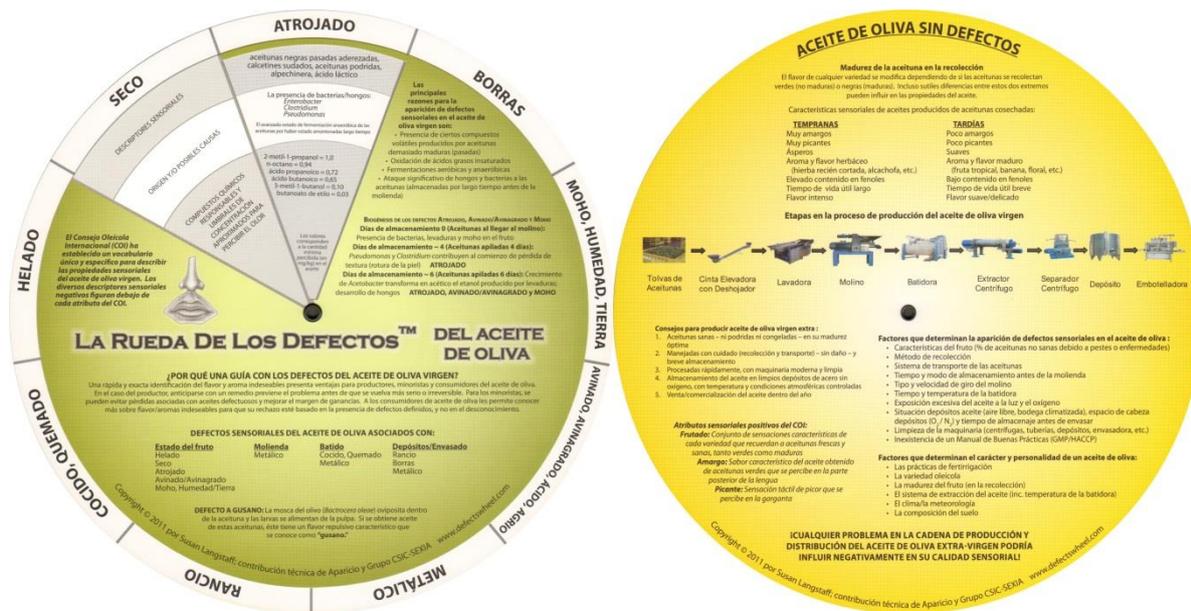


Figura 1.11. Rueda sensorial que describe los principales defectos sensoriales del aceite de oliva.

1.6.2. Compuestos fenólicos en aceite de oliva virgen

La composición fenólica forma parte de la fracción minoritaria del aceite de oliva virgen y está formada por un grupo químicamente heterogéneo (más de 230 compuestos) responsable del sabor del aceite. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios derivados de la ruta del ácido shikímico y del metabolismo de los fenilpropanoides. El término fenol define a sustancias que poseen un anillo de benceno unido a uno o más grupos hidroxilo, incluyendo derivados funcionales. Los fenoles pueden agruparse en ácidos fenólicos, fenoles simples, derivados de oleuropeína, flavonoides, lignanos e hidroxisocromonas (Tabla 1.8) (Tsimidou, 2013).

1.6.2.1. Formación de compuestos fenólicos

Las rutas biosintéticas de formación de los compuestos fenólicos comienzan con la ruta del ácido shikímico que toma como precursores fosfoenolpiruvato, procedente de la glicólisis, y eritrosa-4-fosfato, procedente de las pentosas, dando como resultado la fenilalanina. La fenilalanina entra en la ruta de los fenilpropanoides dando lugar a compuestos fenólicos como cumarinas, flavonoides, lignanos, ácidos benzoicos y derivados hidroxycinámicos. No obstante, se necesita la ruta del ácido mevalónico con el ácido deoxilogánico como compuesto de partida, donde se incorpora los derivados hidroxycinámicos para formar los compuestos secoiridoides (Figura 1.12).

Tabla 1.8. Compuestos fenólicos en aceite de oliva virgen.

<u>Ácidos fenólicos simples</u>	<u>Fenoles simples</u>	<u>Derivados de oleuropeína</u>
Siringico	Hidroxitirosol	Forma dialdehídica de aglucona de oleuropeína (3,4-DPHEA-EA)
Vainílico	Acetato de hidroxitirosol	
<i>p</i> -cumárico	Tirosol	Forma hidroxílica oxidada de aglucona de oleuropeína (3,4-DHPEA-EDA)
<i>o</i> -cumárico	Acetato de tirosol	
Gálico	Vainillina	
Cafeico		Forma dialdehídica de descarboximetil aglucona de ligustrósido (<i>p</i> -HPEA-EA)
Ferúlico	<u>Lignanos</u>	
<i>p</i> -hidroxibenzoico	(+)-1-Acetoxipinorresinol	Forma hidroxílica oxidada de aglucona de ligustrósido (<i>p</i> -HPEA-EDA)
Cinámico	(+)-pinorresinol	
Benzoico		Ácido enólico
<u>Flavonoides</u>		<u>Hydroxi-isocromanos</u>
Apigenina		
Luteolina		

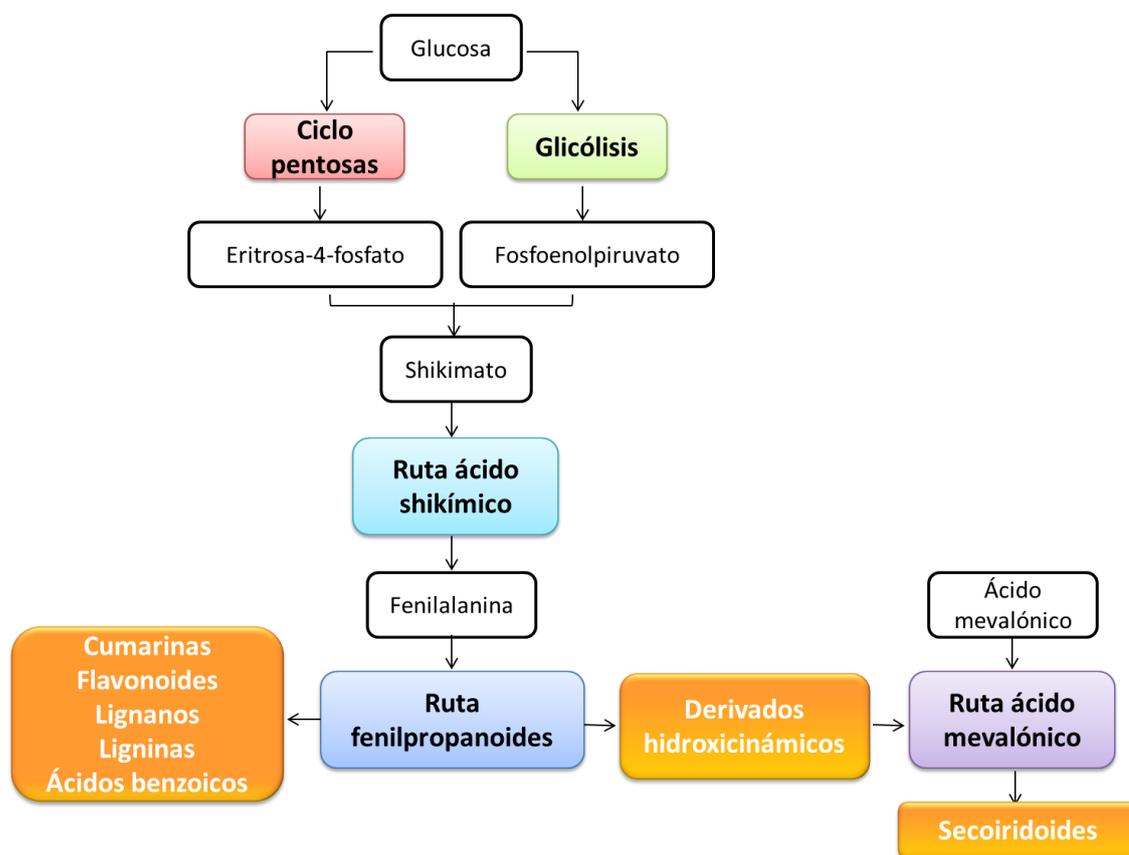


Figura 1.12. Rutas biosintéticas implicadas en la formación de compuestos fenólicos.

Ruta de fenilpropanoides. La fenilalanina se transforma en el tioéster *p*-cumaril-CoA por la acción de tres enzimas (fenilalanina amonio liasa, cinamato-4-hidroxilasa y *p*-cumaril-CoA ligasa), a partir del cual se desencadenan dos rutas de biosíntesis de compuestos, los monolignoles y los flavonoides (La Camera *et al.*, 2004; Noel *et al.*, 2005).

Ruta del ácido mevalónico. Los compuestos secoiridoides son compuestos propios de la familia oleácea. La biosíntesis de la oleuropeína y el ligustrósido, compuestos secoiridoides mayoritarios en la aceituna, es compleja y no está descrita completamente.

Según varios estudios (Damtoft *et al.*, 1993; 1995) se puede deducir que, a partir del ácido mevalónico, se produce una conversión directa del 7-cetologanina a oleósido-11-metil éster, seguido de una conversión a 7- β -1-D-glucopiranosil-11-metil oleósido y su esterificación con tirosol para formar el ligustrósido, y, finalmente, mediante hidroxilación formar la oleuropeína.

La acumulación de la oleuropeína en la aceituna se produce en la fase de crecimiento del fruto mientras que su concentración disminuye durante la fase de maduración (Malik y Bradford, 2006). En el proceso de maduración, la β -glucosidasa entra en contacto con la oleuropeína, produciendo su hidrólisis, lo que disminuye la intensidad de la percepción amarga. Durante el proceso de elaboración del aceite, sobre todo en las fases de molienda y batido en que el fruto sufre una rotura, la β -glucosidasa hidroliza los compuestos presentes en la aceituna (oleuropeína y ligustrósido) y los transforman en compuestos secoiridoides como 3,4-DHPEA-EA, 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EA y *p*-HPEA-EDA (Gómez-Rico *et al.*, 2009).

1.6.2.2. Métodos de análisis de compuestos fenólicos

El análisis de los compuestos fenólicos presenta interés desde el punto de vista sensorial, por su estabilidad oxidativa y por sus propiedades saludables (EFSA, 2011). Existen numerosos métodos de análisis ampliamente aceptados, sin embargo, sus resultados no son comparables.

Los métodos existentes presentan varios enfoques, el primero de ellos se basa en la separación individual de fenoles mediante HPLC, que está apoyado por el COI (COI, 2009); mientras que el segundo enfoque se basa en el contenido total de *o*-difenoles mediante métodos colorimétricos más rápidos y rentables. El inconveniente de estos métodos es la baja especificidad, ya que la reacción de color puede ocurrir en cualquier grupo hidroxilo que sea oxidable.

Extracción

Independientemente del método aplicado, el primer paso es la extracción de la fracción fenólica de la matriz.

Extracción líquido-líquido (LLE)

La extracción fenólica puede llevarse a cabo mediante LLE. Algunos autores (Pirisi *et al.*, 2000; Hrnčirik y Fritsche, 2004) han señalado que la recuperación de los compuestos fenólicos responsables del sabor amargo aumenta con la LLE. Además, LLE parece ser también más apropiada para la extracción de los fenoles oxidados (Armaforte *et al.*, 2007). Los disolventes más usados son metanol y agua, y las proporciones pueden ser: 80:20, propuesta del COI (COI, 2009), o 60:40, que es la más usada en la práctica.

Extracción en fase sólida (SPE)

La extracción de la fracción fenólica también puede realizarse en fase sólida. Los cartuchos más empleados son los de diol o C18, que necesitan la adición de un disolvente orgánico para eluir la muestra más fácilmente sin afectar a la recuperación de los fenoles.

Separación

Cromatografía líquida de alta resolución con detector de matriz de diodos (HPLC-DAD)

En la etapa de separación, las columnas de fase reversa han sido las de mayor éxito a pesar de que el tiempo de elución es generalmente largo (más de 40 minutos). La separación se lleva a cabo usando columnas tipo RP C18 (250 × 4 o 4,6 mm id) con mezclas de metanol y agua o de acetonitrilo enriquecidas con ácido acético, sulfúrico o fosfórico como fase móvil para eliminar la disociación de los fenoles y mejorar la asimetría de los picos. La composición inicial del eluyente debe tener una pequeña cantidad de fase orgánica (5%) que no debe alcanzar el 100% al finalizar el análisis. La calidad del agua utilizada para el análisis es esencial para evitar contrapresiones esperadas a ciertas proporciones.

La cromatografía líquida de alto rendimiento (UHPLC) con columnas de relleno con partículas de 1,7 µm acoplada a espectrometría de masas en tándem (LLE-UPLC-MS/MS) se ha aplicado con éxito hasta el punto de que los valores de los límites de detección y cuantificación (LOD y LOQ) son mejores que los obtenidos mediante HPLC-DAD, excepto en el ácido vainílico y pinorresinol (Suarez *et al.*, 2008). Aunque es una metodología más

rápida (18 minutos), que la establecida por el COI (COI, 2009), este tipo de instrumentación no está al alcance de la mayoría de los laboratorios.

Las técnicas de identificación y cuantificación dependen del objetivo del estudio y de la instrumentación disponible. En la última década, las técnicas de LC-MS se han extendido, aunque el análisis de rutina es menos demandado en cuanto a esta instrumentación. Por tanto, un buen sistema de detección puede ser un detector de matriz de diodos (DAD) con detector de fluorescencia. La longitud de onda estándar es 280 nm, aunque otras longitudes (225, 240 o 254 nm) son útiles para los constituyentes de las fracciones polares del aceite, mientras que los flavonoides se detectan a longitudes de ondas más altas (340 nm) (Tena *et al.*, 2015).

La espectrofotometría UV (200-290 nm) es de gran ayuda en la identificación de los fenoles y en el control de la pureza de los picos de HPLC, exceptuando los ácidos hidroxycinámicos que tienen un máximo entre 310 y 332 nm. Las diferencias entre los valores de longitudes de onda máximos y de absorción molar entre los diferentes fenoles afectan a la cuantificación (Tsimidou, 2013). El espectrofluorímetro, en tándem o no con DAD, es una herramienta valiosa en la identificación de fenoles ya que es más específico y sensible que la detección espectrofotométrica. Sin embargo, hay cierto interés en modificar la norma establecida por el COI (COI, 2009) mediante la adición de una etapa de hidrólisis previa a la cuantificación con HPLC-DAD y, además, se sugiere como método de rutina el método colorimétrico, bajo revisión, para verificar las propiedades saludables de los fenoles en el aceite. Esto, una vez más, aumenta la confusión entre analistas y que no producen resultados comparables y está en contra de la demanda actual de reducir al máximo el número de métodos estándares.

Se han estudiado otras alternativas para cuantificar los compuestos fenólicos. La espectrometría de masas ofrece un gran volumen de datos sobre los fragmentos derivados de los compuestos fenólicos. Por tanto, MS puede usarse en el análisis cuantitativo de la composición de fenoles basándose en la abundancia de los fragmentos. Por otro lado, la resonancia magnética nuclear (RMN) y RMN-MS son herramientas poderosas para el estudio estructural de los fenoles aislados que no son detectados por otros medios (Selvaggini *et al.*, 2006), aunque RMN no se usa todavía como análisis de rutina.

1.6.2.3. Estado del arte en la relación entre compuestos fenólicos y calidad del aceite de oliva virgen

Los compuestos fenólicos presentan actividad antioxidante que retardan la autooxidación del aceite de oliva virgen en las primeras etapas de almacenamiento (estabilidad oxidativa) (Aparicio *et al.*, 1999). Su eliminación provoca un rápido desarrollo de la oxidación. Además, contribuyen en el sabor del aceite, ya que el atributo amargo está fuertemente relacionado con los derivados de oleuropeína y ligustrósido, que parece estar influenciado por la cantidad de monoin saturados presentes en el aceite (García-Mesa *et al.*, 2008). Por tanto, una pobre concentración de fenoles origina una calidad organoléptica inferior – menor intensidad de los atributos amargo y picante – y un mayor riesgo de la percepción del defecto rancio en poco tiempo.

Las propiedades antioxidantes de los fenoles del aceite de oliva ha permitido que la EFSA recomiende una cantidad de ingesta diaria de hidroxitirosol y sus derivados estableciendo aquellos aceites con una concentración superior a 250 mg/kg beneficiosos para la salud (EFSA, 2011).

El rango de concentración de fenoles en aceite de oliva virgen es muy amplio ya que su composición se ve afectada por condiciones agronómicas, climáticas y tecnológicas (Tsimidou, 2013) y el tiempo transcurrido desde la recolección de las aceitunas. En cuanto a las variedades oleícolas, existen casi tanto perfiles cuantitativos como cultivares se han descrito (Bartolini *et al.*, 1998), recopilados en los numerosos estudios publicados (Galvano *et al.*, 2007; García-González *et al.*, 2010c; Sánchez de Medina *et al.*, 2015). En la mayoría de los aceites de oliva vírgenes, los derivados secoiridoideos de oleuropeína y ligustrósido son los compuestos mayoritarios aunque el contenido depende de la variedad. Por ejemplo, las variedades Arbequina o Picual presentan mayor contenido de derivados de la oleuropeína, mientras la variedad Picudo muestran mayor contenido de los derivados del ligustrósido (Gómez-Rico *et al.*, 2008).

Por otro lado, los factores ambientales también pueden producir cambios en el contenido total de fenoles. Numerosos estudios publican las diferencias significativas entre aceites obtenidos en la cuenca del Mediterráneo y en altas latitudes. Los aceites obtenidos de aceitunas recolectadas a bajas latitudes tienen mayor concentración de fenoles que los de altas latitudes (Mousa *et al.*, 1996; Criado *et al.*, 2004), lo que implica una mayor estabilidad oxidativa, más efectos beneficiosos para la salud y mejor calidad organoléptica. En cuanto a

la temperatura, Morelló *et al.* (2003) han descrito una disminución del contenido de los derivados secoiridoideos en aceites obtenidos tras helada. Esto se debe a la formación de cristales de hielos en el interior del fruto, que rompe los compartimentos celulares permitiendo el contacto de enzimas con los sustratos.

La mayor variación en la concentración de fenoles, que no en la modificación de su perfil inicial, es durante el proceso de batido y centrifugación mediante decantadores. Una temperatura elevada durante el batido, con la presencia de oxígeno, disminuye la concentración individual de los fenoles (Servili *et al.*, 2004; Aparicio y García-González, 2013). Para mejorar este proceso desde el punto de vista de la calidad final del aceite de oliva virgen se han propuesto algunas modificaciones, todas dirigidas a eliminar la presencia de oxígeno durante el proceso. El proceso de batido en una atmósfera de nitrógeno gaseoso evita la oxidación de los compuestos fenólicos y, por ende, su mayor concentración en el aceite final (Servili *et al.*, 2004; Iconomou *et al.*, 2010; Yorulmaz *et al.*, 2011). Otras propuestas, como el deshuesado de la aceituna (Ranalli y Contento, 2010; Yorulmaz *et al.*, 2011) tienen más inconvenientes que ventajas y no está verificado que incrementen de manera sustantiva el contenido de fenoles totales. La fase de la elaboración del aceite de oliva virgen que más influye en el contenido de fenoles es la centrifugación. Los decantadores de tres fases generan un contenido en fenoles notablemente inferior (30%) que los de dos fases ya que no usan agua durante el proceso de centrifugación (Di Giovacchino *et al.*, 2002; Gimeno *et al.*, 2002). En la fase de centrifuga, se ha visto que los compuestos fenólicos disminuyen (Tsimidou *et al.*, 2005; Fregapane *et al.*, 2006).

Además, el grado de madurez de las aceitunas tiene gran importancia en el contenido total de fenoles. A medida que las aceitunas maduran, la concentración de fenoles disminuye. Tras las primeras fases de la maduración en las que la oleuropeína es el compuesto mayoritario, su concentración disminuye durante el desarrollo fisiológico del fruto (Ranalli *et al.*, 2009). Este hecho está relacionado con una mayor actividad de las enzimas hidrolíticas en la maduración (Gómez-Rico *et al.*, 2008). García-González *et al.* (2010c) estudiaron el grado de madurez de diferentes cultivos de aceitunas y observaron diferencias significativas en el contenido individual y total de los fenoles.

La inclusión en el COI (COI, 2015a) de la determinación de los compuestos fenólicos como criterio de calidad es otro avance en la búsqueda de un procedimiento de análisis objetivo en la medida de la calidad del aceite. Sin embargo, la normal comercial no establece

valores para la concentración de los compuestos fenólicos en las diferentes categorías del aceite de oliva.

1.6.3. Clorofilas y derivados en el aceite de oliva virgen

El color es una de las características sensoriales básicas en la calidad de los alimentos. El color del aceite de oliva virgen extra se debe a la presencia de clorofilas y feofitinas, y en muy menor medida a la presencia de pirofeofitinas (Mínguez-Mosquera y Gandul-Rojas, 1995). La clorofila *a* y *b*, junto a la serie *b* de feofitinas y pirofeofitinas, aportan al aceite distintas gamas de colores verdes; mientras que la serie *a* de feofitinas y pirofeofitinas son las responsables del color pardo en el aceite. Sólo un 20% de las clorofilas del fruto están presentes en el aceite, quedando el resto en los subproductos (Gallardo-Guerrero *et al.*, 2002).

1.6.2.1. Formación de las clorofilas y derivados

La clorofila se encuentra dentro del grupo químico de las porfirinas, que es la estructura básica común a esta serie de compuestos formada por cuatro unidades de pirrol que tiene las posiciones alfas unidas por puentes metínicos formando un nuevo sistema aromático estable. Una de las características más destacable de las porfirinas es la facilidad para la formación de quelatos con iones metálicos, aislando el metal firmemente unido en el espacio que limitan los cuatro átomos de nitrógeno en el sistema plano.

Las clorofilas son compuestos estables en su ambiente natural. No obstante, una pérdida de las condiciones fisiológicas provoca una modificación estructural de los pigmentos originarios pasando a ser compuestos lábiles (Aparicio-Ruiz, 2008).

Los pigmentos clorofílicos se encuentran unidos a un átomo de magnesio pero en condiciones ácidas se produce su sustitución por hidrógeno, dando lugar a las feofitinas. En consecuencia, las feofitinas existirán siempre que se produzca pérdida de la integridad celular y se liberen ácidos, sin necesidad de agente químico que provoque el reemplazamiento del ion magnesio (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2010). Las pirofeofitinas son los derivados de la clorofila formados por la eliminación del grupo carboxi-metilo de la estructura de las feofitinas por acción de la temperatura (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2014) ya que un aumento de temperatura genera la descarboxilación del carbono de la posición 13 (Vergara-Domínguez *et al.*, 2011) (Figura 1.13).

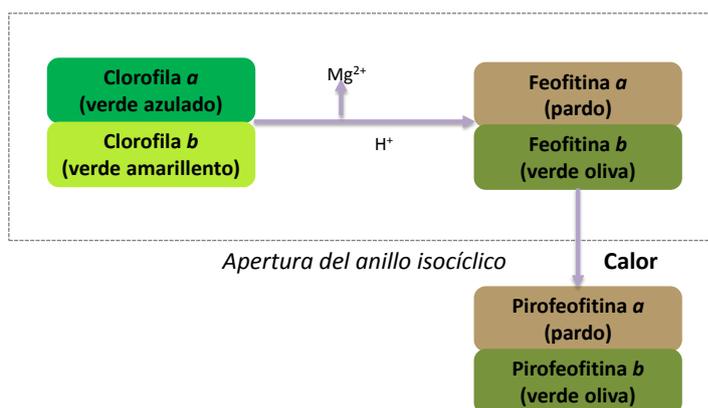


Figura 1.13. Esquema de formación de los derivados clorofílicos formados por la pérdida del ion Mg^{2+} y calor.

1.6.3.2. Métodos de análisis de clorofilas y sus derivados

La Normativa Europea y el COI no recogen el análisis de la clorofila y sus derivados como criterios de calidad del aceite de oliva virgen (CE, 2013; COI, 2015a). No obstante, se han desarrollado métodos para la determinación de los pigmentos clorofílicos (Hornero-Méndez *et al.*, 2005; Giuffrida *et al.*, 2007; Aparicio-Ruiz *et al.*, 2010), incluso centrados sólo en los pigmentos relacionados con procesos afectados por la temperatura (pirofeofitinas). El método descrito por Gertz y Fiebig (2006a), que es uno de los más empleados para la cuantificación de la pirofeofitina *a*, recogido por la International Standard Organization (ISO, 2009a) y la German Society for Fat Science (DGE, 2012).

Los compuestos clorofílicos forman parte de una matriz muy compleja, por tanto, deben ser extraídos y aislados de la matriz como paso previo a su identificación y cuantificación. La cuantificación se lleva a cabo con espectroscopia debido al grupo cromóforo de la estructura de la porfirina, que es capaz de absorber radiación en el espectro visible. El espectro de clorofila *a* (Figura 1.14) presenta una banda característica a 432 nm y otra de menor importancia a 410 nm, en la región azul-violeta. Además, presenta otro pico a 662 nm en la región del rojo, junto a otras bandas más pequeñas entre 500-700 nm. En el caso de feofitina *a* produce un desplazamiento hacia longitudes de onda menores, de 432 nm a 410 nm. Sin embargo, el desplazamiento de la segunda banda es hacia longitudes de onda mayores, de 662 nm a 666 nm (Figura 1.14). Las pirofeofitinas presentan el mismo espectro de absorción que sus correspondientes precursores (Figura 1.14) (Gandul-Rojas *et al.*, 2013).

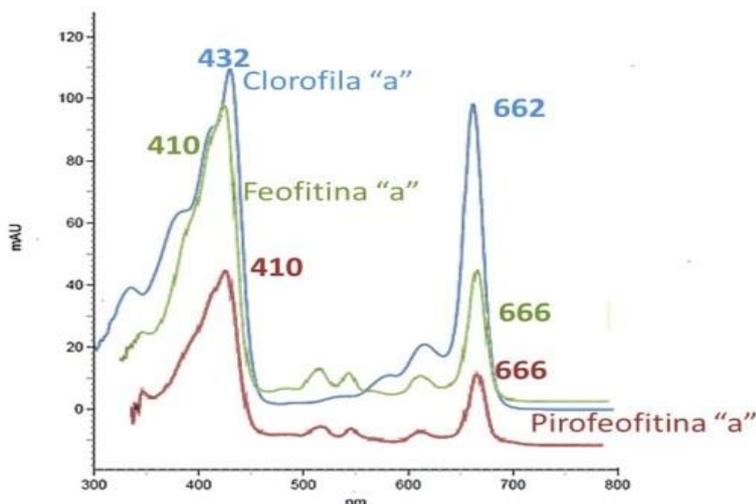


Figura 1.14. Espectros de absorción de clorofila *a*, feofitina *a* y pirofeofitina *a*.

Extracción

Extracción líquido-líquido (LLE).

Los métodos LLE han permitido la separación de los pigmentos clorofílicos debido a la diferencia de solubilidad en dos disolventes inmiscibles, N,N-dimetilformamida (DMF) y hexano (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1992). Las clorofilas y sus derivados se retienen en DMF, debido a su polaridad y el resto de pigmentos se extraen en hexano. Los inconvenientes del método (gran volumen de muestra y de disolventes) se han reducido en nuevas propuestas (Maia *et al.*, 2008), mientras que permanecen sus ventajas (selectividad, repetibilidad, límite de cuantificación, etc.). Cuando el objetivo del análisis es obtener la información del perfil completo de los pigmentos se emplea la LLE con DMF (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1992).

Extracción en fase sólida (SPE).

El procedimiento de preconcentración mediante SPE presenta mínimos riesgos de pérdidas o contaminación. La bibliografía del aceite de oliva describe la técnica SPE con absorbente de sílica gel como la técnica de purificación más simple, versátil y económica para la extracción de pirofeofitinas (Gertz y Fiebig, 2006a). La parte no polar del analito es eluida con éter etílico y la fracción de pirofeofitinas con acetona. El punto crítico del método es la recogida de la muestra en pequeñas cantidades de acetona, que debida a su alta volatilidad debe ser un paso rápido.

Separación

Cromatografía líquida de alta resolución con detector de matriz de diodos (HPLC-DAD).

La técnica cromatográfica usada actualmente para el análisis de los pigmentos en el aceite es HPLC-DAD. Esta técnica puede ser clasificada en dos grupos, fase estacionaria normal o fase estacionaria reversa. El sistema más generalizado, si sólo se pretende cuantificar la pirofeofitina y algunos otros pigmentos básicos, es el sistema de fase estacionaria reversa (Gertz y Fiebig, 2006a; Giuffrida *et al.*, 2007). Por el contrario, si el objetivo es la cuantificación de carotenoides, clorofilas y sus derivados, se usa el método basado en la fase estacionaria normal (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1992).

Los métodos fluorimétricos son más selectivos y sensibles que los espectrofotométricos, pero no se han usado de forma rutinaria para la identificación y cuantificación de clorofilas. Aun así, se han detectado y cuantificado clorofilas y sus derivados en cantidades de picomoles (Sayago *et al.*, 2004).

1.6.3.3. Estado del arte en la relación entre la clorofila y derivados y calidad del aceite de oliva virgen

El nivel de los pigmentos clorofílicos encontrados en el aceite de oliva virgen depende de factores genéticos, del estado de maduración del fruto, de los procesos de extracción y de las condiciones de almacenaje (Guillaume *et al.*, 2014; García *et al.*, 2013). Además, existen estudios que verifican que el contenido de clorofilas varía según la altitud a la que esté situado el cultivo. Por ejemplo, en aceites obtenidos en zonas de la cuenca del Mediterráneo el contenido de clorofilas disminuye respecto a aceites obtenidos de aceitunas cultivadas en altitud. Esto se debe a que la altitud contribuye en la maduración del fruto, ya que permite un aumento en el contenido de clorofilas (Moussa *et al.*, 1996). Además, se ha demostrado que existen diferencias en el contenido de pigmentos según la variedad, siendo la variedad Hojiblanca y Picual las que presentan un mayor contenido frente a otras como Arbequina (Roca y Mínguez-Mosquera, 2001). Por ello, existe cierta controversia a la hora de establecer el contenido inicial de los pigmentos del aceite.

La determinación de algunos pigmentos clorofílicos ha sido propuesta como método para establecer la calidad y la adulteración del aceite de oliva. Es el caso de la pirofeofitina *a*, ya que su formación se ve afectada por la temperatura (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2010), se ha relacionado su presencia con el uso de aceites desodorizados (Serani y Piacenti, 2001;

Aparicio-Ruiz *et al.*, 2010; 2012). La desodorización a bajas temperaturas (< 100 °C) permite la eliminación de los compuestos volátiles responsables de los defectos sensoriales (Bada-Gancedo *et al.*, 2002), sin embargo, se ha observado que produce un incremento de la concentración de pirofeofitina *a* (Gandul-Rojas *et al.*, 2013). Así, el porcentaje de pirofeofitina *a* se ha sugerido como un marcador químico de la degradación del aceite (Gandul-Rojas *et al.*, 1999, Gallardo-Guerrero *et al.*, 2005). Incluso, existen algunas normativas que han establecido la pirofeofitina *a* como marcador de calidad del aceite de oliva, fijando el límite para aceites de oliva vírgenes extra menor al 17% de pirofeofitinas (AS, 2011; CDFa, 2014; DGE, 2012; SANS, 2013).

Generalmente, se ha relacionado el contenido de pirofeofitina *a* como indicador de la calidad, sin embargo, existe cierta confusión entre los conceptos calidad y fresca del aceite. Estos conceptos son independientes (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2014), ya que aceites no frescos (largo período desde su extracción) y obtenidos de aceitunas de buena calidad presentan mejor calidad que aceites frescos y obtenidos de aceitunas dañadas. Aparicio-Ruiz *et al.* (2014) han desarrollado un modelo predictivo para la estimación del contenido de pirofeofitina *a* en aceites almacenados a diferentes temperaturas. Los resultados mostraron la influencia de la temperatura sobre el pigmento y su utilidad en el seguimiento del almacenamiento del aceite de oliva. De este modo, es incuestionable que la fresca se ha convertido en un parámetro de gran interés, así como, poder cuantificar este parámetro y llegar a establecer una fecha de consumo preferente adecuada a la temperatura durante el almacenamiento del aceite.

1.6.4. Ésteres alquílicos en aceite de oliva virgen

Los ésteres alquílicos de ácidos grasos (FAAEs) son una familia de la fracción saponificable del aceite. Mariani y Fedeli (1986) identificaron estos compuestos por primera vez y aislaron la fracción no polar del aceite de oliva virgen mediante cromatografía líquida.

1.6.4.1. Formación de ésteres alquílicos en aceite de oliva virgen

Los FAAEs son lípidos naturales que pueden formarse por dos vías, a partir de la esterificación de los ácidos grasos libres o de la transesterificación de los ácidos grasos libres primarios derivados de los triglicéridos con alcoholes de bajo peso molecular (Biedermann *et al.*, 2008a). La esterificación de ácidos grasos libres es una conocida reacción de segundo orden que tiene lugar en medio ácido y es catalizada por ciertas enzimas. Esta reacción depende en gran medida de los reactivos (ácidos grasos libres), del alcohol y de la

temperatura (Pérez-Camino *et al.*, 2008). La esterificación es ligeramente más rápida que la transesterificación, pero si el contenido de ácidos esterificados es elevado la transesterificación será la ruta de formación de los ésteres (Biedermann *et al.*, 2008a).

Los FAAEs están compuestos por los ésteres metílicos (FAMEs) y etílicos (FAEEs), que se producen por el uso de prácticas inadecuadas en la cosecha y/o en el almacenamiento de las aceitunas antes de la obtención del aceite de oliva. Esto provoca la ruptura de la drupa y permite el contacto con microorganismos (formación de etanol) y/o enzimas lipolíticas y pectolíticas (formación de metanol). La concentración total de FAMEs es el sumatorio de las concentraciones de palmitato de metilo, oleato de metilo y linoleato de metilo; y la concentración total de FAEEs es el sumatorio de palmitato de etilo, oleato de etilo y linoleato de etilo.

1.6.4.2. Métodos de análisis de ésteres alquílicos

El método oficial propuesto por el COI (COI, 2012), que sustituye al propuesto en 2010, permite la determinación simultánea de ceras y ésteres alquílicos. El método es recomendado como una herramienta útil para distinguir entre aceites de oliva vírgenes y orujo, así como parámetro de calidad en aceites de oliva vírgenes extra. Además, la determinación de ésteres alquílicos está incluida en el árbol de decisión que permite verificar si una muestra de aceite de oliva es consistente con la categoría de aceite que declara (CE, 2013).

Extracción

El método oficial para la determinación de ésteres alquílicos (COI, 2012) describe la extracción mediante columna de vidrio tradicional empaquetada con gel de sílice. La limitación de este tipo de columna es el tiempo de preparación y la baja repetibilidad del método.

El COI ha modificado el volumen de la columna empaquetada de 15 g (2010) a 3 g (2012), lo que reduce la preconcentración de la muestra, pero aumenta la dificultad de manejo. Además, la velocidad de flujo del hexano: éter dietílico (99:1) de aproximadamente 15 gotas cada 10 segundos no es fácil para analistas inexpertos.

Pérez-Camino *et al.* (2002) describieron la extracción de ésteres alquílicos con cartuchos de SPE de sílica gel previamente condicionados.

Separación

Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)

El COI propone un método conjunto que permite separar ceras y ésteres alquílicos según el número de carbonos. El análisis está basado en cromatografía de gases con detector de ionización de llama.

Un grupo de expertos del COI ha presentado una propuesta en 2014 de mejora del método. Esta propuesta consiste en la combinación de tres métodos (el método de ésteres alquílicos, de ácidos grasos y de ácido grasos *trans*) en un solo método ya que los métodos son muy similares y comparten parte del protocolo.

Una alternativa interesante es el uso de un método basado en GCMS, sin preparación de la muestra y con termodesorción directa con un criofocalizador en el inyector del instrumento (Boggia *et al.*, 2014). Este método es más rápido, simple, requiere menor cantidad de disolventes orgánicos y mejora significativamente la repetibilidad.

1.6.4.3. Estado del arte en la relación entre ésteres alquílicos y calidad del aceite de oliva virgen

Los FAAEs se originan debido a reacciones producidas en aceitunas de baja calidad que requieren la presencia de una concentración adecuada de ácidos grasos libres, la presencia de metanol procedente de la desmetilación de la pectina del fruto y/o la presencia de etanol procedente de la fermentación del azúcar del fruto; lo que produce aceites de oliva de baja calidad.

Pérez-Camino *et al.* (2002) han estudiado las concentraciones de FAAEs en aceites caracterizados con diferentes defectos sensoriales. La concentración de FAAEs es mayor que la de FAMEs en aceites caracterizados con el defecto atrojado como consecuencia de la fermentación que sufren las aceitunas durante el almacenamiento en pilas previa a la obtención del aceite (Pérez-Camino *et al.*, 2002). Estos resultados se confirmaron al estudiar aceites con defectos relacionados con procesos fermentativos (atrojado, borras, avinado-avinagrado) frente a no fermentativos (rancio y helada) (Gómez-Coca *et al.*, 2012). Gómez-Coca *et al.*, (2012) confirmaron que los FAAEs y los datos del panel de cata serían complementarios en la clasificación de los aceites de oliva. La consecuencia es que se ha

considerado que los FAAEs están relacionados con las categorías del aceite aunque esta relación es meramente casual, así como su relación con la calidad sensorial.

Basado en argumentos empíricos sin base teórica (no hay un mínimo estudio de cinética de formación de los FAAEs, o una relación causal con las percepciones organolépticas, etc.), los organismos reguladores consideraron que si la concentración de ésteres alquílicos se encontraba entre 75-150 mg/kg, la relación entre los FAEEs y FAMEs debería ser igual o menor a 1,5 para considerar un aceite de oliva virgen extra. La experiencia indica, sin embargo que un virgen extra contiene una cierta cantidad FAMEs, pero el contenido de FAEEs debe encontrarse a nivel de trazas. En consecuencia, la sola determinación de FAEEs sería suficiente para determinar la calidad, y las regulaciones actuales (COI, 2015a; CE, 2013) proponen una concentración máxima de 30 mg/kg para el total FAEEs. No obstante, este método y su regulación clasificarían como virgen extra a aceites con defectos no relacionados con procesos fermentativos; por ejemplo, rancio, madera, helado, pepino, etc.

Por otro lado, los FAAEs también se han relacionado con los aceites desodorizados. Según Pérez-Camino *et al.* (2008), estos compuestos pueden usarse como marcadores de calidad del aceite, ya que permite la detección de la adición fraudulenta de aceites desodorizados en aceites de buena calidad. Sin embargo, cuando la desodorización se lleva a cabo a temperaturas bajas (< 100 °C) no es posible la detección de aceites ya que la desodorización leve permite la reducción de los FAAEs enmascarando la adulteración. No obstante, se han realizado estudios que corroboran que los FAAEs podrían ser un marcador de calidad para la detección de este fraude, pero solamente cuando se emplea un máximo de 30% de aceite desodorizado (Jabeur *et al.*, 2015).

1.6.5. Diacilgliceroles en aceite de oliva virgen

Los diacilgliceroles o diglicéridos (DAG) son compuestos liposolubles derivados de los triacilglicéridos (TAG) que tienen dos radicales de ácidos grasos. DAG están presentes en el aceite de oliva en un intervalo de 1 a 3% y son encontrados como 1,2- y 1,3-isómeros, según la posición de los radicales de ácidos grasos (León-Camacho *et al.*, 2013).

1.6.5.1. Formación diacilgliceroles

Los DAG se encuentran en el aceite de oliva virgen como 1,2- y 1,3-isómeros, 1,2-isómeros se atribuyen a la biosíntesis incompleta de TAG (ruta Kennedy). En esta ruta de

formación de TAG está constituida por cuatro reacciones, y es la tercera enzima implicada (fosfatidato fosfatasa) la responsable de hidrolizar el sustrato hasta producir el DAG. Por otro lado, los 1,3-isómeros se atribuyen a la hidrólisis enzimática o química de TAG que ocurre antes o durante el proceso de extracción del aceite (Amelotti *et al.*, 1989). Además los 1,3-isómeros han sido atribuidos a la isomerización de 1,2-DAG durante el almacenamiento (Pérez-Camino *et al.*, 2001; Spyros *et al.*, 2004).

1.6.5.2. Métodos de análisis de diacilgliceroles

El método oficial propuesto por el COI (COI, 2013b) permite la determinación de los DAG y TAG conjuntamente. TAG se agrupan en base a su número de átomos de carbono, mientras que los DAG se resuelven en función de su número de átomos de carbono y su estructura, los 1,2-isómeros tienen menor tiempo de retención que los 1,3-. En el método puede observarse que la precisión intermedia calculada mediante RSD% es mayor en aceites de oliva vírgenes extra que en aceites adulterados con un 10% o 5% de aceites extraños, lo que demuestra que la reproducibilidad del método es mejor para aceites adulterados. No obstante, este método no ha sido testado en aceites adulterados con aceites refinados a baja temperatura, lo que presenta un problema frente a este hecho fraudulento y cada vez más empleado en la industria.

Además del método propuesto por el COI, se han desarrollado diferentes métodos para la determinación de los DAG en el aceite de oliva (Gertz y Fiebig, 2006b; Pérez-Camino *et al.*, 1996).

Extracción

La mayoría de los métodos desarrollados presentan la etapa de extracción, excepto el método propuesto por el COI que describe la purificación de la muestra con el patrón interno y agente silanizante. La ventaja del método oficial descrito por el COI es la eliminación de la parte de aislamiento de la fracción de diacilgliceroles (COI, 2013b).

Extracción en fase sólida (SPE).

El método desarrollado por Pérez-Camino *et al.* (2001) propone como modo de extracción los cartuchos de extracción en fase (SPE) sólida de diol. Con este método la purificación está comprendida en dos etapas: la primera, que es desechada y la segunda fracción, que se derivatiza con agente silanizante.

Extracción con LC.

Por otro lado, el método propuesto por Gertz y Fiebig (2006b) utiliza como modo de aislamiento columnas en miniatura de gel de sílice, una vez aislada también necesita el paso de adición de agente silanizante.

Separación

Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)

En el caso de la separación, los métodos descritos están de acuerdo y se basan en la cromatografía de gases con detector de ionización de llama para la separación de los DAG según su número de carbonos y su estructura (Pérez-Camino *et al.*, 2001; Gertz y Fiebig, 2006b; COI, 2013b).

El método del COI (2013b) y el método propuesto por Pérez-Camino *et al.* (2001) basan su cuantificación en patrón interno; mientras que el método de Gertz y Fiebig (2006b) lo basa en tiempos de retención de los estándares de referencia.

El tipo de inyector también difiere según el método, tanto Pérez-Camino *et al.* (2001) como Gertz y Fiebig (2006b) describen el inyector de tipo divisor de flujo (*split*), mientras que el método del COI (2013b) emplea inyector de tipo *on-column*.

1.11.4 Estado del arte de diacilgliceroles en aceite de oliva virgen

Los aceites de oliva vírgenes extraídos a partir de aceitunas sanas contienen casi exclusivamente 1,2-isómeros, mientras que los aceites obtenidos de aceitunas de baja calidad presentan mayor contenido de 1,3-isómeros (Pérez-Camino *et al.*, 1996). Durante los últimos años, se ha estudiado el papel de los DAG como posibles marcadores de adulteración del aceite de oliva virgen. Uno de los primeros estudios, desarrollado por Pérez-Camino *et al.* (2001) argumentaron que durante el almacenamiento se observa una disminución de los 1,2-isómeros y un aumento de 1,3-isómeros (Pérez-Camino *et al.*, 2001). Esto se debe a una isomerización de los 1,2- a los 1,3-isómeros, que son más estables termodinámicamente. Por tanto, los autores concluían que durante el almacenamiento la relación 1,3/1,2-DAG y el contenido total de DAG aumenta y que esto depende de la acidez del aceite, por tanto, depende de la calidad del aceite inicial.

Estudios posteriores argumentaron que la isomerización de los DAG, que tiene lugar a lo largo del tiempo, no se ve afectada por las condiciones de almacenamiento (Caponio *et al.*, 2013). Por tanto, los autores concluían que el contenido total de DAG y la relación de 1,3/1,2-DAG no varían según las condiciones de almacenamiento o por las variables del aceite. En consecuencia, el contenido total de DAG y la relación de 1,3-/1,2-DAG podrían ser utilizado como índice de frescura de un aceite de oliva virgen extra (Caponio *et al.*, 2013)

La relación 1,3- /1,2-DAG o la relación 1,2-DAG/ (1,2-DAG + 1,3-DAG) son índices útiles para evaluar el tiempo de almacenamiento del aceite (Pérez-Camino *et al.*, 2001; Fronimaki *et al.*, 2002). Sin embargo, estas investigaciones no son capaces de especificar la duración del almacenamiento según la concentración total de diacilglicéridos.

Por otro lado, Gertz y Fiebig (2006b) han sugerido esta relación como parámetro que permite evaluar la calidad del aceite. Este método también propone la relación de isómeros como un hipotético marcador para la detección de aceite desodorizado en aceites. Según diferentes normativas, el contenido de 1,2-DAG es considerado como un marcador de calidad del aceite de oliva. Estas normas (AS, 2011; CDFFA, 2014; SANS, 2013), basadas en la norma ISO 29822 (ISO, 2009b), proponen el porcentaje de 1,2-DAG igual o mayor de 35% para un aceite de oliva virgen extra. El gobierno alemán (DEG, 2012) establece el límite legal para este compuesto igual o mayor de 40% para aceites de oliva vírgenes extra. No obstante, el COI ha propuesto un método para la determinación de los DAG (COI, 2013b) pero aún no ha establecido en su norma comercial los valores para las diferentes categorías del aceite de oliva.

La diferencia en la formación de isómeros de DAG ha sido propuesta tanto para determinar la autenticidad de aceites de oliva como para distinguir categorías del aceite. Sin embargo, la relación de los DAG con la calidad sensorial es meramente un resultado casual aunque se ha observado relación con defectos del aceite resultantes de los procesos hidrolíticos; por ejemplo, antes del procesado de las aceitunas (por ejemplo, atrojado-borras) o cuando se utilizan para la decantación los contenedores verticales, entre otros (Tena *et al.*, 2015).

1.7. Estudio de las normativas vigentes del aceite de oliva virgen

Existen diferentes fuentes normativas y jurídicas que han regulado tradicionalmente la producción del aceite de oliva virgen y el comercio internacional. Además existen otros

reglamentos vigentes en algunos nuevos países productores como Australia, Sudáfrica o USA (California) o países, como Alemania, que se rigen por sus normas. Además de las normas comerciales del COI para sus miembros, formado por la mayoría de los países productores, existen regulaciones específicas dentro de la Unión Europea (UE) que controlan la mayor parte del mercado mundial de aceite de oliva.

La existencia de un mercado mundial del aceite de oliva se ve protegida por la normativa del *Codex Alimentarius*. Tanto las normas del COI como del Codex son aceptadas voluntariamente por los países productores e importadores.

Las diferentes normativas se desarrollaron para controlar tanto la calidad como la adulteración. En el caso de la determinación de compuestos químicos como marcadores de autenticidad del aceite se han propuesto numerosas técnicas por parte de los investigadores. La mayoría de estos métodos propuestos, sin embargo, sólo pueden detectar adulteraciones superiores al 10%, lo que no presentan ninguna ventaja sobre los métodos oficiales actuales.

El gran número de métodos y técnicas analíticas que existen en la actualidad no han podido evitar que existan adulteraciones difíciles de detectar, como por ejemplo, la adición de aceites de oliva vírgenes desodorizados, a baja temperatura y vacío, a aceites de oliva vírgenes extra (Biedermann *et al.*, 2008b); ya que los aceites resultantes no pueden ser detectados como fraudulentos incluso con la cuantificación de pirofeofitinas y esteres etílicos (García-González y Aparicio, 2010a).

Los métodos oficiales también han permitido determinar la autenticidad de las categorías de aceites de oliva virgen, aunque se han señalado numerosos casos de aceites de oliva vírgenes etiquetados como vírgenes extra, aplicando las normativas actuales del COI y la UE (Mailer *et al.*, 2010). Los problemas actuales requieren una mejora de los métodos oficiales o desarrollar otros nuevos que no solo solucionen los problemas, sino que también reduzcan los numerosos métodos oficiales que requieren de elevados gastos en mano de obra y tiempo.

Si comparamos la norma comercial del COI para la calidad del aceite de oliva virgen con las implantadas en nuevos países productores (Australia, Estados Unidos y Sudáfrica) se observan diferencias. La Tabla 1.9 muestra las diferencias existentes en los parámetros de pureza y descritos calidad en las distintas normas comerciales.

Tabla 1.9. Criterios de calidad establecidos por diferentes normativas para aceites de oliva vírgenes extra.

	COI	Estados Unidos ¹	Australia ²	Alemania ³	Sudáfrica ⁴
Criterios de pureza					
Composición en ácidos grasos (% m/m ésteres metílicos)					
Ácido mirístico	≤ 0,03	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,03	≤ 0,05
Ácido palmítico	7,50-20,00	-	7,00-20,00	7,50-20,00	7,00-20,00
Ácido heptadecenoico	≤ 0,30	-	≤ 0,40	≤ 0,30	≤ 0,40
Ácido oleico	55,00-83,00	-	53,00-85,00	55,00-83,00	53,00-85,00
Ácido linoleico	2,50-21,00	-	2,50-22,00	3,50-21,00	2,50-22,00
Ácido linolénico	≤ 1,00	-	≤ 1,50	≤ 1,00	≤ 1,50
Ácido gadoleico	≤ 0,40	-	≤ 0,50	≤ 0,40	≤ 0,50
Composición en esteroides y en dialcoholes triterpénicos					
Estigmasterol	≤ 1,4	≤ 1,9	≤ 1,9	-	≤ 1,9
Campesterol	≤ 4,0	-	≤ 4,8	-	≤ 4,8
Betasitosterol aparente	≥ 93,00	-	≥ 92,50	-	≥ 92,50
Contenido en estigmastadienos (mg/kg)	≤ 0,05	≤ 0,10	≤ 0,10	-	≤ 0,10
Criterios de calidad					
Acidez libre (% m/m)	≤ 0,80	≤ 0,50	≤ 0,80	≤ 0,30	≤ 0,80
Índice de Peróxidos (mEq. O ₂ /kg aceite)	≤ 20,00	≤ 15,00	≤ 20,00	≤ 6,5	≤ 20,00
K ₂₃₂	≤ 2,50	≤ 2,40	≤ 2,50	≤ 1,92	≤ 2,50
K ₂₇₀	≤ 0,22	≤ 0,22	≤ 0,22	≤ 0,13	≤ 0,22
Pirofeofitina (%)	-	≤ 17	≤ 17	≤ 17 ⁵	≤ 17
1,2-Diacilglicéridos (%)	-	≥ 35	≥ 35	≥ 40 ⁵	≥ 35
FAMES y FAEEs	FAEEs ≤ 35 mg/kg	-	-	FAEEs ≤ 30 mg/kg	-

Nota: ¹, California Department of Food and Agriculture (2014); ², Australian Standards (2011); ³, German Society for Fat Science (2015); ⁴, South African National Standards (2013); ⁵, German Society for Fat Science (2012).

En el caso de los criterios de pureza, se observan diferencias en la composición en ácidos grasos. Las normas de Australia y Sudáfrica son idénticas, en cuanto a los criterios de purezas si las comparamos con los valores establecidos por el COI, sus valores varían. Alemania mantiene los valores establecidos por el COI, mientras que California solo establece la medida del ácido mistérico. En cuanto a la composición en esteroides, también se observan diferencias en las normas de California, Australia y Sudáfrica.

En cuanto a los criterios de calidad, tanto Australia como Sudáfrica establecen los mismos valores que el COI; siendo Alemania la que establece estos parámetros de calidad muy diferentes a los establecidos por el COI. En el caso de la determinación de 1,2-DAG, el COI (2013b) ha establecido el método pero no ha establecido los límites para los VOO. Mientras que las normativas vigentes en Australia, California establece el límite para un aceite de oliva virgen un porcentaje mayor a 35%, con la excepción de Alemania que lo establece $\geq 40\%$. Del mismo modo, estas normativas han establecido el límite de las pirofiteínas detectadas en aceites de oliva virgen extra en un porcentaje inferior a 17%. El problema es que, no por ello, un aceite de fresco tiene por qué ser de buena calidad. Sin embargo, a diferencia del COI y la normativa alemana, el resto de normativas no recogen la determinación de ésteres alquílicos como criterio de calidad.

Además, hay que tener en cuenta que las condiciones climáticas y la latitud son diferentes entre los países de la cuenca Mediterránea y los nuevos países productores. Esas diferencias influyen en la concentración y perfil de la composición química. Por ejemplo, esteroides (4-desmetilesterol y 4,4-dimetilesterol; Azadmard-Damirchi y Dutta, 2006; 4-monometilesteroides; León-Camacho *et al.*, 2013) y ácidos grasos (palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico; León-Camacho *et al.*, 2013).

Las diferencias climáticas y geográficas son responsables de que aceites de oliva de la misma variedad oleícola presenten perfiles y composiciones muy diferentes cuando provienen de zonas geográficas muy distantes; por ejemplo, hemisferios norte y sur (García-González *et al.*, 2010b).

La ampliación de las zonas productoras más allá de la cuenca mediterránea e incluso del hemisferio ha modificado enormemente el perfil composicional de los aceites de oliva, y convertido el comercio en mundial. Este hecho condiciona el ajuste de parámetros de autenticidad y calidad inicialmente pensados para un mercado localizado. Los límites de esos parámetros según la norma comercial del COI no tienen en cuenta las variaciones naturales

propias del aceite de oliva virgen, y tendrán que ser modificadas para adaptarse a las nuevas zonas productoras para evitar la existencia de numerosos falsos positivos sin por ello perder fiabilidad y eficiencia en su defensa del aceite de oliva frente potenciales y reales adulteraciones.

Por otra parte, todas las investigaciones sobre métodos analíticos, sensoriales y/o fisiológicos ayudarán a que la evaluación sensorial mediante panel de expertos pueda ser si no prescindible si suplementada, en mayor o menor medida, con la información química, lo que evitará las críticas actuales a la subjetividad de la evaluación de la calidad organoléptica de los aceites de oliva vírgenes.



Objetivos

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es evaluar la validez de distintos marcadores del aceite de oliva virgen como verdaderos indicadores de calidad, estableciendo en cada caso su utilidad real y haciendo especial hincapié en las debilidades, fortalezas y oportunidades de cada uno de ellos.

Este objetivo se divide en varios objetivos parciales:

1. Validación de un método analítico que permita llevar a cabo la identificación y cuantificación de los compuestos volátiles responsables de defectos sensoriales del aceite de oliva virgen utilizando un procedimiento de cromatografía de gases con detector FID (GC-FID) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Además de evaluar la eficacia del método en la detección de defectos sensoriales del aceite de oliva virgen y establecer su papel como marcadores de calidad.
2. Estudiar el perfil de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen de distintas categorías y obtener información sobre su relación con la calidad.
3. Estudiar el perfil de compuestos volátiles y fenólicos, así como los criterios de calidad, del defecto sensorial denominado helada para llevar a cabo su caracterización.
4. Evaluar el perfil de derivados clorofílicos del aceite de oliva virgen de distintas categorías y conocer su utilidad en el estudio de la calidad.
5. Estudiar el perfil de ésteres alquílicos del aceite de oliva virgen de diferentes categorías y establecer relaciones con la calidad.
6. Evaluar el perfil de diacilgliceroles del aceite de oliva virgen de diferentes categorías y conocer la utilidad como marcadores de calidad.
7. Llevar a cabo un análisis comparativo de los parámetros de calidad estudiados.

La Figura 2.1 muestra el plan de trabajo, según diagrama de flujo, que se seguirá para el logro de los objetivos anteriormente descritos.

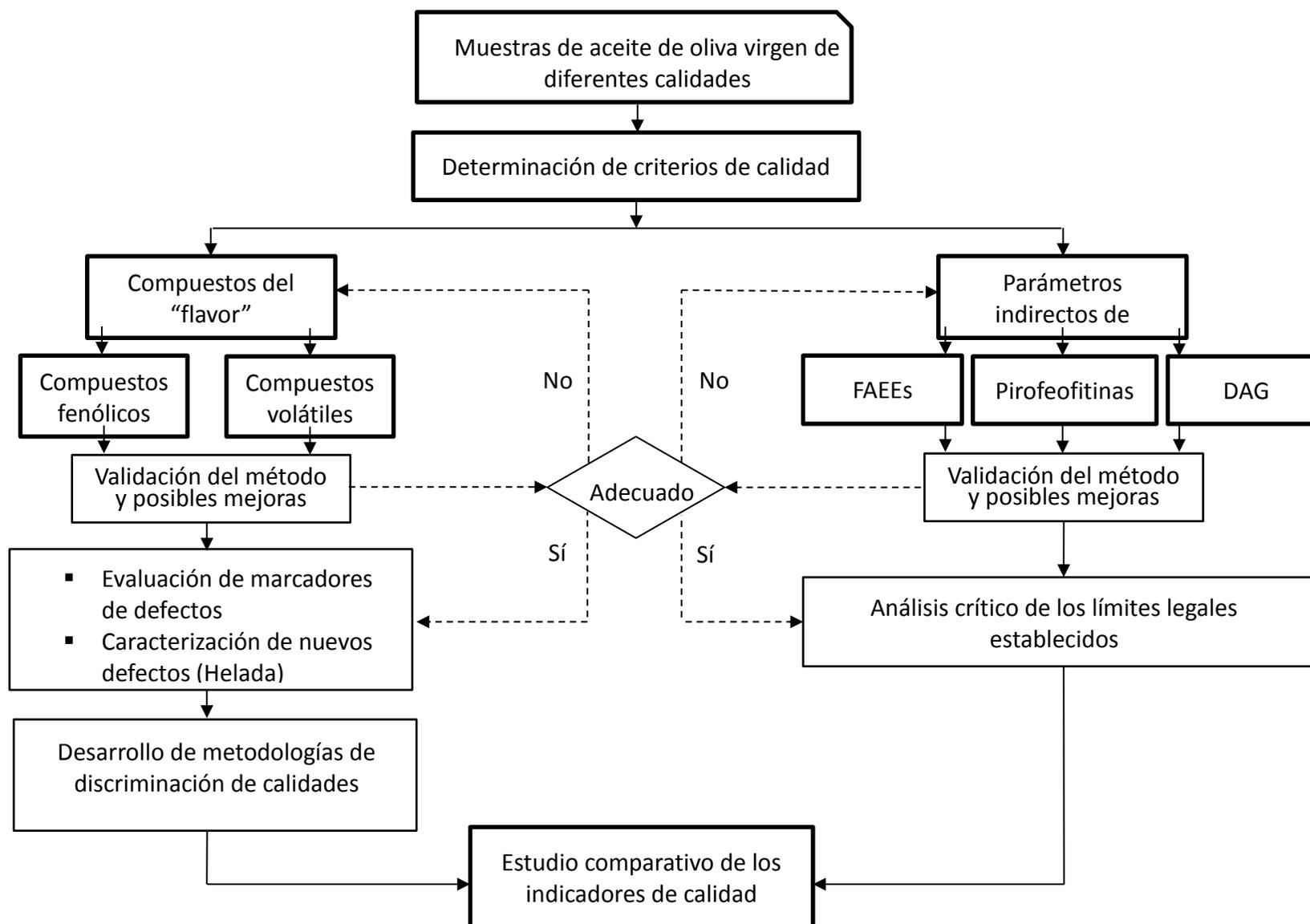


Figura 2.1. Plan de trabajo para el logro de los objetivos.



Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Muestras y reactivos

3.1.1. Muestras

En esta tesis se han usado diferentes muestras que se describen a continuación.

La Tabla 3.1 muestra los aceites de oliva vírgenes usados en la evaluación de la calidad sensorial mediante el estudio de compuestos fenólicos y volátiles. Estas muestras proceden de diferentes productores de Andalucía.

Tabla 3.1. Variedad, categoría y defectos sensoriales de las muestras procedentes de diferentes cooperativas usadas en el estudio de la calidad sensorial.

Código	Variedad	Categoría	Defecto sensorial	Defecto secundario
F1	Picual	OVOO ¹	Avinado ⁴	Rancio
F2	Hojiblanca	VOO	Avinado	Moho
F3	Hojiblanca	OVOO	Avinado	Moho
F4	Hojiblanca	OVOO	Moho ⁵	Avinado. Atrojado
F5	Picual	VOO ²	Moho	Atrojado. Rancio
F6	Picual	OVOO	Moho	Atrojado
F7	Hojiblanca	OVOO	Moho	Avinado
F8	Hojiblanca	OVOO	Atrojado ⁶	Moho
F9	Hojiblanca	OVOO	Atrojado	Moho
F10	Picual	OVOO	Atrojado	Moho
F11	Picual	VOO	Atrojado	Moho
F12	Picual	VOO	Atrojado	Moho
F13	Picual	VOO	Madera-humedad	Avinado
F14	Cornicabra	VOO	Madera-humedad	Atrojado
F15	Cornicabra	VOO	Madera-humedad	Avinado
F16	Picual	OVOO	Helada	Rancio
F17	Picual	VOO	Helada	Moho. Avinado
F18	Hojiblanca	EVOO ³	-	-
F19	Hojiblanca	EVOO	-	-
F20	Hojiblanca	EVOO	-	-
F21	Hojiblanca-Lechín- Manzanilla	EVOO	-	-
F22	Arbequina	EVOO	-	-

Nota: ¹, aceite de oliva virgen corriente; ², aceite de oliva virgen; ³, aceite de oliva virgen extra; ⁴, avinado-avinagrado; ⁵, moho-humedad-tierra mojada; ⁶, atrojado-borras.

Dentro de la validación de los métodos basados en GCMS y en GC-FID, para el estudio de precisión y de selectividad se usó un aceite de oliva virgen de variedad Hojiblanca procedente de Sierra de Yeguas (Málaga). Además, se usó una muestra caracterizada sensorialmente con el defecto rancio (mediana de defectos ~ 5) proporcionada por el Consejo Oleícola Internacional (COI).

Para la determinación de exactitud, linealidad y límites de detección y cuantificación se usó un aceite de oliva refinado completamente desodorizado, proporcionado por la empresa Aceites del Sur S.L., al que se le añadió diferentes concentraciones de patrones volátiles (0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 1,0, 3,0, 6,0, 10,0, 15,0 mg/kg) a partir de una disolución madre de 20 mg/kg.

La Tabla 3.2 muestra los aceites de oliva vírgenes usados como conjunto de validación de los métodos basados en GCMS y en GC-FID proceden de diferentes productores.

Tabla 3.2. Variedad, categoría y defectos sensoriales de las muestras procedentes de diferentes productores.

Código	Variedad	Categoría	Defecto sensorial	Mediana defecto	Mediana frutado	Atributos de sabor	
						Amargo	Picante
F23	Arbequina	VOO ¹	Avinado ⁵	2,1	2,1	2,5	3,1
F24	Hojiblanca	VOO	Avinado	2,5	2,7	2,2	3,2
F25	Arbequina	VOO	Avinado	2,2	2,2	2,3	2,5
F26	Picual	VOO	Moho ⁶	2,2	2,2	2,5	3,2
F27	Picual	VOO	Moho	2,5	2,2	2,5	3,2
F28	Manzanilla	LVOO ²	Moho	6,7	0,0	0,0	0,0
F29	Picual	VOO	Moho	2,2	2,1	2,8	3,4
F30	Hojiblanca	VOO	Moho	2,2	2,7	2,2	3,2
F31	Picual	VOO	Moho	3,0	1,8	2,8	3,3
F32	Picual	OVOO ³	Moho	6,0	0,0	0,0	0,0
F33	Picual	VOO	Moho	2,1	2,5	4,6	4,8
F34	Picual	VOO	Moho	2,2	2,0	3,0	3,9
F35	Picual	VOO	Moho	2,0	2,0	4,0	4,0
F36	Picual	OVOO	Moho	5,4	0,0	0,0	0,0
F37	Picual	LVOO	Helada	6,3	0,0	0,0	0,0
F38	Arbequina-Manzanilla	EVOO ⁴	-	0,0	4,9	4,3	4,2

Nota: ¹, aceite de oliva virgen; ², aceite de oliva virgen lampante; ³, aceite de oliva virgen corriente; ⁴, aceite de oliva virgen extra; ⁵, avinado-avinagrado; ⁶, moho-humedad-tierra mojada.

Para el estudio del defecto helada se usaron 22 muestras de diferentes variedades y origen geográfico, caracterizadas con el defecto helada proporcionadas por Dcoop S.A. (Antequera, España). La Tabla 3.3 muestra los aceites con este defecto. Para evaluar la calidad de las muestras heladas también se usaron 9 muestras de aceite de oliva virgen extra, 6 de ellas usadas en el estudio de validación (F18-F22y F38, Tabla 3.1) y 2 aceites de variedades Hojiblanca. Además, se usó una muestra caracterizada sensorialmente con este defecto (mediana de defectos ~ 2) proporcionada por el COI.

Por último, para el estudio de los pigmentos clorofílicos, diacilgliceroles y ésteres alquílicos se usaron las 38 muestras descritas en las Tablas 3.1 y 3.2.

Además, para la determinación de pigmentos clorofílicos en el estudio de almacenamiento bajo diferentes condiciones se usaron 6 aceites comerciales categorizados

como EVOO (A1-A6). Estos aceites se almacenaron, bajo condiciones controladas, en botellas de cristal de color topacio, 3 de ellos estuvieron refrigerados a 4 °C y otros 3 a temperatura ambiente (~25°C).

Tabla 3.3. Variedad, categoría y origen geográfico de las muestras caracterizadas con el defecto helada.

Código	Variedad	Categoría	Origen geográfico
H1	Picual	VOO ¹	Jaén
H2	Picual	VOO	Granada
H3	Picual	VOO	Jaén
H4	Hojiblanca	VOO	Málaga
H5	Picual	LVOO ²	Granada
H6	Cornicabra	VOO	Ciudad Real
H7	Picual	VOO	Granada
H8	Cornicabra	VOO	Ciudad Real
H9	Hojiblanca	OVOO ³	Málaga
H10	Hojiblanca	OVOO	Málaga
H11	Hojiblanca	VOO	Málaga
H12	Hojiblanca	VOO	Málaga
D1	Hojiblanca	VOO	Málaga
D2	Cornicabra	VOO	Ciudad Real
D3	Hojiblanca	VOO	Córdoba
D4	Picual	OVOO	Granada
D5	Picual	VOO	Granada
D6	Hojiblanca	VOO	Málaga
D7	Cornicabra	VOO	Ciudad Real
D8	Picual	VOO	Granada
D9	Hojiblanca	VOO	Málaga
D10	Hojiblanca	OVOO	Málaga

Nota: ¹, aceite de oliva virgen; ², aceite de oliva virgen lampante; ³, aceite de oliva virgen corriente.

Para completar el estudio de los ésteres alquílicos se usaron 5 muestras de referencia caracterizadas con defectos sensoriales proporcionadas por el COI. Las medianas de defecto para cada uno de ellos fueron: atrojado (5,70), avinado-avinagrado (8,50), moho-humedad (4,65), borras (8,0) y rancio (8,65) (R1-R5).

3.1.1.1. Muestras ensayo aceitunas congeladas

Para el estudio tentativo llevado a cabo con aceitunas congeladas se usaron 3,60 kg de aceitunas maduras de variedad Arbequina. El aceite fue obtenido mediante molino experimental denominado Abencor®, que reproduce el proceso del trabajo de una almazara industrial a pequeña escala. El almacenamiento de las aceitunas se ha descrito en la Sección 4.3.4.

Para obtener el aceite, se trituro las aceitunas en el molino de martillos obteniéndose una pasta homogeneizada inmediatamente. A continuación, se le añade talco (aproximadamente 50 g) y se somete la pasta a un proceso de batido durante 20 minutos. Una vez pasado el tiempo de batido se le añaden 100 ml de agua caliente y se vuelve a batir durante 10 minutos. Por último, la pasta se somete a centrifugación (3500 rpm) durante 1 minuto, obteniéndose el aceite que se recoge junto con el agua de vegetación en una probeta graduada de 500 ml. Se deja decantar durante unos 30 minutos y se filtra (Martínez-Suárez *et al.*, 1975).

3.1.2. Reactivos

Los reactivos se han agrupado de acuerdo con la tipología de los métodos de análisis en los que han sido usados.

3.1.2.1. Análisis de compuestos volátiles

La Tabla 3.4 muestra los distintos patrones de volátiles usados en la identificación de compuestos y en el estudio analítico de validación de los métodos desarrollados y/o aplicados en esta tesis (véase §3.2.1.4.1).

3.1.2.2. Análisis de compuestos fenólicos

- Ácido *p*-hidroxifenilacético, ácido *o*-cumárico, ácido vainílico, vainillina, ácido cinámico y ácido ferúlico de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Acetato de etilo y hexano, calidad HPLC, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Metanol, acetonitrilo y ácido *o*-fosfórico, calidad HPLC, de Romil (Barcelona, España).

3.1.2.3. Análisis de clorofilas y derivados

- Hexano, acetona y ácido clorhídrico, calidad HPLC, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Sulfato de sodio, pureza >99,9% de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Metanol y éter etílico, calidad HPLC, de Romil (Barcelona, España).
- Clorofila *a*, extracto de espinaca, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Tabla 3.4 Características químicas, sensoriales y de seguridad de los compuestos volátiles.

Compuesto	Pureza	PM ⁵	Características sensoriales	Seguridad
Acetato de etilo ¹	99%	88,11	Piña, pegamento	A, D
Ácido acético ²	99,8%	60,05	Fuerte, picante-agrio	A,B
Ácido butanoico ¹	≥99,5%	88,11	Rancio, sudor, queso	Peligroso
Ácido propanoico ¹	99,5%	74,08	Picante, rancio	B, E
Ácido pentanoico ¹	≥99%	102,14	Podrido, fecal, sudoroso, rancio	B,
Butanoato de etilo ³	≥98%	116,16	Dulce, manzana	A, C
1-Butanol ¹	≥99%	74,12	Frutado, medicinal	A, B, C
2-Butanol ¹	99,5%	74,12	Frutado, medicinal	A, C
Etanol ²	≥99,8%	46,07	Dulce	A
Heptanal ³	95%	114,19	Rancio, cítrico, grasiento	A, B, C
2-Heptanol ¹	99%	116,20	Tierra, moho, dulce	A, C
2-Heptanona ¹	98%	114,19	Frutado, especiado, canela	A, F
(E)-2-Heptenal ¹	98%	112,17	Grasa, oxidado	A, E
Hexanal ¹	≥98%	100,16	Graso, verde, césped, sebo	A, G
1-Hexanol ¹	≥99,5%	102,18	Alcohólico, etéreo, medicinal	D, H
(E)-2-Hexenal ¹	97%	98,15	Intenso, hojas, verde, frutado	A, D, H
E-3-Hexen-1-ol ³	≥98%	100,16	Astringente, amargo	A, C, D
2-Metil-1-butanol ¹	≥98%	88,15	Avinado, cebolla	A, C
3-Metil-1-butanol ¹	≥99,5%	88,15	Malta, whisky, quemado	A, C, D
2-Metil-butanoato de etilo ³	99%	130,18	Dulce, fresa	A
4-Metil-2-pentanona ¹	99%	100,16	Dulce	A
6-Metil-5-hepten-2-ona ³	99%	126,20	Herbáceo, verde, aceitoso, picante	A, C
Nonanal ¹	97%	142,24	Floral, cítrico, naranja, rosa, graso, ceroso	G
Octanal ¹	≥98%	128,22	Graso, cítrico, miel en disolución	A
Octano ¹	≥99%	114,23	Alcano	A (fácilmente)
3-Octanona ³	≥98%	128,21	Herbáceo, verde	A, B
1-Octen-3-ol ¹	≥98%	128,22	Moho, tierra	C
1-Octen-3-ona ³	50% ⁴	---	Champiñón, moho	C
Pentanal ¹	≥98%	86,14	Leñoso, vainilla, frutado, nuez en disolución	A, E, G
3-Pentanona ³	99%	86,13	Éter, alcohol	A, B
1-Penten-3-ona ¹	98%	84,12	Picante, mostaza	A, B, C
Propanoato de etilo ¹	98%	102,12	Fresa, dulce	A

Nota: ¹, casa comercial Fluka; ², casa comercial Aldrich; ³, casa comercial Panreac; ⁴, en mezcla con 1-octen-3-ol; ⁵, PM, peso molecular; A, material inflamable; B, material corrosivo; C, material tóxico; D, material que irrita ojos y/o piel; E, no respirar sus vapores/nocivo por inhalación; F, material nocivo por ingestión; G, material que irrita ojos, piel y vías respiratorias; H, material nocivo por contacto piel e ingestión.

3.1.2.4. Análisis de ésteres alquílicos

- Hexano y heptano, calidad HPLC, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Gel de sílice, 60-200µm de malla, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Éter etílico, calidad HPLC, de Romil (Barcelona, España).
- Heptadecanoato de metilo y Sudan 1 (1-phenylazo-2-naphtol) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.1.2.5. Análisis de diacilgliceroles

- Hexano, heptano, diclorometano y cloroformo, calidad HPLC, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Metanol y éter etílico, calidad HPLC, de Romil (Barcelona, España).
- 1,3-dipalmitato de glicerilo de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Reactivo silanizante (1:3:9) trimetilclorosilano, hexametilsilazano y piridina, de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

3.2. Materiales, instrumentación y procedimientos analíticos

3.2.1. Análisis de compuestos volátiles

3.2.1.1. Materiales

- Viales de vidrio de 20 ml de capacidad (Anorsa, Barcelona, España) con tapones de aluminio-estaño de 10 mmØ con septum de silicona de 10 mmØ × 3 mm de grosor (Tecknokroma, Barcelona, España).
- Encapsulador y descapsulador (Tecknokroma, Barcelona, España).
- Micropipeta de 0,5 µl (Treff, Degersheim, Suiza).
- Fibras de SPME de 1 cm de longitud recubierta con una fase estacionaria (50/30 µm de espesor) de divinilbenceno-carboxeno-polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS) (Supelco, Bellefonte, PA).
- Columna capilar TRB-WAX de sílice fundida (60 m × 0,25 mm × 0,25 µm) (Teknokroma, Barcelona, España).
- Columna capilar VF-5MS de sílice fundida (50 m × 0,25 mm × 0,25 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).
- Columna capilar VF-WAX de sílice fundida (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

3.2.1.2. Aparatos

- Balanza de precisión AB-304-S (Mettler Toledo, Barcelona, España), con apreciación de cuatro decimales.
- Abencor® MC2 (Ingenierías y Sistemas S.L.), molino experimental de laboratorio que consta de 3 elementos (molino de martillos, termobatidora y centrífuga) (Figura 3.1).

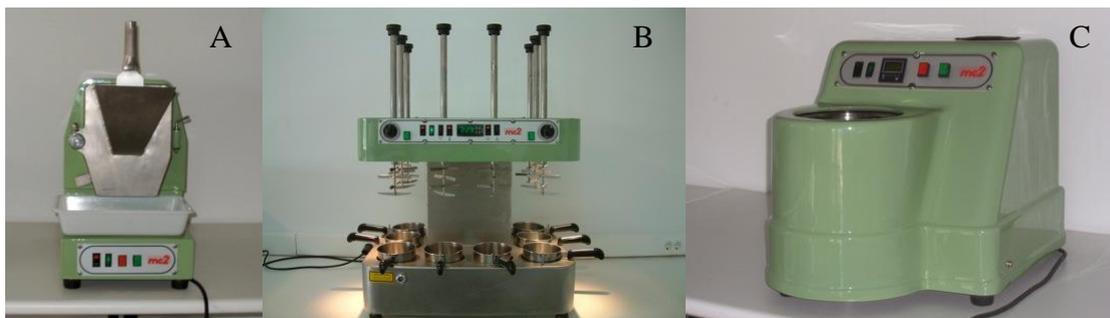


Figura 3.1. Abencor®. (A) Molino de martillos, (B) termobatidora y (C) centrífuga.

- Generador de hidrógeno Clan Hydrogen AD-260 (Clan Tecnológica, Sevilla, España) de tecnología PEM (electrolito polimérico de estado sólido), que trabaja con agua desionizada, cuyas principales características son: pureza mayor del 99,99%, conductividad del agua inferior a 5 μS , flujo máximo 260 cc/min y presión alcanzable 4,5 bares.
- Muestreador CombiPal (Figura 3.2) equipado con dos dispositivos de inyección directa para muestras líquidas y gaseosas y SPME. El equipo consta de 2 porta bandejas y 2 bandejas destinada a viales de capacidad 1, 2, 10 y 20 ml y un sistema calefactor con agitador (0 rpm – 500 rpm) (CTC Analytics, Zwingen, Suiza).

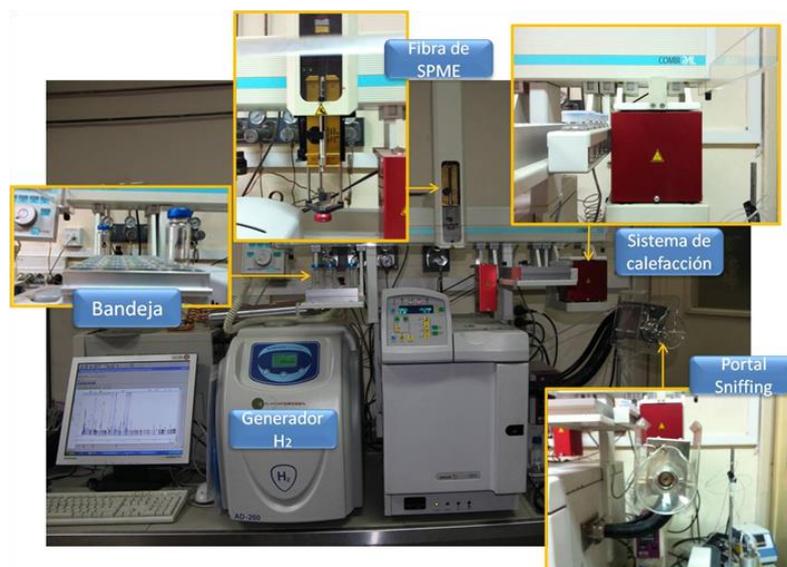


Figura 3.2. Muestreador automático CombiPal, cromatógrafo Varian 3900 GC y generador de hidrógeno Clan Hidrógeno AD-260.

- Dispositivo de espacio de cabeza estático para fibras de SPME. Este dispositivo ha sido utilizado para la preconcentración de los compuestos volátiles de modo manual. El dispositivo está constituido por un agitador magnético con un sistema calefactor KM02 de IKA®-Werke (Staufen, Alemania), como se observa en la Figura 3.3. A este sistema calefactor se le acopla el vial donde se deposita la muestra.



Figura 3.3. Dispositivo de espacio de cabeza estático para preconcentración manual de los compuestos volátiles con fibra SPME.

3.2.1.3. Instrumentación

- Cromatógrafo de gases (GC-FID) Varian 3900 GC (Palo Alto, CA) equipado con un detector de ionización de llama (FID), muestreador automático CombiPAL (ya descrito), inyector split-splitless modelo Varian 1177 con adaptador para SPME y columna capilar TRB-WAX de sílice fundida también descrita anteriormente. El sistema al completo se muestra en la Figura 3.2.
- Sistema de detección olfatométrica OP275 (ATAS, Veldhoven, Netherlands) acoplado al cromatógrafo de gases Varian 3900 GC (Palo Alto, CA) (Figura 3.4). El acoplamiento se realiza mediante un divisor de flujo situado al final de la columna cromatográfica que permite el acceso simultáneo al detector FID y al puerto de detección olfatométrica. El instrumento está equipado con un cono nasal de cristal (ATAS, Veldhoven, Netherlands) unido a una columna capilar desactivada (1 m × 0,25 mm), que conecta con el divisor citado, y está humidificada con aire a 40 °C.

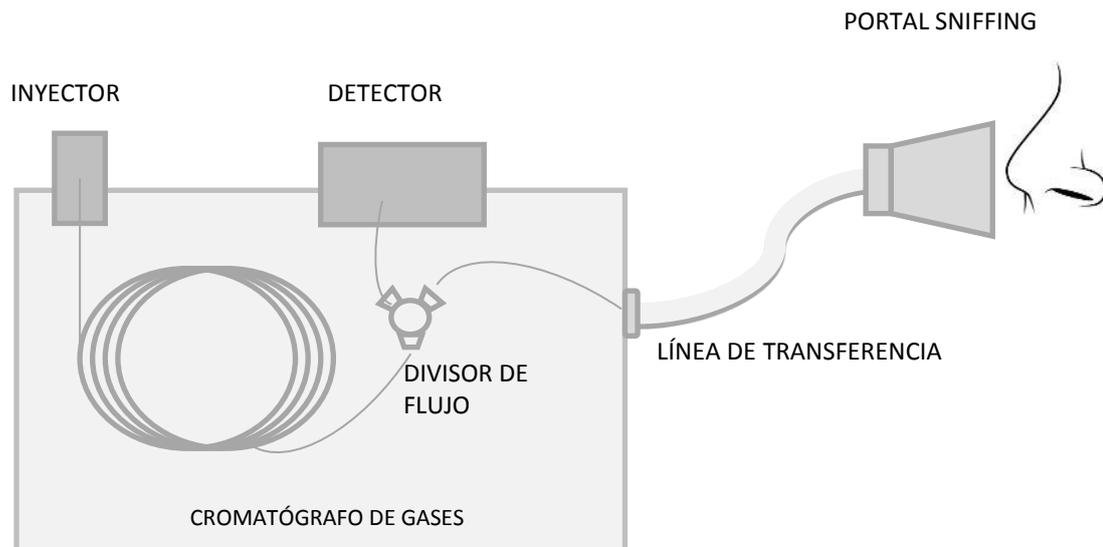


Figura 3.4. Esquema del acoplamiento del sistema de detección olfatométrica y cromatógrafo de gases.

- Cromatógrafo de gases 7820A Agilent Technologies acoplado a espectrómetro de masas Serie MSD 5975 Agilent Technologies (GCMS) (Santa Clara, CA) con analizador cuadrupolo y fuente de ionización por impacto electrónico (70eV) (Figura 3.5). El cromatógrafo tiene un inyector split-splitless adaptado para SPME y una columna capilar TRB-WAX de sílice fundida descrita anteriormente.

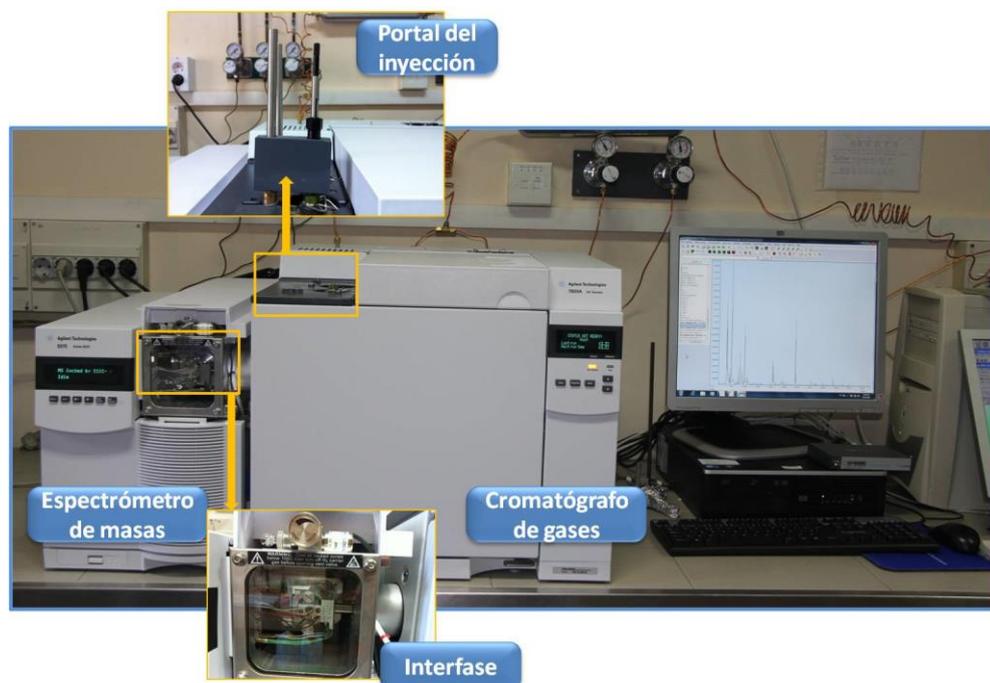


Figura 3.5. Cromatógrafo de gases 7820A Agilent Technologies acoplado a espectrómetro de masas 5975 MSD Agilent Technologies con inyector split-splitless adaptado para SPME.

- Cromatógrafo de gases bidimensional Bruker 450GC×450GC acoplado a espectrómetro de masas Bruker 300 MS con analizador triple cuadrupolo y fuente de ionización por impacto electrónico (70eV) (Bruker, Billerica, MA) (GC-GCMS) (Figura 3.6). El cromatógrafo inicial está equipado con un detector de ionización de llama (FID), muestreador automático CombiPAL (ya descrito), inyector split-splitless con adaptador para SPME y columna capilar VF-WAX, ya descrita. Este cromatógrafo posee un modulador que permite el paso a la columna del segundo cromatógrafo, VF-5MS ya descrita.



Figura 3.6. Cromatógrafo de gases bidimensional 450GC×450GC Bruker acoplado a espectrómetro de masas 300MS Bruker con inyector split-splitless adaptado para SPME y muestreador automático CombiPal.

3.2.1.4. Procedimientos analíticos

3.2.1.4.1. Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)

El método requiere de una etapa de preconcentración de compuestos volátiles previa a la cromatografía de gases que se realiza mediante SPME. La elección del recubrimiento de la fibra se realizó basándose en estudios previos (García-González *et al.*, 2004) en los que se observó que su respuesta era superior a otros tipos de fibras SPME (por ejemplo, PDMS y CAR/PDMS) obteniéndose un mayor número de compuestos volátiles presentes en el espacio de cabeza de las muestras objeto de este estudio. Es necesario acondicionar la fibra SPME de tres fases (DVD/CAR/PDMS) antes de su primera utilización manteniéndola en el inyector del cromatógrafo a 270 °C durante 68 minutos. Este acondicionamiento se realiza con el fin

de eliminar la película de recubrimiento que presenta la fibra y, así, evitar posibles interferencias en los análisis posteriores.

El procedimiento analítico se inicia pesando 2 g de aceite de oliva en un vial encapsulado de 20 ml y se calienta a 40 °C durante 10 minutos, bajo agitación, en el calentador del muestreador automático CombiPal (Figura 3.2). Una vez transcurrido ese tiempo, en el que se ha alcanzado el equilibrio, se introduce la fibra de SPME en el vial durante 40 minutos.

La desorción de los compuestos volátiles, atrapados en la fibra SPME, se lleva a cabo en el inyector del cromatógrafo, en modo splitless, que se calienta a 260 °C durante 5 minutos. El gas portador es hidrógeno, con una presión en cabeza de 20 psi y un flujo constante de 1,5 ml/min y el gas auxiliar es nitrógeno. El programa de control del horno se inicia con una isoterma a 40 °C durante 4 minutos, a la que sigue una rampa de temperaturas de 3 °C/min hasta alcanzar 200 °C, que se mantiene durante 10 minutos. La temperatura del detector se fija a 280 °C. La información de las muestras se almacena mediante el programa Star Chromatography Workstation, System Control versión 6 (Palo Alto, CA).

3.2.1.4.2. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GCMS)

El procedimiento de preconcentración de la muestra con SPME también es aplicable a este método que se inicia pesando 2 g de aceite de oliva en un vial de 30 ml y se calientan a 40 °C durante 10 minutos, bajo agitación, en el dispositivo manual de muestreo de espacio de cabeza estático, anteriormente descrito (§3.2.1.2). Una vez alcanzado el equilibrio, se introduce la fibra en el vial durante 40 minutos como muestra la Figura 3.2.

La desorción de los compuestos volátiles se lleva a cabo en el inyector del cromatógrafo de gases, en modo splitless, que se calienta durante 5 minutos a 280 °C. La temperatura del detector se fija a 300 °C y la línea de transferencia a 280 °C. El gas portador es hidrógeno, con una presión en cabeza de 4,97 psi a flujo constante de 0,9 ml/min y el gas auxiliar es nitrógeno. El programa de control de horno es igual al que se sigue en el método anterior (§3.2.1.4.1.).

El espectrómetro de masas trabaja en modo Scan con una sensibilidad ajustada a un rango de masas de 40-300. La información de las muestras se almacena mediante el programa Enhanced Chemstation MSD ChemStation E.02.02.1431. La identificación se lleva a cabo con la librería WILEY 7 (John Wiley & Sons Limited, NJ).

3.2.1.4.3. Cromatografía de gases bidimensional acoplada a espectrometría de masas (GC-GCMS)

El procedimiento de preconcentración de la muestra con SPME también se ha seguido en este método, véase §3.2.1.4.1.

La desorción de los compuestos volátiles se lleva a cabo en el inyector del primer cromatógrafo, en modo splitless, que se calentó durante 5 minutos a 280 °C. La temperatura del detector se fija a 300 °C, la línea de transferencia al segundo cromatógrafo a 100 °C y la línea de transferencia al espectrómetro de masas a 230 °C. Se utiliza helio como gas portador, flujo variable según los cortes medidos en espectrometría de masas y nitrógeno como gas auxiliar. El programa de control del horno se inicia con una isoterma a 40 °C durante 4 minutos, a la que le sigue una rampa de temperatura de 3 °C/min hasta 200 °C, que se mantiene durante 10 minutos en el primer cromatógrafo. En el segundo cromatógrafo el programa de control de horno se inicia con una isoterma durante 5 minutos, seguida de una rampa de temperatura de 7 °C/min hasta 150 °C.

El espectrómetro de masas trabaja en modo Scan con una sensibilidad ajustada a un rango de masas de 40-300. La información obtenida se almacena mediante el programa Star de Varian (Palo Alto, CA). La identificación se lleva a cabo con la librería WILEY 7 (John Wiley & Sons Limited, NJ).

3.2.1.4.4. Olfatometría acoplada a cromatografía de gases (GC-O)

La preconcentración con SPME y la desorción de la muestra para esta metodología se ha descrito en el apartado §3.2.1.4.1. En este caso el flujo es controlado con un divisor de flujo, descrito anteriormente. El 40% del flujo se dirige al detector FID, mientras que el 60% al puerto de olfacción, que es controlado por el programa del puerto de olfacción, SplitManager versión 2.0E.

El análisis mediante cromatografía de gases-olfatometría (GC-O) se realiza por cuatro panelistas (tres mujeres y un hombre) no fumadores y sin anosmia conocida. Las sesiones de olfacción fueron de 30 minutos, para evitar la fatiga. Los panelistas, básicamente, estaban de acuerdo con los olores de los diferentes compuestos volátiles, aunque usan diferentes términos semánticos.

La intensidad del olor percibido se evaluó usando los grados de 1 (olor muy débil), 2 (intensidad moderada) y 3 (intensidad fuerte). El compuesto fue considerado cuando tres de los panelistas lo detectó.

3.2.2. Análisis de compuestos fenólicos

3.2.2.1. Materiales

- Matraces de fondo cónico de 50 ml con boca esmerilada y tapón (Afora, Barcelona, España).
- Matraces de fondo cónico de 25 ml con boca esmerilada y tapón (Afora, Barcelona, España).
- Micropipeta de 500 μ l de Hamilton (Bonaduz, Suiza).
- Columnas de SPE con fase diol (Supelco, Bellefonte, PA).
- Filtros de paso de luz de 0,45 μ m (Albet, La Rioja, España).
- Columna Lichrospher 100 Rp-18 (250 mm \times 4,0 mm d.i.) de fase reversa tipo C18-RP de 5 μ m de tamaño (Merck, Darmstadt, Alemania).

3.2.2.2. Aparatos

- Estación de vacío equipada para la utilización de cartuchos de extracción en fase sólida (Supelco, Bellefonte, PA).
- Rotavapor con baño calefactor Heidolph (Kelheim, Alemania).

3.2.2.3. Instrumentación

- Cromatógrafo HPLC LaChrom Elite de Hitachi (Tokio, Japón). El cromatógrafo está equipado de 5 módulos: organizador, detector de matriz de diodos (L-2455), horno (L-2300), inyector automático (L-2200) y bomba (L-2130). El detector de matriz de diodos (DAD) está formado por dos lámparas, una de deuterio y otra de wolframio. La bomba está equipada con accesorios para gradientes de baja presión y un degasificador en línea. El sistema completo se muestra en la Figura 3.7.

3.2.2.4. Procedimiento analítico

La determinación de los fenoles se ha llevado a cabo implementando el método propuesto por Mateos *et al.* (2001).

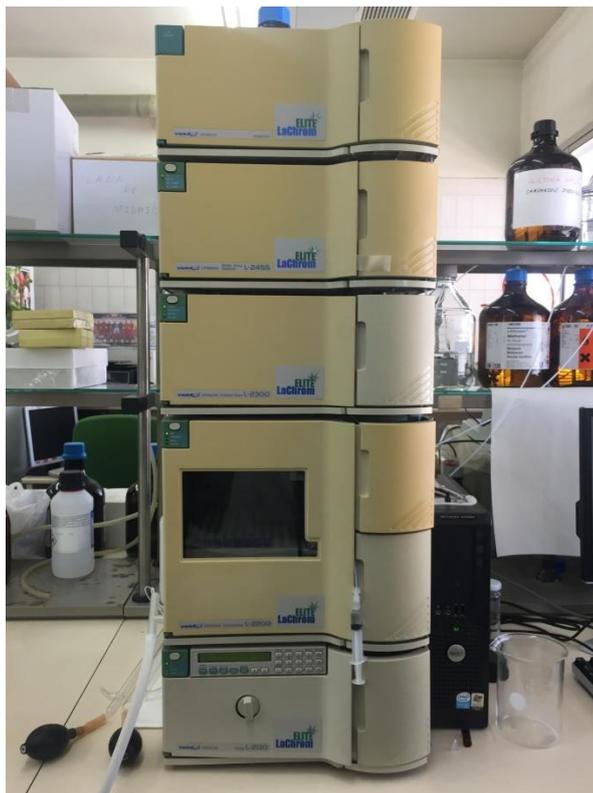


Figura 3.7. Cromatógrafo HPLC LaChrom Elite de Hitachi.

3.2.2.4.1. Cromatografía líquida con detector de matriz de diodos (HPLC-DAD)

El método consiste en la obtención de un extracto fenólico mediante SPE y posterior separación mediante HPLC.

Antes de iniciar el proceso de aislamiento de la fracción fenólica mediante las columnas de SPE, se activan con metanol y hexano (6ml, respectivamente).

El procedimiento analítico se inicia pesando 2,5 g de aceite en un matraz de fondo cónico de 50 ml y se añaden 0,5 ml de la mezcla de patrones internos, ácido *o*-cumárico y ácido *p*-hidroxifenilacético en metanol (10^{-2} y 10^{-1} mg/ml, respectivamente). A continuación, se evapora a 30 °C y el residuo oleoso resultante se redisuelve en 6 ml de hexano. Una vez adicionada la muestra, se lava el matraz dos veces con hexano (3 ml cada vez), que permite eliminar los compuestos menos polares que puedan quedar retenidos en la columna (ej. ceras, tocoferoles o hidrocarburos). Posteriormente se eluyen 5 ml de hexano/acetato de etilo (90:10 v/v). Finalmente, se eluyen 10 ml de metanol. Todo este proceso se lleva a cabo en la estación de vacío para favorecer la elución, con un flujo regulado de 1 ml/min. Tras evaporar el disolvente a 30 °C, se diluye la fracción en 500 μ l de metanol/agua.

Una alícuota de 20 μl de la disolución anterior se inyecta en el cromatógrafo HPLC-DAD. La fase móvil está formada por dos disolventes: agua/ácido orto-fosfórico (99,5:0,5 v/v), disolvente A, y metanol/acetonitrilo (50:50 v/v), disolvente B, con flujo de 1 ml/min. La Tabla 3.5 muestra el gradiente de elución de los disolventes. Las longitudes de onda (λ_{ex}) usadas en la identificación de fenoles son 235, 280 y 335 nm.

Tabla 3.5. Gradiente de elución de los disolventes A y B.

Tiempo (min)	%A	%B
0	95,0	5,0
25	70,0	30,0
35	65,0	35,0
40	60,0	40,0
50	30,0	70,0
55	0,0	100,0
60	0,0	100,0

3.2.3. Análisis de clorofilas y derivados

3.2.3.1. Materiales

- Viales topacio de 2 ml provistos de tapón (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).
- Matraces de fondo cónico de 25 ml con boca esmerilada y tapón (Afora, Barcelona, España).
- Cubetas de cuarzo, 10 mm de espesor y capacidad 3 ml (Hellma Analytics, Müllheim, Alemania).
- Micropipeta de 500 μl de Hamilton (Bonaduz, Suiza).
- Cartuchos de gel de sílice 1g/6 ml (Phenomenex, Torrance, CA).
- Columnas Merck Lichrospher 100 Rp-18 (250 mm \times 4,0 mm d.i.) (Darmstadt, Alemania) de fase reversa tipo C18-RP de 5 μm de tamaño.

3.2.3.2. Aparatos

- Rotavapor con baño calefactor (Heidolph, Kelheim, Alemania).
- Estación de vacío equipada para la utilización de cartuchos de extracción en fase sólida (Supelco, Bellefonte, PA).

3.2.3.3. Instrumentación

- Cromatógrafo HPLC LaChrom Elite (Hitachi, Tokio, Japón), descrito anteriormente (§3.2.2.3) (Figura 3.7).
- Espectrofotómetro UV-visible Agilent 8453 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

3.2.3.4. Procedimiento analítico

La determinación de los pigmentos clorofílicos se ha llevado a cabo implementando el método propuesto por Gertz y Fiebig (2006a) para la cuantificación de la pirofeofitina *a*, que se basa en el aislamiento de los pigmentos mediante SPE y su posterior separación mediante HPLC-DAD.

3.2.3.4.1. Cromatografía líquida de alta resolución con detector de matriz de diodos (HPLC-DAD)

Antes de iniciar el proceso de aislamiento de la fracción clorofílica se activan los cartuchos de gel de sílice con hexano (1 ml, dos veces).

El procedimiento analítico se inicia pesando 0,3 g de aceite en un vial de 2 ml y se añade 1 ml de hexano. Una vez adicionada la muestra, se lava el matraz dos veces con hexano (1 ml cada vez). Posteriormente se eluyen 5 ml de hexano/acetato de etilo (90:10 v/v), recogiendo los compuestos no polares. Finalmente, se eluyen 5 ml de acetona. Tras evaporar el disolvente a 30 °C, se diluye la fracción en 200 µl de acetona.

Una alícuota de 20 µl de la disolución anterior se inyecta en el cromatógrafo HPLC-DAD. La fase móvil es H₂O/MeOH/acetona (4:36:60 v/v) en régimen isocrático, con un flujo de 1 ml/min. Las longitudes de onda (λ_{ex}) usadas en la identificación de las clorofilas y derivados son 410 y 428 nm.

3.2.3.4.2. Determinación cuantitativa

La obtención de la feofitina *a* se llevó a cabo a partir del material de referencia de clorofila *a* mediante una extracción líquido-líquido con ácido clorhídrico y lavados sucesivos con éter dietílico y sulfato sódico al 2%. La pureza de este compuesto fue de 89%. La cuantificación de la pirofeofitina se realizó mediante la recta de calibrado de feofitina *a*, ya que ambos compuestos presentan un espectro de absorción idéntico en UV.

Gertz y Fiebig (2006a) describen la cuantificación de la pirofeofitina *a* a través de las áreas de los picos cromatográficos obtenidos mediante HPLC-DAD. En este método se asume que el factor de respuesta es igual para todos los pigmentos. La concentración de pirofeofitina *a* se mostró en porcentaje de área (*w*) usando la siguiente ecuación:

$$w = A_{pppA} * 100 / (A_{ppA} + A_{ppA'} + A_{pppA})$$

Siendo:

A_{pppA} es el área del pico de pirofeofitina *a*

A_{ppA} es el área del pico de feofitina *a*

$A_{ppA'}$ es el área del pico de feofitina *a'*

Por otro lado, para llevar a cabo la determinación cuantitativa de los compuestos clorofílicos, se preparó una disolución de clorofila *a* y feofitina *a* de 50 ppm. Para calcular la concentración exacta de ambas disoluciones se determinó espectrofotométricamente la absorbancia a 428 nm para clorofila *a* y 410 nm para feofitina *a* usando la siguiente ecuación:

$$\text{Pigmento} \left(\frac{mg}{kg} \right) = \text{abs}(nm) \times (Pm) \times 1000 / \epsilon$$

Siendo:

abs(nm), absorbancia de la disolución del pigmento

ϵ , coeficiente de extinción molar del pigmento

Pm, peso molecular del pigmento

La cuantificación de los pigmentos se realizó mediante rectas de calibrado y se obtuvieron de disoluciones a concentraciones 0,10-18,00 mg/kg preparadas a partir de las disoluciones anteriores.

3.2.4. Análisis de ésteres alquílicos

3.2.4.1. Materiales

- Matraces de fondo cónico de 25 ml con boca esmerilada y tapón (Afora, Barcelona, España).
- Columnas para cromatografía líquida, 10 mm de diámetro interno (Afora, Barcelona, España).
- Microjeringa de 10 μ l para cromatografía de líquidos, con aguja endurecida (Hamilton, Nevada, Estados Unidos).

3.2.4.2. Aparatos

- Rancimat 743 (Metrohm, Herisau, Suiza).
- Rotavapor con baño calefactor (Heidolph, Kelheim, Alemania).
- Columna capilar HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 μ m) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).

3.2.4.3. Instrumentación

- Cromatógrafo de gases 5890 Series II (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) equipado con un detector de ionización de llama (FID), columna HP-5, descrita anteriormente, y un inyector *on-column* (Figura 3.8).



Figura 3.8. Cromatógrafo de gases 5890 Series II Hewlett-Packard con inyector *on-column*.

3.2.4.4. Procedimiento analítico

La determinación de los ésteres alquílicos se ha llevado a cabo usando el método propuesto por el COI (2012) que consiste en la determinación del contenido de ceras, ésteres metílicos y etílicos de ácidos grasos en aceite de oliva mediante cromatografía preparativa en columna y posterior detección por cromatografía de gases.

3.2.4.4.1. Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)

Para la preparación de las columnas se mezclan 3 g de gel de sílice y hexano y se hacen pasar 50 ml de hexano para eliminar posibles impurezas.

El procedimiento analítico se inicia pesando 100 mg de muestra, se añade 1 ml de patrón interno, heptadecanoato de metilo (0,005 mg/ml), y varias gotas del colorante Sudán I. A continuación, se hacen pasar 10 ml de hexano para eliminar los posibles alcanos que estén presentes de manera natural. Se realiza la elución cromatográfica con la mezcla hexano/éter etílico (98,5:1,5) a flujo constante de 1 ml/min. La fracción resultante se evapora a 30 °C y se finaliza con corriente de nitrógeno. Por último, se redissuelve la muestra en 0,5 ml de heptano.

Una alícuota de 1 µl de la disolución anterior se inyecta *on-column* en el cromatógrafo de gases. El programa de control del horno se inicia con una isoterma a 70 °C durante 1 min, a la que sigue una rampa de temperaturas de 20 °C/min hasta 140 °C y otras dos rampas, una de 6 °C/min hasta 218 °C y otra de 30°C/min hasta 340 °C, que se mantiene durante 10 min. La temperatura del detector es fijada a 350 °C. La información de las muestras se procesa con el programa HP GC ChemStation versión 06.03.

3.2.5. Análisis de diacilgliceroles

3.2.5.1. Materiales

- Matraces de fondo cónico de 25 ml con boca esmerilada y tapón (Afora, Barcelona, España).
- Microjeringa de 10 µl para cromatografía de líquidos, con aguja endurecida (Hamilton, Nevada, Estados Unidos).
- Micropipeta de 500 µl (Hamilton, Nevada, Estados Unidos).
- Columnas de SPE con fase diol de 3 ml (Supelco, Bellefonte, PA).
- Filtros de paso de luz de 0,45 µm (Albet, La Rioja, España).

3.2.5.2. Aparatos

- Rotavapor con baño calefactor (Heidolph, Kelheim, Alemania).
- Columna capilar HP-5 (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA).
- Estación de vacío equipada para la utilización de cartuchos de extracción en fase sólida (Supelco, Bellefonte, PA).

3.2.5.3. Instrumentación

- Cromatógrafo de gases 5890 Series II (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) equipado con un detector de ionización de llama (FID), una columna HP-5 e inyector *on-column* (Figura 3.8).

3.2.5.4. Procedimiento analítico

La determinación de los diacilgliceroles se ha llevado a cabo usando un método basado en el desarrollado por Pérez-Camino *et al.* (1996) que consiste en el aislamiento de los diacilgliceroles mediante SPE y su posterior separación mediante GC-FID.

3.2.5.4.1 Cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID)

Antes de iniciar el proceso de aislamiento de los diacilgliceroles se activan las columnas de SPE con 4 ml de hexano.

El procedimiento analítico se inicia pesando 100 mg de la muestra y se disuelve en 1 ml de hexano. De esta disolución se toman 500 μ l y se añaden 100 μ l de patrón interno (3 mg/ml) de 1,3-dipalmitato de glicerilo en una disolución de 7 ml de diclorometano, 0,75 ml de éter dietílico y se enrasa hasta 25 ml hexano. Una vez adicionada la muestra en el cartucho de SPE se eluyen los compuestos que no interesan con 7 ml de hexano/diclorometano (90:10). A continuación, se eluyen 5 ml de cloroformo: metanol (2:1), a un flujo regulado de 1 ml/min. Se evapora con corriente de nitrógeno y se añaden 250 μ l de reactivo silanizante. Por último, se diluye la fracción en 3 ml de heptano.

Una alícuota de 2 μ l de la disolución anterior se inyecta *on-column* en el cromatógrafo de gases. El programa de control del horno se inicia 60 °C, a la que sigue una rampa de temperaturas de 25 °C/min hasta 280 °C, seguida de otra rampa a 5 °C/min hasta 340 °C, que se mantiene durante 11 minutos. La temperatura del detector se fija a 350 °C. La información de las muestras se procesa con el programa HP GC ChemStation versión 06.03.

3.3. Tratamiento matemático de los datos

Para llevar a cabo el procesado de datos se ha utilizado el programa Excel como interfaz entre la información proporcionados por los instrumentos analíticos y el programa estadístico Statistica versión 8.0 (Statsoft, Tulsa, OK). A continuación, se enumeran y justifican los diferentes algoritmos y procedimientos estadísticos usados para interpretar los

resultados numéricos de acuerdo con los objetivos del trabajo. Los procedimientos y algoritmos se han agrupado en dos: algoritmos univariantes y procedimientos multivariantes.

3.3.1. Algoritmos univariantes

El objetivo del análisis exploratorio de los datos es realizar un primer análisis mediante gráficos y tablas que faciliten la interpretación de los datos y que permitan extraer la máxima información posible. Esta etapa implica algunos algoritmos estadísticos univariantes y el cálculo de diferentes parámetros para evaluar las características de las poblaciones de datos obtenidos (media, varianza, coeficiente de variación, desviación estándar, etc.), la detección de datos anormales (“outliers”), la evaluación de los parámetros relacionados con la calidad de los procedimientos analíticos, la depuración de la matriz de datos, así como, el uso de algoritmos básicos como gráficos Box-Whisker, histogramas, gráficos de barras o radiales. Este estudio, también conocido como pretratamiento de datos, es fundamental para no obtener conclusiones erróneas u obvias.

3.3.2. Procedimientos multivariantes

El objetivo de la estadística multivariante consiste en analizar simultáneamente numerosas variables. Los procesos multivariantes se dividen en dos grandes grupos, descriptivos (no supervisado) y explicativos (supervisado). En el primer caso, no existe ninguna hipótesis previa que clasifique o defina las muestras. En este grupo se encuentra el análisis factorial, por ejemplo, el análisis de componentes principales. En el caso de los procedimientos supervisados, existe una hipótesis apriorística (por ejemplo, la clasificación varietal del aceite), o son simplemente modelos de dependencia que pueden englobarse dentro de la teoría general de la regresión (por ejemplo, el análisis discriminante o el análisis multivariante de la varianza).

3.3.2.1. Análisis de componentes principales (PCA)

El análisis de componentes principales es uno de los métodos de análisis factorial más conocido. El objetivo de aplicar el análisis factorial (FA) es obtener un número de factores no observables del conjunto original de variables observables (por ejemplo, compuestos químicos o percepciones sensoriales), que permita reducir la matriz original de datos en una de menores dimensiones pero reteniendo la mayor parte de la información original. El FA genera una o varias combinaciones lineales de las variables que se denominan factores, cuando los datos no están estandarizados, o componentes principales, cuando lo están. Los

pasos del análisis factorial incluyen seleccionar un grupo de variables originales, construir la matriz de correlación, determinar el número de autovalores que se van a seleccionar, extraer un conjunto de autovalores de la matriz de correlación, rotar los autovalores para incrementar el conocimiento de los resultados y finalmente elaborar las conclusiones.

3.3.2.2. Análisis discriminante lineal por pasos (SLDA)

El objetivo del procedimiento es construir un modelo en el que las variables puedan predecir el grupo más adecuado en el que se debe incluir una muestra. El análisis discriminante es usado tanto para determinar las variables que discriminan entre dos o más grupos constituidos de forma natural, como para determinar las variables que contribuyen a la mejor predicción entre grupos. El análisis por pasos hacia delante (*forward stepwise analysis*) se usa para construir el modelo de discriminación paso a paso. En cada paso se evalúan las variables no seleccionadas para determinar cuál es la que más contribuye a la discriminación entre grupos, que es entonces incluida en el modelo. El control de las variables, incluidas o excluidas del modelo, se lleva a cabo según el valor F de las variables en cada paso del proceso. El valor F es una medida de la importancia que una variable tiene a la hora de contribuir a la predicción del grupo de pertenencia. El proceso finaliza cuando no hay variables que posean valores por encima del valor F-to-Enter, o por debajo de F-to-Remove, fijado a priori. Estos valores (F-to-Enter y F-to-Remove) se fijan de manera muy estricta para evitar una sobreestimación de los resultados. Cuanto mayores son los valores, menor es el número de variables incluidas en el modelo, pero mejores son los resultados en la fase de verificación del modelo (Aparicio y García-González, 2013). Así, los valores F se escogieron de la tabla de distribución F ($m \times n$) al 99%, donde m es el número de grupos y n es el número de muestras del grupo más pequeño.

3.3.2.3. Análisis de agrupamiento (cluster)

El análisis de agrupamiento, también llamado “cluster”, es un término genérico para los métodos diseñados para la compresión de la información contenida en una matriz de datos, con la finalidad de describir las similitudes y diferencias entre objetos, y agrupar los objetos similares dentro de categorías. El “cluster” es una colección de varios algoritmos que sitúan las muestras o casos en diferentes grupos. Existen diferentes tipos de análisis de cluster: el agrupamiento según la media K, el agrupamiento por bloques y el agrupamiento arborescente. Este último es el que más se usa en la caracterización de aceite de oliva (Aparicio y García-González, 2013). En los estudios llevados a cabo en esta Tesis se ha usado

el análisis de agrupamiento (“cluster”) de tipo arborescente. Este agrupamiento se basa en dos tipos de procedimientos: medidas de la distancia y reglas de amalgamamiento. La distancia de unión utilizada en la construcción de los “cluster” fue la distancia “Manhattan”, que corresponde a la diferencia media entre las dimensiones y amortigua el efecto de los datos aberrantes (“outliers”) y como regla de amalgamamiento se eligió el algoritmo de Ward, que usa el análisis de la varianza para evaluar las distancias entre los grupos.

3.3.2.4. Análisis de la varianza (ANOVA)

El análisis de la varianza permite contrastar la hipótesis nula de que las medias de K poblaciones ($K > 2$) son iguales, frente a la hipótesis alternativa de que al menos una de las poblaciones difiere de las demás en cuanto a su valor esperado. Este contraste es fundamental en el análisis de resultados experimentales, en los que interesa comparar los resultados de K 'tratamientos' o 'factores' con respecto a la variable dependiente o de interés. El Anova requiere el cumplimiento los siguientes supuestos: que las poblaciones (distribuciones de probabilidad de la variable dependiente correspondiente a cada factor) son normales; que las K muestras sobre las que se aplican los tratamientos son independientes; y que las poblaciones tienen todas igual varianza (homoscedasticidad).



Resultados y Discusión

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Compuestos volátiles

El estudio de compuestos volátiles de los aceite de oliva vírgenes (VOO) se ha realizado con el fin de evaluar el papel que tienen en la calidad del aceite. Para ello, se ha analizado su capacidad para diferenciar aceites clasificados en distintas categorías y aceites que presentan diferentes defectos sensoriales con el fin de establecer marcadores útiles para evaluar la calidad. La utilización de un método de análisis objetivo para este fin complementaría la información obtenida mediante el panel de cata, método oficial para la evaluación sensorial de la calidad.

El análisis de compuestos volátiles se ha realizado mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GCMS) y cromatografía de gases bidimensional acoplada a espectrometría de masas (GC×GCMS).

4.1.1. Puesta a punto y validación del método analítico basado en GCMS y comparación con el método basado en GC-FID

Para la puesta a punto de este procedimiento analítico se partió de un método para el análisis de compuestos volátiles en VOO previamente desarrollado y validado dentro del grupo de investigación (García-González *et al.*, 2010b). Sin embargo, el método sólo fue validado en GC-FID para los compuestos volátiles responsables de los atributos sensoriales “positivos” del VOO. Como este trabajo se centra en los defectos del aceite, se ha realizado una nueva validación del método basado en GC-FID para los compuestos volátiles responsables de los atributos negativos. El método original se basa en la utilización de microextracción en fase sólida (SPME) como procedimiento de preparación de muestra para realizar el aislamiento y preconcentración de volátiles y su posterior determinación mediante GC-FID (véase §3.2.1.4.1). Este método se ha empleado con éxito en la caracterización de diferentes variedades de VOO (García-González *et al.*, 2010b) y en la evaluación de la calidad sensorial (García-González *et al.*, 2010c) y será utilizado en este trabajo para realizar la comparación de las respuestas obtenidas con la nueva metodología basada en MS.

La puesta a punto ha consistido en la selección de aquellos parámetros que debían ser modificados o redefinidos para adecuar el método original a las nuevas características del procedimiento. La etapa de aislamiento y pre-concentración de la fracción volátil mediante

SPME no requirió ninguna modificación y los valores de los parámetros se mantuvieron inalterados respecto al procedimiento original.

La mayor parte de las condiciones cromatográficas se mantuvieron en la etapa de separación de los compuestos mediante GC, pero fue necesario modificar los parámetros relacionados con la presión y flujo del gas portador. Aunque el método del que se partía especificaba un flujo de gas portador de 1,5 ml/min, en las especificaciones del nuevo equipo este valor no debía superar 1 ml/min. Por tanto, se decidió aplicar un flujo constante de 0,9 ml/min, y una presión en cabeza de 4,97 psi, que coincidía con los valores usados en otros estudios centrados en el análisis de compuestos volátiles del VOO (Marinas *et al.*, 2010).

Por último, en la etapa de identificación y cuantificación mediante MS fue necesario definir algunos parámetros propios de la espectroscopía de masas. En primer lugar, el espectrómetro de masas se configuró en modo “Scan”, que consiste en hacer barridos entre dos masas para tener una información de todos los compuestos presentes en la muestra. Este modo se emplea en análisis cualitativo para la identificación de compuestos por búsqueda en biblioteca de espectros, aunque también se emplea en análisis cuantitativo (Sparkman *et al.*, 2011). La sensibilidad aumenta con la reducción del rango de masas seleccionado. En este caso, el rango de masas empleado fue de 40 a 300 amu (“atomic mass unit”), que es común para los compuestos de bajo peso molecular, como son los compuestos volátiles presentes en el aceite (Vichi *et al.*, 2005). El procedimiento analítico completo se encuentra descrito en §3.2.1.4.2.

La introducción de modificaciones en cualquier metodología de análisis requiere una nueva validación analítica. Por este motivo ha sido necesario realizar un proceso de validación del método GCMS. En primer lugar se ha llevado a cabo un estudio cualitativo del perfil de volátiles de dos aceites con el objetivo de seleccionar los compuestos volátiles que son más adecuados para el cálculo de los parámetros de calidad analíticos. En esta selección se tuvo en cuenta la aplicación prevista del método, seleccionando aquellos compuestos que informan sobre la presencia de defectos sensoriales en el aceite de oliva virgen.

4.1.1.1. Estudio de los espectros de masas de compuestos volátiles

Se estudiaron las respuestas de 32 compuestos volátiles identificados previamente en el aceite (Morales *et al.*, 2013). De estos 32 compuestos, la mayor parte corresponden a los compuestos característicos de aceites con defectos sensoriales (Morales *et al.*, 2005). La

elección de estos compuestos, de entre los más de cien compuestos volátiles identificados en el VOO (Morales *et al.*, 2013), se debe a la importancia que tienen los defectos sensoriales en la clasificación en las diferentes categorías de calidad. Un aceite clasificado como lampante implica una devaluación del producto, lo que plantea un problema a los productores (Morales *et al.*, 2005). Los compuestos volátiles estudiados en este trabajo fueron analizados mediante GCMS y GC-FID.

Los 32 volátiles analizados comprenden compuestos con diferentes grupos funcionales como alcoholes, cetonas, aldehídos o ácidos. El grupo funcional del compuesto determina en gran medida la fragmentación obtenida en espectrometría de masas y el espectro que se obtiene.

Los compuestos volátiles con naturaleza ácida se caracterizan por tener una elevada polaridad, lo que plantea ciertos problemas debido a la presencia de picos cromatográficos con alto grado de asimetría (Sparkman *et al.*, 2011). Los ácidos en el VOO se identifican en muestras con defectos sensoriales ya que los aceites de buena calidad solo contienen cantidades muy bajas de ácidos (Morales *et al.*, 2005). En el espectro de masas de los ácidos carboxílicos de cadena lineal se observan señales intensas de m/z 60 y 73 (ácidos propanoico, butanoico, pentanoico, hexanoico, etc.) (Figura 4.1). La formación del ion de m/z 60 se debe a la reorganización de un hidrógeno en la posición cuatro de la cadena alifática mediante la transposición de McLafferty o transposición específica de hidrógeno. Este tipo de transposición es característica de la espectrometría de masas y requiere la presencia de un átomo de hidrógeno en la posición γ respecto al doble enlace aceptor del hidrógeno. La transposición de McLafferty da lugar a un alqueno y una forma enólica de la nueva cetona (Nibbering, 2004). Además, la presencia de la señal de m/z 45 indica la rotura del enlace C-CO (Figura 4.1).

Igual que ocurre con los ácidos alifáticos, los alcoholes alifáticos se caracterizan por su elevada polaridad. La intensidad de la señal del ion molecular en los alcoholes, tanto de cadena lineal como ramificada, disminuye al aumentar el peso molecular; incluso llegando a no aparecer alcoholes terciarios. Esto se debe a la fácil descomposición de la molécula a través de reacciones iniciadas en el propio hidroxilo ionizado. Los procesos de fragmentación más frecuentes suelen ser la deshidratación y la ruptura de un enlace carbono que porta el grupo hidroxilo. Los alcoholes dan señales importantes de m/z 45, 59, 73 (Pretsch *et al.*, 2001;

Sparkman *et al.*, 2011). En el caso de los alcoholes insaturados, se da una transposición tipo McLafferty eliminándose un grupo aldehído.

Por otro lado, los aldehídos y cetonas, también identificados en el aceite, sufren la pérdida de un electrón perteneciente a uno de los pares libres del átomo de oxígeno del grupo carbonilo (CO) y el ion molecular que se origina, puede fragmentarse a través de la ruptura en α o mediante la transposición McLafferty cuando existe un hidrógeno en γ (Pretsch *et al.*, 2001; Sparkman *et al.*, 2011). En el caso de los aldehídos alifáticos, las señales más intensas son de m/z 43, 44, 57, 72 y 84 (Figura 4.2). La señal de m/z 44 es más intensa cuando el aldehído no está sustituido en α . En los aldehídos insaturados se producen la rotura del enlace contiguo al CO, en este caso la señal del ion molecular es más intensa que en los aldehídos saturados. No se producen transposiciones McLafferty cuando el hidrógeno en γ está unido a doble enlace o si existe un doble enlace en la posición α o β . Las señales con mayor intensidad son de m/z 41, 55, 69, 83, 98.

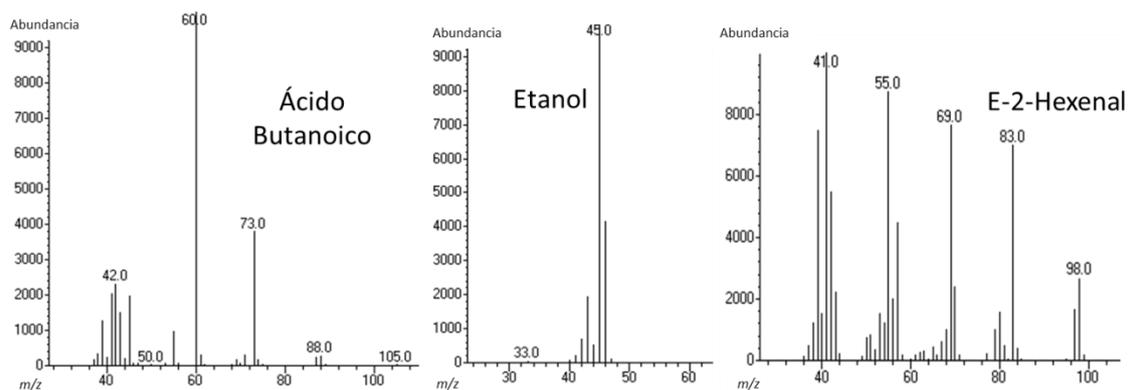


Figura 4.1. Espectro de masas del ácido butanoico, etanol y E-2-hexanal.

En el caso de las cetonas alifáticas se producen transposiciones consecutivas cuando ambas cadenas poseen un H en γ . El oxígeno se identifica en fragmentos poco intensos, siendo las señales más comunes 41, 55, 69 y 83 (Figura 4.2). Si existe un grupo CH_2 en α , aparece una señal de m/z 43. Cuando existen hidrógenos en γ predominan los picos de la transposición McLafferty pudiendo dar hasta tres posibles transposiciones apareciendo una señal de m/z 58 (m/z 57 si pierde un protón) (Harrison, 1970). Este hecho se observó en muchas de las cetonas alifáticas identificadas. En el caso de las cetonas insaturadas la fragmentación del enlace contiguo al carbonilo en la parte insaturada está favorecida, del mismo modo que ocurre con los aldehídos. No se producen transposiciones McLafferty cuando el hidrógeno en γ está unido a un doble enlace o si existe un doble enlace en la posición α o β (Figura 4.2).

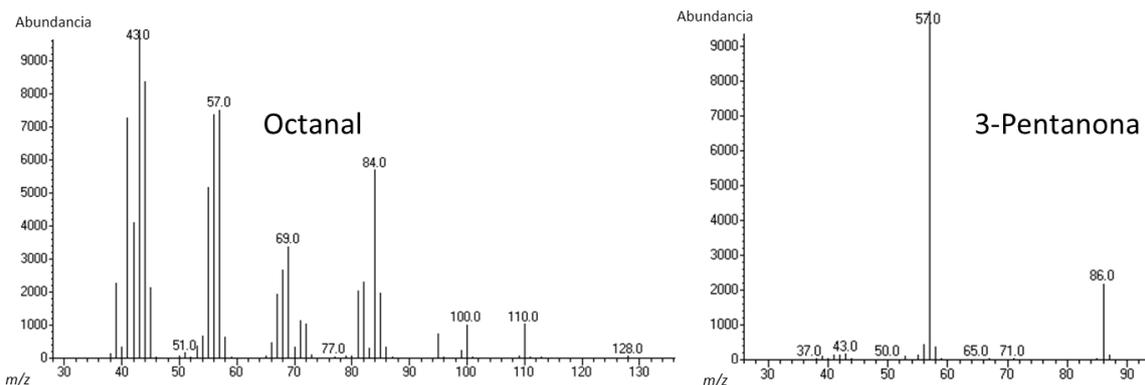


Figura 4.2. Espectro de masas del octanal y 3-pentanona.

Las señales originadas en los ésteres alifáticos se deben a fragmentaciones de los enlaces contiguos al grupo carbonilo (CO) originando señales de m/z 29, 43, 55, 70, 71. El ion molecular de los ésteres metílicos es intenso. El pico base de los espectros de masas es el resultado de la eliminación del radical $\cdot\text{OR}$. La pérdida de $\cdot\text{COOR}$ conduce a otra señal prominente en el espectro de m/z 31 y 59. La señal de m/z 61 se debe a la pérdida de C_2H_3 (Pretsch *et al.*, 2001) (Figura 4.3).

En el caso de los hidrocarburos identificados en VOO se caracterizan por una fragmentación sencilla. Estos fragmentos pierden hidrógeno y sufren abundantes transposiciones del hidrógeno y de la cadena alifática. También se producen eliminaciones de grupos del interior de la cadena y recombinación de éstos en el extremo de la cadena. Señales intensas para el octano y otros compuestos de la serie $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}$ corresponden a iones alquilo y alqueno (m/z 43, 57, 71) (Figura 4.3). La señal del ion molecular es importante, pero no necesariamente intensa (Lavanchy *et al.*, 1979).

Algunos hidrocarburos aromáticos como el benceno, el tolueno o xileno han sido identificados en muestras de VOO a bajas concentraciones, aunque no han sido incluidos en los compuestos volátiles estudiados por su bajo significado sensorial. La señal del ion molecular es la más intensa debido a la estabilidad elevada de estos compuestos, por eso, presentan una escasa tendencia a la fragmentación. Los procesos de ruptura de anillos aromáticos usualmente requieren energías elevadas y están acompañados por un alto grado de movimiento de átomos de hidrógeno. En los hidrocarburos aromáticos ramificados identificados en las muestras, como el tolueno, la ruptura más característica corresponde con la formación del ion tropilio (m/z 91) (Figura 4.3) (Sparkman *et al.*, 2011).

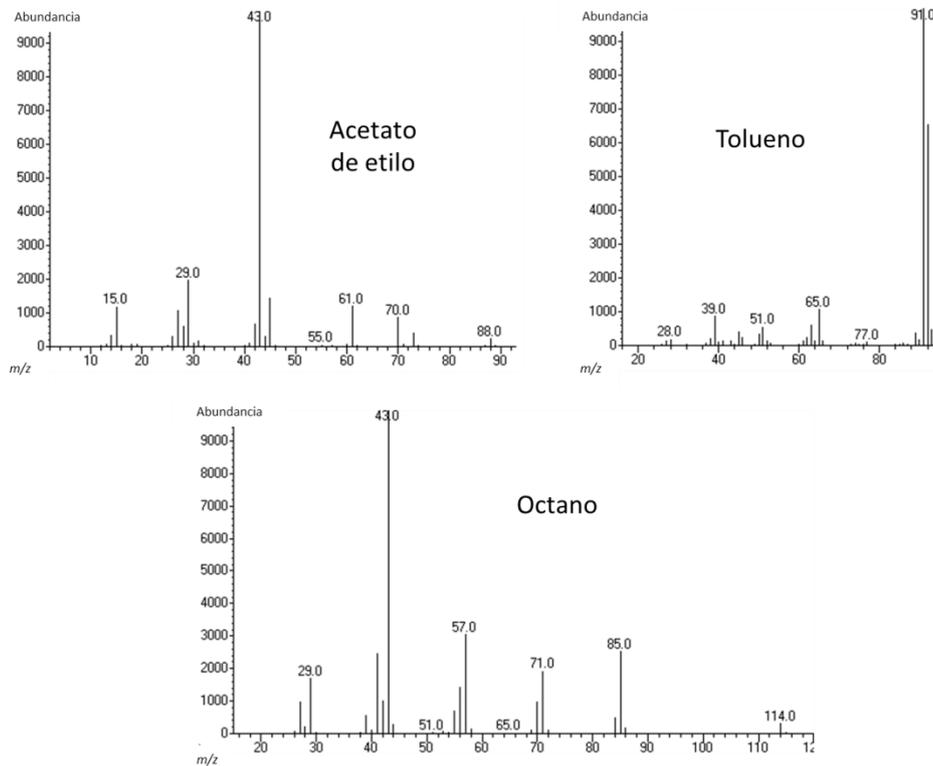


Figura 4.3. Espectro de masas del acetato de etilo, octano y tolueno.

4.1.1.2. Validación del método analítico

El concepto de validación incluye dos aspectos fundamentales, por una parte, la evaluación de los parámetros de calidad del método y, por otra, la adecuación de los mismos a unos requerimientos analíticos concretos, enfocados a la resolución de un problema.

La validación de un método analítico mediante la determinación de diferentes parámetros de calidad permite la evaluación objetiva del método y, además permite comparar los resultados de modo fiable con los obtenidos en otros laboratorios. La Norma UNE-EN ISO 17025:2005 define la validación del método analítico como “la confirmación a través del examen y aporte de evidencias objetivas de que se cumplen los requisitos particulares para un uso específico previsto de un procedimiento analítico”. Las evidencias objetivas a las que hace referencia esta definición se pueden expresar en términos de parámetros de calidad. Algunos de estos parámetros son la exactitud, la precisión, los límites de detección y cuantificación, el intervalo dinámico, la sensibilidad, la selectividad y la robustez. De todos ellos, los que presentan una mayor incidencia sobre la calidad de un método analítico son la exactitud, la precisión y el límite de detección y, son llamados parámetros primarios

(Compañó Beltrán y Ríos Castro, 2002). El resto de parámetros tienen una menor incidencia que acaba manifestándose a través de su influencia en los parámetros primarios.

La determinación de los parámetros de calidad de un método analítico se puede llevar a cabo en diferentes laboratorios mediante un estudio colaborativo (validación externa) o en un mismo laboratorio (validación interna). La validación del método analítico realizada en esta tesis es una validación interna.

4.1.1.3. Parámetros de calidad analíticos

La validación del método basado en GCMS se realizó mediante la determinación de los parámetros de calidad analíticos. Con un propósito comparativo, algunos de estos parámetros también se evaluaron con el método de análisis basado en GC-FID, en el cual se amplió la validación para los compuestos volátiles responsables de los atributos negativos, como se ha descrito anteriormente.

4.1.1.3.1. Precisión

De acuerdo con la norma ISO 3534 (ISO, 1993) la precisión es la similitud en los resultados de análisis independientes llevados a cabo bajo condiciones estipuladas. Es decir, el grado de proximidad entre los resultados bajo unas condiciones determinadas (IUPAC, 1998). Estas condiciones son variables externas, definidas previamente, que están sujetas a pequeñas variaciones en el transcurso de los análisis realizados y afectan a la precisión. Estos factores que influyen sobre la precisión son, por ejemplo, el laboratorio, el operador, el equipo, la calibración o el día de análisis. Dependiendo de los factores que varíen, se pueden evaluar tres tipos de precisión: la repetibilidad, la precisión intermedia y la reproducibilidad (ISO, 1994a).

- **Repetibilidad:** se entienden por condiciones de repetibilidad aquellas en las cuales el análisis se lleva a cabo aplicando el mismo método a un mismo material, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos, el mismo analista y en un intervalo corto de tiempo (una sesión de trabajo).
- **Precisión intermedia:** existen diferentes tipos de precisión intermedia dependiendo de los factores que se varíen durante las medidas. De esta forma se puede calcular, por ejemplo, la precisión intermedia para diferentes días y/o diferente operador.

- **Reproducibilidad:** se habla de condiciones de reproducibilidad cuando las medidas se obtienen con el mismo método, sobre las mismas muestras, pero en distintos laboratorios, lo cual implica reactivos, equipos, condiciones ambientales y analistas distintos.

La precisión del método empleado (Luna *et al.*, 2006a; Callejón *et al.*, 2008) se estudió en términos de precisión en un mismo día (repetibilidad) y precisión entre días (precisión intermedia) para los 32 compuestos volátiles cuantificados en un aceite de oliva virgen extra (EVOO) (var. Hojiblanca). Con el fin de determinar la repetibilidad, se realizaron 8 replicados en una única sesión de trabajo. La precisión intermedia se determinó mediante el análisis de una misma muestra en 8 sesiones no consecutivas durante ocho meses. Los resultados se expresan como desviación estándar relativa (RSD%) en la Tabla 4.1.

Un análisis de los valores obtenidos en la evaluación de la repetibilidad mostró que 13 de los compuestos volátiles identificados en la muestra de EVOO (62%) mediante GCMS mostraron un RSD% inferior al 10%, 4 compuestos volátiles (19%) presentaron valores entre 10 y 15%, y sólo tres compuestos (14%) tuvieron valores superiores al 15% (Tabla 4.1). El valor más alto (20,75) correspondió al 1-butanol, seguido del ácido acético y 6-metil-5-hepten-2-ona. El elevado valor de RSD% para 1-butanol se debe a su bajo peso molecular y su alta polaridad. La precisión intermedia mostró valores de RSD% ligeramente superiores a la repetibilidad. En este caso, el valor máximo fue 43,50%, que correspondió al E-3-hexen-1-ol.

La repetibilidad también se evaluó mediante el análisis de 7 replicados de un aceite de oliva virgen lampante (LVOO) caracterizado con el defecto sensorial rancio (Tabla 4.1). El objetivo era comprobar los valores de RSD% cuando las concentraciones de algunos compuestos volátiles son más elevados, como ocurre en los aceites con defectos (Morales *et al.*, 2005) y, por tanto, la precisión puede ser diferente. De esta forma se obtenían valores de coeficientes de variación para dos tipos de matrices diferentes: una en la que abundan compuestos volátiles propios de aceites de buena calidad y otra en la que existen altas concentraciones de compuestos responsables de atributos negativos y en las que se podrían dar fenómenos de competencia entre los compuestos en su proceso de adsorción a la fibra de SPME.

Tabla 4.1. Repetibilidad, precisión intermedia y selectividad del método en GCMS y GC-FID.

Compuesto	Repetibilidad (RSD%) ¹			Precisión Intermedia (RSD%) ¹		Selectividad GC-MS		Selectividad GC-FID	
	EVOO	LVOO	LVOO GC-FID	EVOO	LVOO	Rpa ³ EVOO	Rpp4 EVOO	Rpa3 EVOO	Rpp4 EVOO
Octano	9,38	2,05	11,79	9,97	1,86	2,85	4,44	18,45	10,52
Acetato de etilo	3,41	5,07	5,68	7,80	3,31	5,27	3,09	3,55	3,20
Etanol	8,57	7,45	10,48	10,16	8,43	2,92	2,26	3,14	13,90
Propanoato de etilo	nd ²	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-Pentanona	7,92	3,64	3,91	8,69	3,74	4,26	1,50	10,28	0,55
Pentanal	6,22	2,60	6,79	6,47	2,58	1,50	10,17	0,55	0,76
4-Metil-2-pentanona	nd	nd	8,61	nd	nd	nd	nd	nd	nd
1-Penten-3-ona	nd	9,29	12,73	nd	13,28	3,54	6,54	6,48	4,24
2-Butanol	8,43	nd	nd	10,43	nd	5,45	6,78	1,90	2,45
Butanoato de etilo	4,45	nd	nd	8,61	nd	7,84	3,54	3,45	4,28
2-Metilbutanoato de etilo	10,86	5,29	13,45	11,78	8,46	8,46	5,78	7,89	9,54
Hexanal	9,16	4,42	5,71	9,78	6,76	4,30	2,14	3,86	0,68
1-Butanol	20,75	nd	4,9	32,15	nd	7,76	5,05	6,16	3,32
2-Heptanona	nd	1,85	6,24	nd	1,60	3,17	3,04	0,39	0,69
Heptanal	6,07	2,26	14,82	6,55	2,60	3,04	2,58	0,69	21,28
2-Metil-1-butanol	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3-Metil-1-butanol	5,29	nd	3,16	32,80	nd	8,64	1,50	6,87	2,00
E-2-Hexenal	4,50	3,56	5,30	6,30	1,64	1,50	2,85	2,00	20,29
3-Octanona	12,81	4,58	4,44	14,55	6,68	2,25	1,72	8,03	3,56
Octanal	14,24	1,65	9,03	7,46	2,93	5,30	1,25	3,22	3,90
1-Octen-3-ona	nd	10,45	nd	nd	8,00	nd	nd	nd	nd
E-2-Heptenal	nd	12,4	13,47	nd	15,43	nd	nd	nd	nd
2-Heptanol	nd	8,54	nd	nd	10,12	nd	nd	nd	nd
6-Metil-5-hepten-2-ona	16,15	1,22	11,50	21,36	2,46	2,05	4,71	9,48	12,43
1-Hexanol	9,11	3,04	4,62	10,27	10,5	1,93	3,13	12,33	9,15
E-3-Hexen-1-ol	11,85	nd	10,35	43,50	nd	1,92	5,45	0,55	17,14
Nonanal	nd	4,02	8,98	nd	6,97	nd	nd	nd	nd
1-Octen-3-ol	6,13	4,35	6,57	6,52	8,00	17,96	3,56	22,01	13,96
Ácido acético	17,30	3,46	2,21	22,76	5,37	4,35	5,28	8,57	3,94
Ácido propanoico	nd	1,99	7,01	nd	3,90	nd	nd	nd	nd
Ácido butanoico	nd	3,20	14,03	nd	7,72	nd	nd	nd	nd
Ácido pentanoico	nd	2,77	26,55	nd	5,02	nd	nd	nd	nd

Nota: ¹, desviación estándar relativa (RSD%); ², no detectado; ³, resolución respecto al pico anterior; ⁴, resolución respecto al pico posterior; cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID); cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GCMS).

El 92% de los volátiles identificados en el LVOO mostraron valores de RSD% inferiores al 10%, incluso más del 50% de los compuestos presentaron valores inferiores a 5%, y sólo el 1-octen-3-ol y E-2-hetpenal mostraron un valor superior al 10%. Algunos resultados del estudio de precisión intermedia fueron mejores que los de repetibilidad. Estos resultados señalan la importancia de la validación cuando se hace un cambio de matriz, en este caso del aceite.

La precisión de un método puede ser utilizada para obtener la incertidumbre de la medida a través de la estimación de las llamadas diferencias críticas. Si la diferencia entre dos resultados analíticos es mayor que las diferencias críticas, entonces se puede asumir que la muestra en cuestión no cumple ningún requisito. El cálculo de las diferencias críticas también se puede entender como una definición de la medida de la incertidumbre (Aparicio *et al.*, 2013). Se calcularon los límites de repetibilidad ($r = 2,8 \times S_r$; siendo S_r la desviación estándar de la repetibilidad) y se realizaron dos replicados (x_1 y x_2) para cada muestra en el estudio de precisión bajo condiciones de repetibilidad. Se comprobó que la diferencia $|x_1 - x_2|$ era menor que el límite de repetibilidad (r) del método para todos los compuestos volátiles estudiados en esta tesis.

Por otro lado, para comparar la repetibilidad del método con GC-FID se estudió la misma muestra de LVOO con este método. Los valores de RSD% que resultaron de este estudio fueron, en general, superiores a los obtenidos mediante GCMS (Tabla 4.1).

4.1.1.3.2. Linealidad

Se ha estudiado la linealidad de la respuesta proporcionada por los métodos GCMS y GC-FID para cada uno de los 32 compuestos volátiles.

La linealidad es la capacidad de un método de análisis para proporcionar una respuesta instrumental o el resultado proporcional a la cantidad de analito que se detecta en una muestra (Barjol, 2013). Para cualquier método analítico cuantitativo es necesario determinar el intervalo de concentraciones del analito o los valores adecuados sobre los cuales el método puede aplicarse (EU, 2020). El valor inferior de trabajo está limitado por los límites de detección y/o cuantificación (LOD, LOQ). Sin embargo, el valor superior de concentración depende del sistema de respuesta. Por tanto, el rango de trabajo debe presentar una respuesta lineal, lo que significa que el método da resultados proporcionales a la concentración del analito. La Tabla 4.2 muestra los parámetros estudiados para el método basado en GCMS.

Tabla 4.2. Resumen de los parámetros de calidad del método GCMS.

Compuesto	R _t ¹	I _i ²	R _{aj} ³	RSD _b ⁴	Recta de calibrado	LOD ⁵	LOQ ⁵	Exactitud	Sensibilidad (10 ⁷)	W _R ⁷
Octano	4,25	43/57/85	0,997	4,20	Y= 1,478·10 ⁸ +2,801·10 ⁸ X	1,63	5,44	t _{exp} ≤t _{tab}	2,80	5,44-6,00
Acetato de etilo	5,62	43/70/88	0,987	11,84	Y= 3,051·10 ⁷ +2,716·10 ⁸ X	1,18	3,92	t _{exp} ≤t _{tab}	2,72	3,92-6,00
Etanol	6,85	45/46	0,998	3,50	Y= 7,463·10 ⁶ +3,009·10 ⁷ X	0,57	1,15	t _{exp} ≤t _{tab}	0,30	1,15-3,00
Propanoato de etilo	7,60	57/74/102	0,995	2,31	Y= -5,987·10 ⁶ +2,035·10 ⁸ X	0,23	0,76	t _{exp} ≤t _{tab}	2,03	0,76-3,00
3-Pentanona	8,26	57/86	0,983	4,79	Y= 7,190·10 ⁷ +3,360·10 ⁸ X	0,48	1,59	t _{exp} ≤t _{tab}	3,35	1,59-3,00
Pentanal	8,31	44/58/71	0,996	1,77	Y= -1,519·10 ⁶ +2,920·10 ⁷ X	0,17	0,59	t _{exp} ≤t _{tab}	0,29	0,59-3,00
4-Metil-2-pentanona	9,40	58/85/100	0,997	1,96	Y= 2,971·10 ⁷ +1,669·10 ⁸ X	0,19	0,65	t _{exp} ≤t _{tab}	1,66	0,65-3,00
1-Penten-3-ona	10,30	55/84	0,990	3,37	Y= 3,520·10 ⁸ +2,580·10 ⁶ X	0,33	1,1	t _{exp} ≤t _{tab}	0,03	1,11-3,00
2-Butanol	10,92	45/59/72	0,991	4,72	Y= 2,005·10 ⁸ +9,399·10 ⁷ X	0,10	0,34	t _{exp} ≤t _{tab}	0,94	0,34-1,00
Butanoato de etilo	11,37	43/71/88	0,992	4,24	Y= 6,118·10 ⁷ +1,513·10 ⁸ X	0,09	0,30	t _{exp} ≤t _{tab}	1,51	0,30-1,00
2-Metilbutanoato de etilo	12,00	57/85/102	0,997	2,27	Y= 3,894·10 ⁷ +3,079·10 ⁸ X	0,36	1,22	t _{exp} ≤t _{tab}	3,08	1,22-6,00
Hexanal	13,82	44/56/72	0,998	2,26	Y= 1,462·10 ⁷ +1,677·10 ⁸ X	0,22	0,74	t _{exp} >t _{tab} ⁶	1,67	0,74-3,00
1-Butanol	17,99	31/41/56	0,972	3,03	Y= 9,920·10 ⁷ +9,569·10 ⁷ X	0,30	0,99	t _{exp} ≤t _{tab}	0,96	0,99-15,00
2-Heptanona	19,81	43/58/71	0,998	2,31	Y= 2,275·10 ⁷ +2,270·10 ⁸ X	0,22	0,76	t _{exp} ≤t _{tab}	2,27	0,76-3,00
Heptanal	19,99	44/55/70	0,996	0,81	Y= 1,045·10 ⁷ +7,466·10 ⁷ X	0,18	0,60	t _{exp} ≤t _{tab}	0,75	0,26-15,00
2-Metil-1-butanol	21,67	41/57/70	0,993	6,89	Y= 4,837·10 ⁷ +2,006·10 ⁸ X	0,68	2,25	t _{exp} >t _{tab} ⁶	2,00	2,25-3,00
3-Metil-1-butanol	21,70	41/55/70	0,997	1,88	Y= 1,016·10 ⁸ +7,833·10 ⁷ X	0,19	0,63	t _{exp} ≤t _{tab}	0,78	0,63-3,00
E-2-Hexenal	21,79	55/69/83	0,995	1,56	Y= -5,622·10 ⁶ +6,163·10 ⁷ X	0,15	0,51	t _{exp} ≤t _{tab}	0,62	0,51-3,00
3-Octanona	23,73	43/57/72/99	0,995	3,57	Y= 7,291·10 ⁶ +9,205·10 ⁷ X	0,35	1,17	t _{exp} ≤t _{tab}	0,92	1,17-3,00
Octanal	25,71	43/57/84	0,996	1,40	Y= 7,776·10 ⁵ +2,567·10 ⁷ X	0,13	0,44	t _{exp} ≤t _{tab}	0,26	0,44-3,00
1-Octen-3-ona	26,33	55/70/97	0,997	2,98	Y= 2,716·10 ⁶ +1,005·10 ⁸ X	0,30	0,98	t _{exp} ≤t _{tab}	1,00	0,98-3,00
E-2-Heptenal	27,38	41/55/83	0,997	4,93	Y= -2,336·10 ⁶ +5,480·10 ⁶ X	1,16	3,88	t _{exp} ≤t _{tab}	0,05	3,88-10,00
2-Heptanol	27,71	45/55/83	0,997	3,23	Y= 3,758·10 ⁷ +2,946·10 ⁸ X	0,32	1,06	t _{exp} ≤t _{tab}	2,95	1,06-3,00
6-Metil-5-hepten-2-ona	28,21	43/55/69/108	0,995	4,38	Y= 1,913·10 ⁶ +7,914·10 ⁷ X	0,43	1,45	t _{exp} ≤t _{tab}	0,79	1,45-15,00
1-Hexanol	29,22	43/56/69	0,998	1,48	Y= 6,972·10 ⁶ +1,209·10 ⁸ X	0,15	0,50	t _{exp} ≤t _{tab}	1,21	0,50-3,00
E-3-Hexen-1-ol	29,75	41/67/82	0,985	5,60	Y= 1,170·10 ⁷ +1,830·10 ⁷ X	0,86	2,86	t _{exp} ≤t _{tab}	0,18	2,86-6,00
Nonanal	30,87	43/57/70	0,987	6,35	Y= 1,437·10 ⁵ +3,711·10 ⁶ X	1,14	3,98	t _{exp} ≤t _{tab}	0,04	3,98-6,00
1-Octen-3-ol	33,71	57/67/81	0,998	1,17	Y= -8,092·10 ⁶ +8,838·10 ⁷ X	0,32	1,07	t _{exp} ≤t _{tab}	0,88	1,07-3,00
Ácido acético	34,25	43/45/60	0,997	5,23	Y= 1,339·10 ⁷ +4,634·10 ⁷ X	0,52	1,72	t _{exp} ≤t _{tab}	0,46	1,72-3,00
Ácido propanoico	37,97	45/57/74	0,998	1,75	Y= -1,142·10 ⁷ +5,605·10 ⁷ X	0,48	1,61	t _{exp} ≤t _{tab}	0,56	1,61-3,00
Ácido butanoico	41,70	42/60/73	0,998	5,32	Y= 1,593·10 ⁶ +1,432·10 ⁷ X	0,53	1,75	t _{exp} ≤t _{tab}	0,14	1,75-3,00
Ácido pentanoico	45,93	41/60/73	0,965	12,53	Y= -2,124·10 ⁷ +1,554·10 ⁷ X	2,54	8,49	t _{exp} ≤t _{tab}	0,15	8,49-10,00

Nota: ¹, Tiempo de retención (min); ², iones identificativos (*m/z*); ³, coeficiente de regresión ajustada; ⁴, desviación estándar relativa; ⁵, límites de detección y cuantificación (mg/kg); ⁶, exactitud no establecida; ⁷, intervalo de trabajo (mg/kg).

Tabla 4.3. Resumen de los parámetros de calidad del método GC-FID.

Compuesto	R _t ¹	R ² _{aj} ²	RSD _b ³	Recta de calibrado	LOD ⁴	LOQ ⁴	Exactitud	Sensibilidad (×10 ⁴)	W _R ⁶
Octano	4,84	0,990	4,82	Y= 4,680·10 ⁴ +1,596·10 ⁵ X	2,17	7,25	t _{exp} ≤t _{tab}	1,15	2,75-10,00
Acetato de etilo	6,41	0,999	1,56	Y= 1,305·10 ³ +7,878·10 ³ X	0,15	0,51	t _{exp} ≤t _{tab}	2,45	0,51-3,00
Etanol	7,76	0,995	2,24	Y= 9,814·10 ⁴ +6,097·10 ⁴ X	1,01	3,37	t _{exp} ≤t _{tab}	0,69	3,37-15,00
Propanoato de etilo	8,45	0,992	3,69	Y= 1,990·10 ⁴ +2,061·10 ⁵ X	0,59	1,98	t _{exp} ≤t _{tab}	2,06	1,98-6,00
3-Pentanona	9,46	0,990	6,70	Y= 1,868·10 ⁴ +3,551·10 ⁵ X	1,17	3,92	t _{exp} ≤t _{tab}	3,55	3,92-6,00
Pentanal	9,55	0,999	2,03	Y= 1,390·10 ⁴ +1,564·10 ⁵ X	0,33	1,09	t _{exp} ≤t _{tab}	1,56	1,09-6,00
4-Metil-2-pentanona	11,4	0,998	1,75	Y= 1,7802·10 ⁴ +2,153·10 ⁵ X	0,28	0,94	t _{exp} ≤t _{tab}	2,15	0,94-6,00
1-Penten-3-ona	11,89	0,991	4,20	Y= 2,705·10 ⁴ +2,373·10 ⁵ X	1,20	4,00	t _{exp} ≤t _{tab}	2,37	4,00-10,00
2-Butanol	12,22	0,999	2,57	Y= 5,7239·10 ⁴ +5,209·10 ⁵ X	0,05	0,18	t _{exp} ≤t _{tab}	2,57	0,18-1,00
Butanoato de etilo	12,92	0,998	2,86	Y= 2,073·10 ⁴ +1,241·10 ⁵ X	1,19	4,30	t _{exp} ≤t _{tab}	1,24	4,30-15,00
2-Metilbutanoato de etilo	13,51	0,994	2,90	Y= 1,936·10 ⁴ +1,405·10 ⁵ X	1,35	4,50	t _{exp} ≤t _{tab}	1,40	4,50-15,00
Hexanal	15,18	0,996	3,43	Y= 2,935·10 ⁴ +1,163·10 ⁵ X	0,89	2,97	t _{exp} ≤t _{tab}	1,16	2,97-10,00
1-Butanol	19,1	0,999	1,77	Y= 2,715·10 ⁴ +2,652·10 ⁵ X	0,80	2,63	t _{exp} ≤t _{tab}	2,65	2,63-15,00
2-Heptanona	20,9	0,994	3,23	Y= 5,289·10 ³ +2,340·10 ⁶ X	0,51	1,73	t _{exp} ≤t _{tab}	0,23	1,73-6,00
Heptanal	21,10	0,997	0,70	Y= 1,404·10 ⁴ +6,256·10 ⁴ X	0,32	1,05	t _{exp} ≤t _{tab}	0,62	1,05-15,00
2-Metil-1-butanol	22,10	0,999	1,84	Y= 7,097·10 ³ +1,798·10 ⁵ X	0,29	0,99	t _{exp} ≤t _{tab}	1,79	0,99-6,00
3-Metil-1-butanol	22,30	0,992	4,17	Y= 5,864·10 ⁴ +1,168·10 ⁵ X	1,88	6,28	t _{exp} ≤t _{tab}	1,17	6,28-15,00
E-2-Hexenal	22,80	0,996	3,39	Y= -9,469·10 ³ +4,824·10 ⁴ X	0,54	1,81	t _{exp} ≤t _{tab}	0,48	1,81-6,00
3-Octanona	24,65	0,999	1,16	Y= 5,770·10 ³ +2,698·10 ⁴ X	0,52	1,75	t _{exp} ≤t _{tab}	0,27	1,75-15,00
Octanal	26,10	0,997	2,96	Y= -492,05+7,294·10 ³ X	1,33	4,45	t _{exp} ≤t _{tab}	0,07	4,45-15,00
1-Octen-3-ona	26,30	0,996	3,33	Y= -4,979·10 ³ +5,120·10 ⁴ X	0,53	1,78	t _{exp} >t _{tab} ⁵	0,52	1,78-6,00
E-2-Heptenal	28,17	0,999	1,75	Y= -8,830·10 ³ +2,967·10 ⁴ X	0,79	2,63	t _{exp} ≤t _{tab}	0,29	1,81-6,00
2-Heptanol	28,40	0,999	0,73	Y= 1,690·10 ³ +7,348·10 ⁴ X	0,33	1,11	t _{exp} ≤t _{tab}	0,07	1,11-15,00
6-Metil-5-hepten-2-ona	28,93	0,999	1,18	Y= 5,663·10 ³ +4,124·10 ⁴ X	0,51	1,71	t _{exp} ≤t _{tab}	0,04	1,71-15,00
1-Hexanol	29,71	0,999	1,65	Y= 1,055·10 ⁴ +9,249·10 ⁴ X	0,51	1,70	t _{exp} ≤t _{tab}	0,93	1,70-10,00
E-3-Hexen-1-ol	30,20	0,990	5,21	Y= 3,422·10 ³ +8,726·10 ⁴ X	0,82	2,79	t _{exp} ≤t _{tab}	0,87	2,79-6,00
Nonanal	31,14	0,991	1,89	Y= -1,460·10 ³ +3,468·10 ³ X	2,41	8,05	t _{exp} >t _{tab} ⁵	0,26	8,05-15,00
1-Octen-3-ol	33,70	0,998	0,76	Y= -550,317+3,906·10 ⁴ X	0,74	2,47	t _{exp} ≤t _{tab}	0,48	2,53-10,00
Ácido acético	34,13	0,997	0,08	Y= 3,619·10 ⁴ +7,823·10 ³ X	0,56	1,77	t _{exp} ≤t _{tab}	0,08	1,77-6,00
Ácido propanoico	37,80	0,990	0,54	Y= 1,876·10 ⁴ +5,488·10 ⁴ X	1,85	6,19	t _{exp} ≤t _{tab}	0,54	6,19-15,00
Ácido butanoico	41,48	0,999	0,50	Y= 3,323·10 ³ +5,017·10 ⁴ X	0,30	1,01	t _{exp} ≤t _{tab}	0,50	1,01-6,00
Ácido pentanoico	45,54	0,999	0,77	Y= 1,203·10 ³ +2,372·10 ⁴ X	2,54	8,49	t _{exp} ≤t _{tab}	0,24	1,12-15,00

Nota: ¹, tiempo de retención (min); ², coeficiente de regresión ajustada; ³, desviación estándar relativa; ⁴, límites de detección y cuantificación (mg/kg); ⁵, exactitud no establecida; ⁶, intervalo de trabajo (mg/kg).

Se han analizado los coeficientes de correlación (0,967-0,999) para las rectas de calibrado obtenidas dentro del rango de concentración 0,1-15,0 mg/kg para los 32 compuestos volátiles. Como el coeficiente de correlación no siempre garantiza la linealidad de la recta de calibrado se complementó con el estudio de la distribución de los residuos de la regresión y la desviación estándar relativa (RSD_b) (Aparicio *et al.*, 2013). En cuanto a la distribución de residuos, una calibración se considera conforme a la linealidad si cumple con las siguientes propiedades: los valores residuales no deben mostrar ninguna tendencia, los residuales deben estar uniformemente distribuidos (distribución aleatoria) y el número de valores residuales negativos y positivos deben ser aproximadamente iguales. Y, además, la linealidad se considera aceptable si el valor de RSD_b es inferior al 5%.

De acuerdo con el criterio RSD_b , el heptanal y 6-metil-5-hepten-2-ona mostraron una respuesta lineal para el rango de concentración completo (0,1-15,0 mg/kg) (Figura 4.4A). Sin embargo, la mayoría de los volátiles mostraron linealidad en un intervalo de concentración menor (0,1-3,0 mg/kg) (Figura 4.4B y 4.5), con la excepción del acetato de etilo, nonanal y 2-metil-1-butanol que no mostraron respuesta lineal tampoco en este rango (Tabla 4.2). Además, junto con ácido pentanoico, estos compuestos mostraron valores residuales con tendencia (“biased”) y valor RSD_b superior al 5%, siendo el ácido pentanoico el compuesto que presenta peor linealidad.

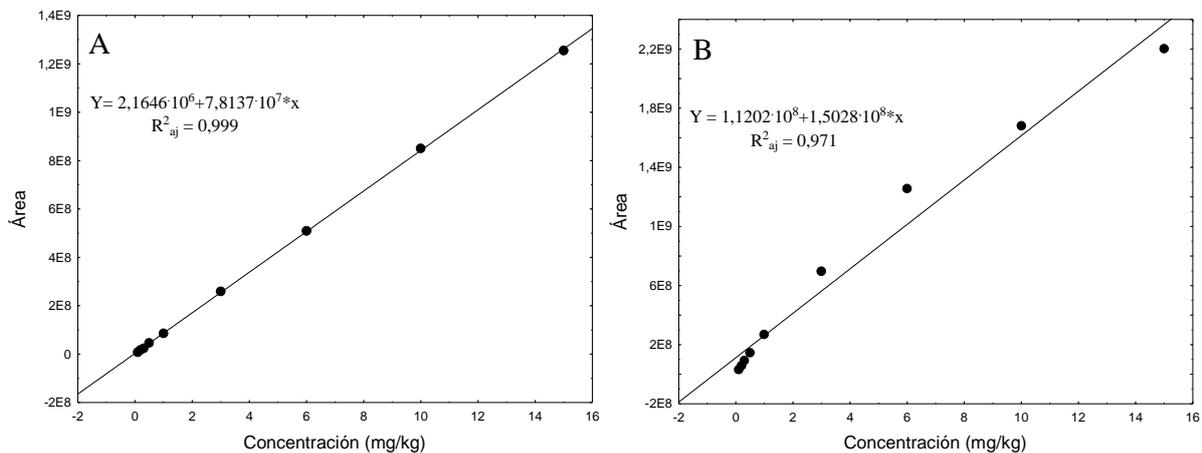


Figura 4.4. (A) Recta de calibrado del heptanal para el intervalo de concentraciones 0,10-15,00 mg/kg estudiado en GCMS. (B) Recta de calibrado de la 2-heptanona para el intervalo de concentraciones 0,10-15,00 mg/kg estudiado en GCMS.

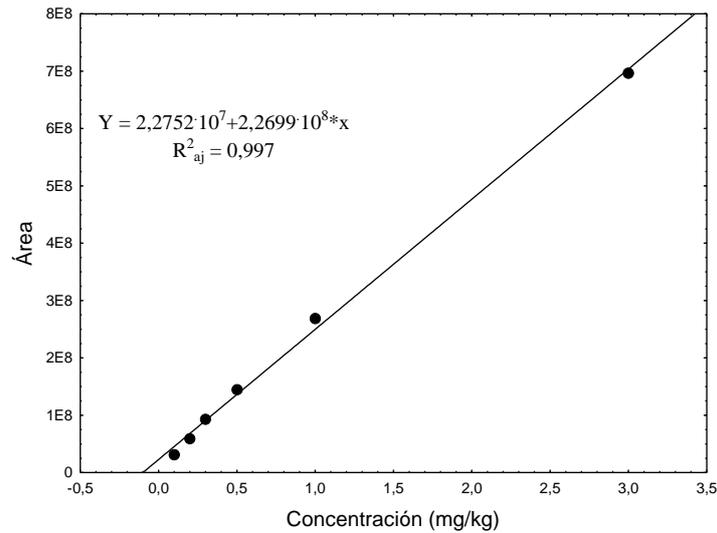


Figura 4.5. Recta de calibrado de la 2-heptanona para el intervalo de concentraciones 0,10-3,00 mg/kg estudiado en GCMS.

Asimismo, en el estudio realizado mediante GC-FID con el objetivo de comparar con el estudio en GCMS, pero el E-2-hexenal mostró tendencia (“biased”) en la distribución de los residuos, presentó un coeficiente de regresión ajustada superior a 0,990 y RSD_b (%) inferior a 5. El resto de compuestos también mostraron un comportamiento lineal, sin mostrar tendencia (“unbiased”) en el análisis de residuos y con un coeficiente de regresión ajustada superior a 0,99 (Tabla 4.3). Con respecto a las rectas de calibrado, las determinadas mediante el método GC-FID, presentaron un intervalo lineal de trabajo mayor que aplicando GCMS. Esta diferencia de comportamiento entre los dos métodos indica que la falta de linealidad en GCMS se debe mayoritariamente a la escasez de sensibilidad del equipo para concentraciones superiores a 6,0 mg/kg, más que a una limitación de la capacidad del material adsorbente de la fibra a estas concentraciones. Estos resultados denotan uno de los problemas de la espectrometría de masas que es la falta de linealidad en comparación con el detector FID, aunque la espectrometría de masas presenta la ventaja de una mayor sensibilidad a bajas concentraciones (Sparkman *et al.*, 2011). No obstante, la mayoría de los compuestos volátiles presentes en el VOO se encuentran en concentraciones menores de 3,0-6,0 mg/kg (García-González *et al.*, 2010a), estando estos valores dentro del intervalo lineal de trabajo.

El comportamiento no lineal de la respuesta del método GCMS para algunos de los compuestos volátiles estudiados puede ajustarse a una ecuación modelo del tipo:

$$\hat{Z} = \sqrt{\hat{Y}} = a + b \log(X)$$

Estos compuestos son el octano, acetato de etilo, 2-metil-1-butanol, 2-heptanol y 1-hexanol. En estos casos, al aplicar la ecuación logarítmica, se alcanza coeficientes de regresión ajustada de 0,99.

4.1.1.3.3. Límite de detección y cuantificación

El límite de detección (LOD) se define, según la IUPAC (1998), como la concentración o cantidad mínima de analito que puede detectarse con una certeza razonable mediante un determinado procedimiento analítico. El LOD así definido cubre con el aspecto cualitativo del método pero no hace referencia a si puede cuantificarse el analito de manera fidedigna. Es necesario, por tanto, el límite de cuantificación (LOQ), que se define como la cantidad mínima de analito que se puede cuantificar con un nivel aceptable de precisión y exactitud (Eurachem, 1998). LOD y LOQ se calcularon como tres y diez veces el valor de la relación entre la desviación estándar de la regresión y la pendiente de la curva de calibración (Miller y Miller, 2002).

Las Tablas 4.2 y 4.3 muestran los datos obtenidos en el cálculo del LOD y LOQ para cada uno de los compuestos volátiles analizados mediante GCMS y GC-FID, respectivamente. Aunque los valores son muy diversos, hay que tener en cuenta que las concentraciones en VOO también son muy dispares (Morales *et al.*, 2013). Los LOD y LOQ obtenidos para los aldehídos en el método GCMS se encontraban entre los valores más bajos, excepto el nonanal y el E-2-heptenal (Tabla 4.2). En la evaluación de la calidad del VOO, una correcta determinación de los aldehídos es importante para detectar el defecto rancio (Morales *et al.*, 2005). Por el contrario, el ácido pentanoico y octano presentaban valores más altos para LOQ (Tabla 4.2). La dificultad para obtener una determinación correcta del compuesto se puede deber a la falta de linealidad del ácido pentanoico. Este compuesto no está presente en aceites de buena calidad, y su concentración se eleva en aceites rancios (Morales *et al.*, 2005). Por otro lado, el octano no tiene ningún significado sensorial en el VOO (Morales *et al.*, 2013), y su determinación analítica no es relevante.

Los valores más bajos de LOD y LOQ en GC-FID fueron los del 2-butanol (Tabla 4.3). Por el contrario, el nonanal (2,41 y 8,05) y el ácido pentanoico (2,54 y 8,49) presentaron los valores más altos para LOD y LOQ, debido a la dificultad de la fibra de SPME en absorber estos compuestos. Sus concentraciones aumentan en aceites de oliva cualificados con el defecto rancio (Morales *et al.*, 2005).

Los análisis realizados con GCMS proporcionan, de forma general, valores de LOD y LOQ inferiores que los obtenidos con GC-FID. La espectrometría de masas, a diferencia de los detectores FID, es capaz de llevar a cabo análisis cuantitativos por debajo del nivel de $\mu\text{g}/\text{kg}$ (McNair y Miller, 1997),

4.1.1.3.4. Intervalo dinámico de trabajo

Un buen conocimiento y definición de la zona de trabajo es esencial para llevar a cabo una investigación adecuada de la linealidad del método (Ribes *et al.*, 2007). El rango de trabajo de las sustancias volátiles se determina con el valor mínimo de LOQ y la concentración más alta ensayada con linealidad aceptable (Boqué *et al.*, 2002).

En el caso de GCMS, la Tabla 4.2 muestra que los compuestos volátiles con baja masa molecular y alta polaridad (como los compuestos que eluyen al inicio de la cromatografía) mostraron valores más altos de LOQ. Además, los compuestos volátiles con alta masa molecular y baja polaridad (eluyendo al final de la cromatografía) mostraron también valores más altos de LOQ. Sin embargo, los compuestos volátiles situados en el centro del cromatograma (polaridad media) mostraron, en general, valores más bajos de LOQ (Tabla 4.2). El LOQ más bajo corresponde al butanoato de etilo y el más alto al ácido pentanoico, que, además, presentan rangos de trabajo más estrechos. El heptanal es el compuesto volátil con un intervalo dinámico de trabajo más amplio.

La Tabla 4.3 muestra los valores de GC-FID, el intervalo del acetato de etilo es el más estrecho; mientras que el más amplio, al igual que en GCMS, es el del heptanal. En general, los intervalos fueron más amplios para todos los compuestos utilizando el método GC-FID.

4.1.1.3.5. Exactitud

La exactitud es una característica de rendimiento que se refiere al error total (sistemático y errores aleatorios) y consta de dos componentes: veracidad y precisión (González *et al.*, 2010), que se evaluó mediante estudios de recuperación. La recuperación se entiende como la proporción de la cantidad de analito añadido a la muestra, que se extrae y se presenta para medición (IUPAC, 1999).

En esta tesis, la exactitud se ha evaluado en términos de “exactitud aparente” que expresa la relación entre la concentración encontrada (extraída con la fibra de SPME, y cuantificada por GCMS o GC-FID con sus respectivas rectas de calibrado) y el valor de

referencia (IUPAC, 2001). Este forma de evaluar la exactitud se ha aplicado con éxito en métodos cromatográficos (Luna, 2003).

El procedimiento se basa en el cálculo de la concentración aparente C_{ap} del analito en estudio como la razón entre la concentración determinada y el valor de referencia.

$$C_{ap} = \frac{C}{C_{ref}} \times 100$$

A partir de las determinaciones realizadas, se calcula la concentración aparente media C_{ap} y la desviación estándar S_D . La exactitud se establece por comparación estadística de la concentración aparente media con el 100%, a través del test de la t de Student. Esto exige el cálculo de una t experimental, t_{exp} :

$$t_{exp} = \frac{|100 - \overline{C}_{ap}|}{\frac{S_D}{\sqrt{n}}}$$

Donde n es el número de determinaciones realizadas. Este valor de t experimental se compara con el valor t tabulado, t_{tab} de dos colas para $\alpha = 0,02$ y n-1 grados de libertad. Si $t_{exp} < t_{tab}$ la concentración aparente C_{ap} no difiere significativamente de 100% y la exactitud para el método analítico puede establecerse. En este trabajo se estudió una concentración de referencia (C_{ref}) de 2 ppm que estaba dentro del intervalo de linealidad.

De los 32 compuestos estudiados en GCMS, el método resultó ser exacto para un 94% de los volátiles. Entre los compuestos que no presentaron buena exactitud se encuentran el hexanal y 2-metil-1-butanol (Tabla 4.2). El hexanal es uno de los compuestos volátiles de relevancia, ya que es en parte el responsable del olor verde característico de los VOO, y a elevadas concentraciones es uno de los compuestos responsables del olor a rancio (Morales *et al.*, 2005). No obstante, la detección de aceites rancios en ningún caso se basa únicamente en hexanal, sino que es necesario identificar otros aldehídos, como heptanal o pentanal (Morales *et al.*, 1997; Morales *et al.*, 2005). Por otro lado, el 2-metil-1-butanol se identifica en aceites caracterizados con los defectos moho-humedad, atrojado y avinado-avinagrado (Morales *et al.*, 2005). La exactitud del hexanal puede estar afectada por otros compuestos que aparecen en la cola, así como, la del 2-metil-1-butanol por el solapamiento con su isómero 3-metil-1-butanol. La identificación exacta de estos compuestos permitiría una mejora en la exactitud del método.

En GC-FID, de los 32 compuestos estudiados, el método resultó ser exacto para un 94% de los volátiles (Tabla 4.3), siendo este porcentaje igual que el determinado en GCMS. Entre los compuestos que no presentaron buena exactitud se encuentran la 1-octen-3-ona y nonanal. La 1-octen-3-ona es característica de los aceites caracterizados con el defecto mohohumedad (Morales *et al.*, 2005). El nonanal, como el resto de los aldehídos es característico de muestras rancias. En términos de las diferencias entre los valores de la *t* tabulada y la *t* calculada, la exactitud del método mediante GCMS es superior a la determinada para GC-FID.

Para conocer por qué la exactitud presentada por el hexanal no es aceptable, se llevó a cabo el análisis de 3 muestras de EVOO de las variedades Hojiblanca y Arbequina (F19, F20 y F22) mediante cromatografía de gases bidimensional acoplada a espectrometría de masas (GC×GCMS) (véase §3.2.1.4.3.). Como se ha descrito en la introducción (§1.6.1.2.2), la cromatografía bidimensional se basa en el uso de dos columnas, unidas en serie, con una selectividad tan diferente como sea posible. Sus principales ventajas son un poder mayor de separación, selectividad y sensibilidad en comparación con la cromatografía unidimensional. El análisis de las muestras de EVOO mediante esta técnica, ha permitido la identificación del hidrocarburo 3-etil-1,5-octadieno en la cola del pico cromatográfico del hexanal. La cromatografía bidimensional permite la separación en dos picos cromatográficos. El fragmento de iones del espectro de masa son *m/z* 41, 53, 69, 95 y 109, siendo el peso molecular *m/z* 138, estos fragmentos están de acuerdo con los descritos por Angerosa *et al.*, (1998), que han caracterizado siete hidrocarburos presentes en el aceite, entre ellos 3-etil-1,5-octadieno. Además, varios autores (Vichi *et al.*, 2003c; Cimato *et al.*, 2006) han identificado este hidrocarburo en el aceite de oliva. La Figura 4.6 muestra el cromatograma de hexanal obtenido mediante GC×GCMS y GCMS.

Como se observa en la Figura 4.6, la cromatografía bidimensional permitió la identificación de dos isómeros del hidrocarburo 3-etil-1,5-octadieno, mientras que en la cromatografía tradicional se encuentra acoplado a la cola del compuesto anterior (hexanal). La cromatografía bidimensional podría ayudar a la cuantificación correcta del hexanal y evitaría problemas de exactitud del método.

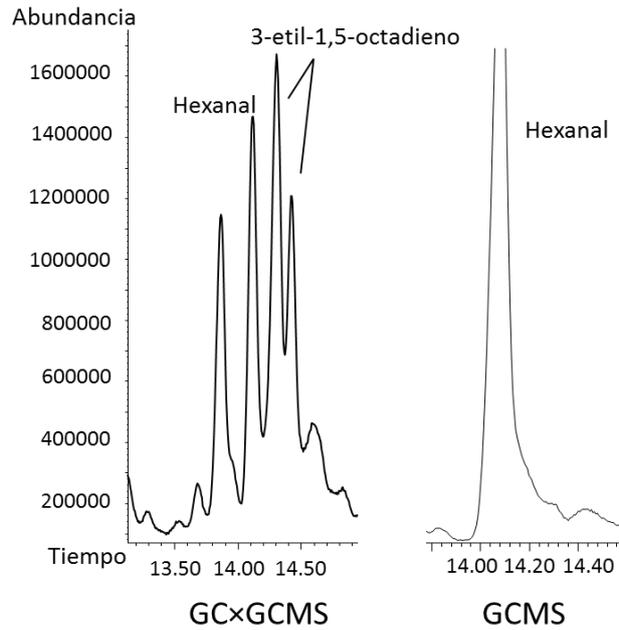


Figura 4.6. Cromatograma del hexanal obtenido mediante GCxGCMS y GCMS.

4.1.1.3.6. Selectividad

En los métodos analíticos es necesario asegurarse de que la señal producida durante la medida se debe sólo al analito y no a la presencia de interferencias en la muestra. La evaluación del posible efecto de interferencias en las muestras tiene especial interés en muestras de composición compleja, como ocurre con el espacio de cabeza del VOO, que puede llegar a contener hasta más de 100 compuestos volátiles (Morales *et al.*, 2013). Por esta razón, la selectividad del método analítico se estudió mediante el cálculo de la resolución cromatográfica (Boqué *et al.*, 2002; FDA, 2011). Para ello se ha utilizado la resolución del pico anterior y posterior al pico de interés. La resolución se define como la magnitud de separación entre dos picos cromatográficos, teniendo en cuenta la anchura de dichos picos. La fórmula de la resolución se define como:

$$R = 2 \left(\frac{t_{r2} - t_{r1}}{W_{b1} + W_{b2}} \right)$$

Siendo:

t_{r1} es el tiempo de retención del primer pico

t_{r2} es el tiempo de retención del segundo pico

W_{b1} la anchura de la base del primer

W_{b2} la anchura de la base del segundo pico

La Figura 4.7 muestra ejemplos de resolución de diferentes picos cromatográficos. Una resolución de 1,5 representa picos resueltos al 100% sin línea base entre ellos, (Figura 4.7A). Una resolución mayor a 1,5 representa picos con línea base entre ellos y resueltos al 100% (Figura 4.7B). La Figura 4.7C muestra una resolución inferior a 1,5 que representa picos con cierta superposición o parcialmente resueltos (Miller y Miller, 2002).

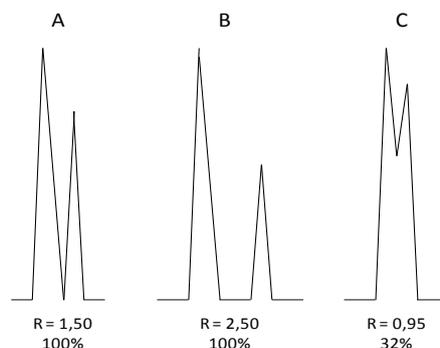


Figura 4.7. Ejemplos de resolución de picos cromatográficos, con valores de resolución (R) igual (A), mayor (B) y menor (C) que 1,5.

La selectividad del método basado en GCMS, evaluada con una muestra de EVOO (var. Hojiblanca), mostró que todos los picos seleccionados se resolvieron completamente (resolución $\geq 1,5$), excepto el octanal que no se resolvió por completo cuando fue identificado a bajas concentraciones (Tabla 4.1). El 3-metil-1-butanol y E-2-hexenal podrían tener cierto grado de solapamiento en las muestras caracterizadas con diferentes atributos sensoriales como moho-humedad-tierra mojada, avinado-avinagrado y atrojado-borras. La superposición es debida a las altas concentraciones del 3-metil-1-butanol y las bajas concentraciones del E-2-hexenal, en contraste con las concentraciones habituales de estos compuestos en EVOO (Morales *et al.*, 2005).

Estos resultados se compararon con los obtenidos con el método GC-FID (Tabla 4.1). En este caso el 78% de los compuestos presentan una resolución igual o mayor a 1,5, en comparación con el 95% en el caso de GCMS, lo que demuestra, en general, una mayor selectividad en el método basado en GCMS. Sin embargo, existen compuestos como el hexanal (0,68), 2-heptanona (0,39-0,69), heptanal (0,69) y E-3-hexen-1-ol (0,55) en los que su resolución es inferior a 1,5. Por tanto, existen picos que se resuelven parcialmente. En este caso la resolución más baja fue 0,39 correspondiente la a 2-heptanona.

4.1.1.3.7. Sensibilidad

La sensibilidad se define como el cambio de respuesta de un instrumento de medida dividido por el correspondiente cambio en el estímulo, que corresponde a la pendiente de la recta de calibrado (Boqué *et al.*, 2002). La espectroscopía de masas muestra generalmente una mayor sensibilidad que la cromatografía de gases cuando se trabaja a bajas concentraciones (Sparkman *et al.*, 2011).

Dada la diversidad de los compuestos estudiados, se obtuvieron resultados de sensibilidad dentro de un amplio rango de valores con ambos instrumentos (GC y GCMS), los ácidos son los compuestos volátiles que presentan menor sensibilidad ($0,14-0,56 \times 10^7$ en GCMS; $0,08-1,57 \times 10^4$ en GC-FID). Aunque el valor más bajo correspondió a 1-penten-3-ona ($0,03 \times 10^7$) en GCMS y octanal ($0,04 \times 10^4$) en GC-FID. Mientras que algunos de los compuestos con mayor sensibilidad son la 3-pentanona ($3,35 \times 10^7$ en GCMS; $3,82 \times 10^4$ en GC-FID), el octano ($2,80 \times 10^7$ en GCMS; $2,58 \times 10^4$ en GC-FID) o el acetato de etilo ($2,12 \times 10^7$ en GCMS; $2,45 \times 10^4$) en GC-FID.

El valor medio para la sensibilidad de los compuestos volátiles con naturaleza ácida es de 0,32 en el estudio mediante GCMS y 0,60 en el estudio mediante GC-FID. En el caso de los aldehídos, la media de los valores de sensibilidad es de $0,53 \times 10^7$ para GCMS y de $0,63 \times 10^4$ para GC-FID. Son los compuestos volátiles de naturaleza alcohólica los que presentaron una sensibilidad media superior en ambos métodos ($1,50 \times 10^7$ en GCMS; $1,10 \times 10^4$ en GC-FID), y las cetonas en el caso de GCMS ($1,66 \times 10^7$ en GCMS; $0,43 \times 10^4$ en GC-FID). En general, la espectrometría de masas presenta una mayor sensibilidad, siendo ésta del orden de 10^7 , frente a la cromatografía de gases con detector FID, del orden 10^4 .

4.1.2. Evaluación de defectos sensoriales en aceite de oliva virgen mediante GCMS y GC-FID

Una vez determinados los parámetros de calidad analíticos del método de análisis de compuestos volátiles basado en GCMS, se llevó a cabo el estudio de 22 muestras de aceite de oliva vírgenes. Como suele ser habitual, las muestras estaban caracterizadas por más de un defecto sensorial, considerándose como defecto sensorial primario el que fue percibido por los panelistas con mayor intensidad, y como defecto secundario el de menor intensidad. Además de la caracterización sensorial de las muestras llevadas a cabo por el panel de cata, se han determinado los parámetros de calidad descritos por las normativas vigentes (CE, 2013; COI, 2015a) que clasifican el VOO en sus distintas categorías. La Tabla 4.4 muestra las

categorías, los atributos sensoriales y los criterios de calidad descritos por el COI (2015a) de los 22 aceites analizados. Los aceites, según la asignación del panel de cata y los valores obtenidos de los parámetros de calidad (COI, 2015a), se clasificaron en las diferentes categorías: EVOO, VOO y OVOO.

El objetivo del estudio era comprobar si el método proporcionaba información química objetiva sobre la calidad de los aceites, y si esta información estaba de acuerdo con las evaluaciones sensoriales llevadas a cabo por los paneles de cata. La Tabla 4.5 muestra las concentraciones media de los compuestos volátiles en las muestras de VOO agrupadas según el defecto sensorial primario y sin defectos. Las rectas de calibrado (Tabla 4.2) permitieron determinar las concentraciones de los compuestos a partir de los valores de las áreas cromatográficas (Tabla 4.5). De los 32 compuestos volátiles estudiados en la validación del método, todos fueron identificados en las muestras suministradas por las almazaras, excepto 2-metil-1-butanol y 1-octen-3-ona.

Tabla 4.4. Categorías, atributos sensoriales y parámetros de calidad de aceites de oliva vírgenes.

Código	Categoría	Defecto sensorial	Defecto secundario	Acidez libre ⁸	Índice de peróxidos ⁹	K ₂₃₂	K ₂₇₀	Mediana defecto	Mediana frutado	Atributos de sabor	
										Amargo	Picante
F1	OVOO ¹	Avinado ⁴	Rancio	0,45	6,89	2,69	0,22	2,2	2,1	2,8	3,4
F2	VOO	Avinado	Moho	0,52	7,26	2,60	0,25	2,1	2,3	2,5	2,8
F3	OVOO	Avinado	Moho	0,38	7,75	2,75	0,19	3,0	1,9	2,2	3,0
F4	OVOO	Moho ⁵	Avinado. Atrojado	0,33	3,60	2,70	0,38	2,2	2,5	2,5	3,1
F5	VOO ²	Moho	Atrojado. Rancio	0,71	4,89	2,52	0,15	2,4	2,2	2,6	3,6
F6	OVOO	Moho	Atrojado	0,56	4,36	2,89	0,30	3,0	1,8	2,8	3,3
F7	OVOO	Moho	Avinado	0,68	5,42	2,75	0,20	2,2	2,4	2,8	3,5
F8	OVOO	Atrojado ⁶	Moho	0,83	1,89	2,96	0,27	4,0	1,2	2,5	3,2
F9	OVOO	Atrojado	Moho	0,82	2,53	3,06	0,25	5,0	0,0	0,0	0,0
F10	OVOO	Atrojado	Moho	0,88	2,58	3,10	0,26	5,5	0,0	0,0	0,0
F11	VOO	Atrojado	Moho	0,22	3,28	2,48	0,20	2,0	2,5	4,2	4,3
F12	VOO	Atrojado	Moho	0,23	1,96	2,32	0,18	3,4	1,4	3,0	3,7
F13	VOO	Madera ⁷	Avinado	0,35	6,62	2,08	0,16	2,1	2,2	2,5	3,3
F14	VOO	Madera	Atrojado	0,42	5,48	2,10	0,18	2,3	2,2	3,5	4,1
F15	VOO	Madera	Avinado	0,28	6,75	2,19	0,23	2,2	1,9	2,5	2,8
F16	OVOO	Helada	Rancio	0,17	6,58	2,56	0,33	3,0	1,5	0,0	0,0
F17	VOO	Helada	Moho. Avinado	0,21	5,32	2,52	0,25	3,0	1,5	0,0	0,0
F18	EVOO ³	-	-	0,08	4,21	2,28	0,20	0,0	4,7	3,8	4,2
F19	EVOO	-	-	0,17	0,97	2,19	0,16	0,0	4,8	4,8	4,6
F20	EVOO	-	-	0,17	1,75	2,23	0,13	0,0	4,8	4,7	4,5
F21	EVOO	-	-	0,19	1,63	1,81	0,14	0,0	4,9	4,5	4,6
F22	EVOO	-	-	0,09	1,72	2,07	0,17	0,0	4,9	4,3	4,1

Nota: ¹, aceite de oliva virgen corriente, ², aceite de oliva virgen; ³, aceite de oliva virgen extra; ⁴, avinado-avinagrado; ⁵, moho-humedad-tierra mojada; ⁶, atrojado-borras; ⁷, madera-humedad; ⁸, % m/m expresado en ácido oleico; ⁹, en mEq. O₂/kg de aceite.

La Figura 4.8 muestra el cromatograma de los compuestos volátiles identificados en una muestra de LVOO (4.8A) y en una muestra de EVOO (4.8B) analizadas mediante SPME-GCMS.

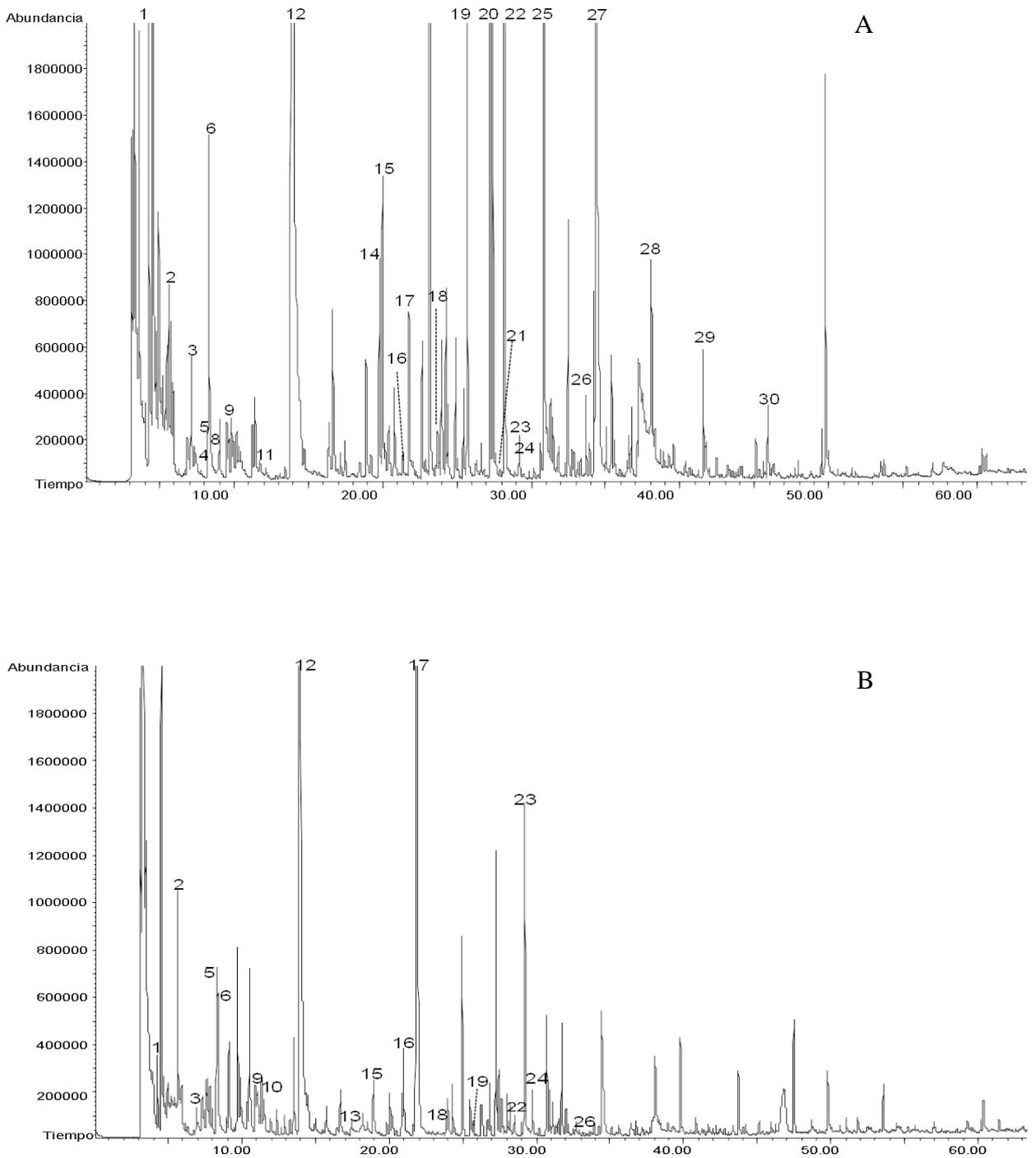


Figura 4.8. Cromatograma de los compuestos volátiles mediante SPME-GCMS de un LVOO (A) y un EVOO (B). Los códigos están descritos en la Tabla 4.5.

Tabla 4.5. Concentraciones (media \pm desviación estándar) (mg/kg) de los compuestos volátiles en las muestras de aceite de oliva virgen con y sin defectos sensoriales.

Código	Compuesto	VOO					EVOO ⁴	Umbral de olor (mg/kg)
		Avinado ¹	Atrojado	Helada	Moho ²	Madera ³		
1	Octano	0,49 \pm 0,07	0,84 \pm 0,12	0,85 \pm 0,10	0,52 \pm 0,03	0,37 \pm 0,08	0,11 \pm 0,05	0,94
2	Acetato de etilo	0,53 \pm 0,11	1,37 \pm 0,21	0,31 \pm 0,11	0,94 \pm 0,09	0,67 \pm 0,20	0,04 \pm 0,02	0,94
3	Etanol	7,42 \pm 1,40	6,91 \pm 0,94	1,53 \pm 0,17	10,75 \pm 1,79	4,73 \pm 2,08	0,17 \pm 0,04	30,00
4	Propanoato de etilo	0,003 \pm 0,001	0,008 \pm 0,01	nd	nd	nd	nd	0,10
5	3-Pentanona	0,02 \pm 0,01	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,002	0,04 \pm 0,004	0,07 \pm 0,01	0,77 \pm 0,38	70,00
6	Pentanal	0,72 \pm 0,30	0,20 \pm 0,09	1,22 \pm 0,26	0,69 \pm 0,18	1,28 \pm 0,15	1,11 \pm 1,00	0,24
7	4-Metil-2-pentanona	nd ⁵	0,002 \pm 0,001	0,001 \pm 0,001	nd	nd	nd	0,30
8	1-Penten-3-ona	0,36 \pm 0,20	nd	0,04 \pm 0,006	0,09 \pm 0,04	0,08 \pm 0,03	0,12 \pm 0,04	0,70 $\times 10^{-3}$
9	2-Butanol	0,48 \pm 0,37	0,004 \pm 0,002	1,08 \pm 0,83	0,88 \pm 0,07	2,05 \pm 0,90	1,80 \pm 0,01	0,15
10	Butanoato de etilo	nd	0,52 \pm 0,01	nd	nd	0,06 \pm 0,06	0,32 \pm 0,02	0,03
11	2-Metilbutanoato de etilo	0,034 \pm 0,02	0,009 \pm 0,001	0,004 \pm 0,001	0,032 \pm 0,02	0,04 \pm 0,01	nd	0,72 $\times 10^{-3}$
12	Hexanal	0,22 \pm 0,02	0,23 \pm 0,02	0,50 \pm 0,02	0,24 \pm 0,01	0,27 \pm 0,05	0,95 \pm 0,13	0,80
13	1-Butanol	0,05 \pm 0,03	1,20 \pm 0,27	0,02 \pm 0,02	0,03 \pm 0,005	0,01 \pm 0,005	nd	0,40
14	2-Heptanona	0,05 \pm 0,03	0,01 \pm 0,003	nd	0,01 \pm 0,002	0,002 \pm 0,002	0,01 \pm 0,005	0,30
15	Heptanal	0,05 \pm 0,02	0,04 \pm 0,006	0,04 \pm 0,01	0,04 \pm 0,005	0,03 \pm 0,003	0,07 \pm 0,03	0,50
16	3-Metil-1-butanol	0,95 \pm 0,58	1,25 \pm 0,19	0,88 \pm 0,12	1,00 \pm 0,15	0,49 \pm 0,05	0,69 \pm 0,26	0,10
17	E-2-Hexenal	0,30 \pm 0,30	0,05 \pm 0,01	1,14 \pm 0,30	0,78 \pm 0,21	2,09 \pm 0,85	0,94 \pm 0,02	0,42
18	3-Octanona	0,41 \pm 0,17	0,04 \pm 0,01	0,40 \pm 0,06	0,39 \pm 0,14	0,12 \pm 0,02	0,84 \pm 0,38	-
19	Octanal	0,39 \pm 0,09	0,20 \pm 0,02	0,31 \pm 0,06	0,43 \pm 0,02	0,24 \pm 0,04	0,16 \pm 0,01	0,32
20	E-2-Heptenal	0,80 \pm 0,20	nd	4,76 \pm 0,33	0,72 \pm 0,05	1,48 \pm 0,14	0,03 \pm 0,03	5,00 $\times 10^{-3}$
21	2-Heptanol	0,01 \pm 0,002	0,006 \pm 0,002	0,004 \pm 0,004	0,02 \pm 0,004	0,01 \pm 0,008	0,01 \pm 0,01	0,01
22	6-Metil-5-hepten-2-ona	0,08 \pm 0,02	0,07 \pm 0,02	0,31 \pm 0,02	0,16 \pm 0,05	0,13 \pm 0,02	0,02 \pm 0,002	1,00
23	1-Hexanol	0,49 \pm 0,08	0,86 \pm 0,14	0,53 \pm 0,05	0,42 \pm 0,07	0,77 \pm 0,25	3,69 \pm 0,34	0,40
24	E-3-Hexen-1-ol	0,26 \pm 0,09	0,43 \pm 0,04	0,20 \pm 0,02	0,16 \pm 0,03	0,30 \pm 0,09	2,10 \pm 0,40	1,00
25	Nonanal	9,63 \pm 1,45	2,71 \pm 0,36	12,08 \pm 2,62	6,02 \pm 0,76	5,72 \pm 1,27	0,60 \pm 0,75	0,15
26	1-Octen-3-ol	0,01 \pm 0,01	nd	0,07 \pm 0,01	0,01 \pm 0,004	0,02 \pm 0,004	nd	0,001
27	Ácido acético	14,55 \pm 6,87	3,35 \pm 0,46	8,12 \pm 4,31	5,50 \pm 1,45	8,97 \pm 3,42	0,33 \pm 0,09	0,50
28	Ácido propanoico	0,04 \pm 0,02	0,05 \pm 0,02	0,05 \pm 0,02	0,03 \pm 0,01	0,03 \pm 0,003	0,08 \pm 0,03	0,72
29	Ácido butanoico	0,40 \pm 0,23	2,03 \pm 0,38	0,19 \pm 0,04	0,17 \pm 0,07	0,07 \pm 0,07	0,11 \pm 0,02	0,14
30	Ácido pentanoico	0,05 \pm 0,05	0,11 \pm 0,03	0,04 \pm 0,02	nd	0,04 \pm 0,04	nd	0,60
	Total volátiles	38,79 \pm 0,47	22,44 \pm 0,12	34,67 \pm 0,68	30,01 \pm 0,20	30,12 \pm 0,70	18,26 \pm 0,38	

Nota: ¹, avinado-avinagrado; ², moho-humedad-tierra mojada; ³, madera-humedad; ⁴, aceite de oliva virgen extra; ⁵, no detectado.

La detección de los diferentes defectos sensoriales por los panelistas se debe a la ausencia y/o presencia de concentración de algunos compuestos volátiles en comparación con sus concentraciones en EVOO (Morales *et al.*, 2005). En general, los aceites con defectos sensoriales se caracterizaron por tener mayor concentración de compuestos volátiles totales (por ejemplo, 38,79 mg/kg en el defecto avinado-avinagrado) que los aceites de buena calidad (18,26 mg/kg).

En los aceites con defectos destaca la elevada concentración de aquellos compuestos producidos por la acción de procesos fermentativos y oxidativos tales como ácido acético, etanol o nonanal. Los tres compuestos mencionados tienen propiedades sensoriales que contribuyen a algunos de los defectos del VOO. Alcohólico y dulce son las características sensoriales de etanol aunque no contribuye al aroma del aceite debido a su alto umbral de olor (Tabla 4.5), agrio y picante las de ácido acético y rancio o grasiento las de nonanal (Morales *et al.*, 2005).

Con el fin de verificar la capacidad de los compuestos volátiles como marcadores de calidad de los aceites se llevó a cabo un estudio basado en PCA de estos compuestos determinados en todo el conjunto de muestras. La Figura 4.9 muestra el gráfico de PCA, en el que el factor 1, con un 44,69% de la varianza explicada, permite la separación de las muestras de EVOO de los aceites con defectos (VOO, OVOO).

Los EVOO se caracterizaron por valores más altos de 3-pentanona, hexanal, E-2-hexenal, 1-hexanol y E-3-hexen-1-ol. Esto se debe a que los compuestos C₆ son producidos por la ruta de la lipoxigenasa y son responsables de atributos sensoriales verde y frutados característicos del EVOO (Morales *et al.*, 2013).

Por otro lado, las muestras caracterizadas con el defecto sensorial moho-humedad-tierra mojada mostraron altas concentraciones de etanol (10,75 mg/kg); mientras que las muestras con el defecto avinado-avinagrado presentaron una alta concentración de ácido acético (14,55 mg/kg). Como muestra la Tabla 4.4, dos de los tres aceites caracterizados con el defecto principal avinado-avinagrado (F2 y F3) presentan como defecto secundario moho-humedad-tierra mojada. En el caso de los aceites con el defecto helada se encontraron altas concentraciones de nonanal (12,08 mg/kg), 6-metil-5-hepten-2-ona (0,31 mg/kg) y E-2-heptenal (4,76 mg/kg).

Sin embargo, en las muestras con el atributo sensorial madera-humedad, que a veces se detecta junto a helada por los panelistas, no se caracterizaron por concentraciones altas de estos volátiles. No obstante, E-2-hexenal (2,09 mg/kg) presentó altas concentraciones en este defecto, que también caracterizan EVOO, lo que indica la necesidad de buscar un marcador (Morales *et al.*, 2013). Por lo tanto, el PCA (Figura 4.9) muestra una gran dispersión de EVOO y las muestras con defectos (VOO y OVOO) debido a las diferencias en sus perfiles volátiles que son inherentes a los cultivares seleccionados (Arbequina, Hojiblanca, Picual) (Luna *et al.*, 2006a; Aparicio y García-González, 2013).

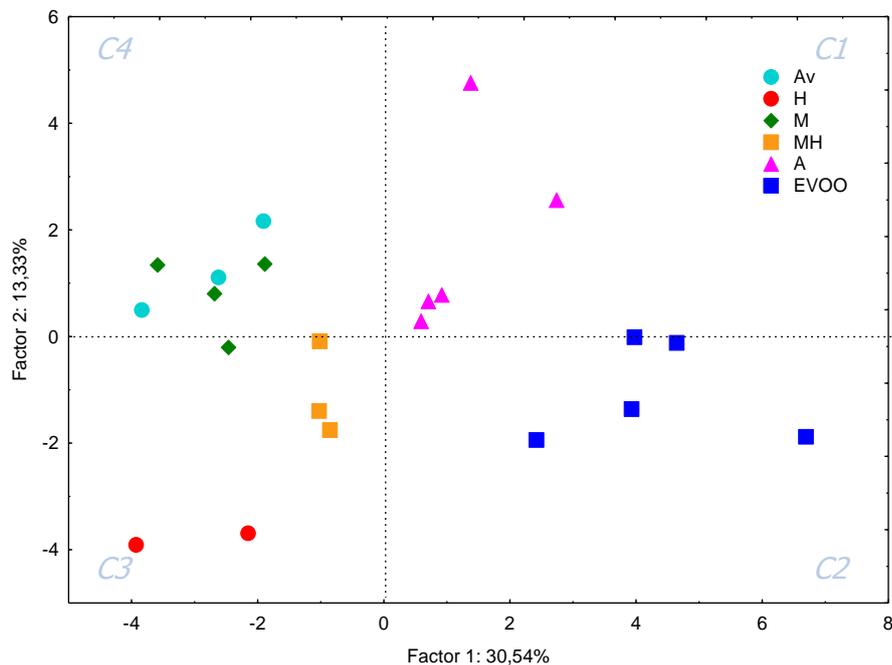


Figura 4.9. Análisis de componentes principales de las 22 muestras comerciales de aceites de oliva vírgenes extra (EVOO) y aceites de oliva vírgenes caracterizados con defectos sensoriales helada (H), avinado-avinagrado (Av), moho-humedad-tierra mojada (M), madera-humedad (MH) y atrojado-borras (A) mediante GCMS.

Estos resultados muestran la utilidad de los volátiles, así como del método validado, como una herramienta para discriminar entre VOO de diferente calidad. La clasificación de las muestras se atribuyó a la diferencia de concentración de algunos compuestos volátiles, cada uno de ellos con diferentes parámetros de validación en su determinación. En este estudio, todos los compuestos fueron incluidos en el PCA. Sin embargo, la fiabilidad del método se puede ajustar dejando fuera aquellos volátiles con características analíticas menos apropiadas (por ejemplo, 2-metil-1-butanol no tiene establecida la exactitud).

Las muestras fueron analizadas también mediante GC-FID y se llevó a cabo un estudio basado en PCA de los compuestos volátiles que fueron cuantificados con sus correspondientes rectas de calibrado (Tabla 4.2).

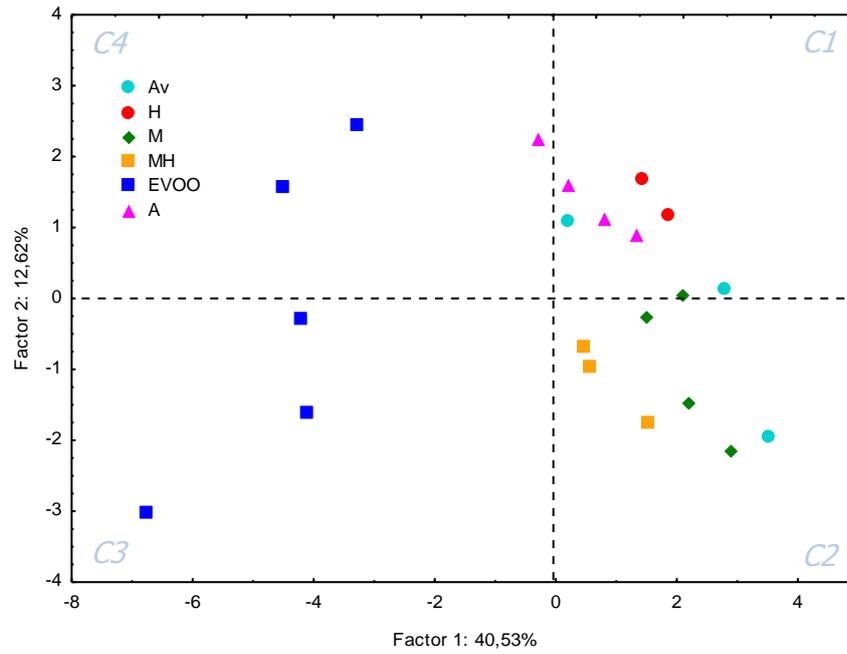


Figura 4.10. Análisis de componentes principales de las 22 muestras comerciales de aceites de oliva vírgenes extra (EVOO) y aceites de oliva vírgenes caracterizados con defectos sensoriales helada (H), avinado-avinagrado (Av), moho-humedad-tierra mojada (M), madera-humedad (MH) y atrojado-borras (A) mediante GC-FID.

Las gráficas de ambos PCA (Figuras 4.9 y 4.10) presentan una distribución similar, mostrando que en ambos casos es posible la diferenciación de los aceites con defectos, con la ventaja adicional del sistema GCMS de proporcionar una identificación precisa de los compuestos.

Una vez conocida la utilidad de los compuestos volátiles, es de interés conocer la aportación de cada compuesto al aroma del aceite. Esta aportación, que se denominada OAV (Odour Activity Value), se calcula como la relación entre la concentración del compuesto en el aceite y el umbral de olor determinado por asesores; y debe ser mayor de la unidad para que el compuesto volátil contribuya al aroma.

Los aceites comerciales categorizados como EVOO mostraron perfiles de volátiles producidos principalmente por rutas biogénicas, especialmente a través de la ruta de la lipoxigenasa (véase §1.6.1.1.). Por tanto, los compuestos responsables del aroma verde en estos aceites fueron atribuidos al hexanal (OAV = 1,20), E-2-hexenal (OAV = 2,24), 1-hexanol (OAV = 9,23) y E-3-hexen-1-ol (OAV = 2,10). Además, de aldehídos de 5 átomos de carbono, como el pentanal (OAV = 4,63), que también son encontrados en aceite de oliva (Morales *et al.*, 2005) y son producidos por la rotura del 13-hidroperóxido del ácido linolénico.

La Tabla 4.6 muestra los compuestos responsables de los principales defectos sensoriales, la concentración identificada en los 22 aceites, el umbral de olor y OAV.

Tabla 4.6. Compuestos responsables de los principales defectos sensoriales, la concentración (mg/kg), el umbral de olor (mg/kg) y OAV (mg/kg) de cada uno de los compuestos volátiles.

Defecto sensorial	Compuesto	Concentración (mg/kg)	Umbral de olor (mg/kg)	OAV
Atrojado-Borras	Octano	0,84	0,94	0,90
	Butanoato de Etilo	0,52	0,03	17,30
	Ácido Butanoico	2,03	0,14	14,50
	Ácido Propanoico	0,05	0,72	0,07
	3-Metil-1-Butanol	1,25	0,10	12,50
	2-Metil-1-Propanol	nd ¹	0,30	-
Moho-Humedad-Tierra mojada	1-Octen-3-ol	0,10	0,001	10,00
	1-Octen-3-ona	nd	0,01	-
	Acetato de Etilo	0,93	0,94	0,99
	2-Heptanol	0,02	0,01	2,00
	Ácido Acético	5,50	0,50	11,00
	E-2-Heptenal	0,72	0,005	144,00
	Ácido Propanoico	0,03	0,72	0,04
Avinado-Avinagrado	Ácido Acético	14,55	0,50	29,10
	Acetato de Etilo	0,53	0,94	0,56
	3-Metil-1-Butanol	0,95	0,10	9,50

Nota: ¹, no detectado.

Numerosos autores (Morales *et al.*, 1995; Aparicio *et al.*, 1996; Morales *et al.*, 2005) han establecido algunos compuestos volátiles como marcadores de los defectos sensoriales presentes en el VOO.

El defecto atrojado-borras, como se ha descrito anteriormente, es debido a la fermentación producida por microorganismos (*Pseudomonas* o *Clostridium*) durante el almacenamiento de la aceituna. En los aceites comerciales analizados con este defecto, tres de los principales volátiles responsables del atributo mostraron valores de OAV superiores a 1 (butanoato de etilo, ácido butanoico y 3-metil-1-butanol), por lo que, estos compuestos contribuyen al aroma. Además, algunos volátiles no caracterizados como responsables de este defecto mostraron valores de OAV >1, como el acetato de etilo (OAV = 1,46) o ácido acético (OAV = 6,70). Estos compuestos son algunos de los responsables del defecto moho-humedad-tierra mojada, lo que podría explicar que este defecto fuera el defecto sensorial secundario de los aceites (Tabla 3.1). Es destacable también el valor de OAV del ácido butanoico (14,50), que podría explicarse por la presencia del género *Pseudomonas* responsables de la degradación de alcoholes triterpénicos (Berger, 1995). Las percepciones dulce, agrío y pútrido característicos del defecto atrojado-borras en estos aceites también se deben, en parte, al 1-butanol y nonanal (OAV = 3,00 y OAV = 18,10).

El defecto moho-humedad-tierra mojada se produce también por la presencia de microorganismos, en este caso del género *Aspergillus* o *Penicillium*. Los aceites caracterizados con este defecto mostraron 12 de los 30 compuestos volátiles identificados con valores de OAV >1. De los principales volátiles descritos como responsables de este defecto todos mostraron valores de OAV >1, excepto el ácido propanoico (0,04). Siendo el E-2-heptenal el que presentó un valor superior de OAV (144,00). La caracterización sensorial de los volátiles responsables del defecto (Tabla 3.3) con notas sensoriales como moho, tierra o agrío explican este atributo sensorial. Los aceites con el defecto moho-humedad-tierra mojada fueron caracterizadas con los defectos atrojado-borras y avinado-avinagrado como defectos secundarios. Este hecho explicaría el valor de OAV de acetato de etilo (1,00), 3-metil-1-butanol (10,00) y ácido butanoico (1,21).

La razón principal de la aparición del defecto avinado-avinagrado son los procesos fermentativos causados por la contaminación microbiológica (género *Lactobacillus*) de las aceitunas. Este tipo de microorganismos inducen un aumento de la producción de compuestos volátiles como acetato de etilo, ácido acético y etanol, que son los responsables del atributo

sensorial. Sin embargo, el etanol presenta un elevado umbral de olor, siendo su valor de OAV < 1 (0,24). El ácido acético mostró el valor más elevado de OAV (29,1) responsables de este defecto, seguido del 3-metil-1-butanol (9,50). Estas muestras, además, presentaron otros volátiles con valores de OAV >1 , como el 1-octen-3-ol (10,00) o E-2-heptenal (169), lo que demuestra que el defecto sensorial secundario de estas muestras fue moho-humedad-tierra mojada. No obstante, el nonanal también mostro un elevado valor de OAV (64,20), que contribuye al aroma rancio de los aceites.

Respecto a los defectos helada y madera-humedad, no existe bibliografía que especifique qué volátiles son los responsables de los atributos sensoriales. Como se explica anteriormente, ambos defectos, a veces, son detectados como uno e, incluso, el COI (2015b) describe un sólo defecto debido a las heladas sufridas por las aceitunas en el propio árbol. Las muestras comerciales analizadas con el defecto helada y madera-humedad mostraron los mismos compuestos volátiles con valores de OAV >1 y similares para ambos defectos, como el pentanal (OAV = 5,08 y OAV = 5,33, respectivamente), 2-butanol (OAV = 7,20 y OAV = 13,67), 3-metil-1-butanol (OAV = 8,80 y OAV = 4,90), y ácido acético (OAV = 16,24) y (OAV = 17,94). Pentanal y 2-butanol mostraron los valores de OAV superiores al observado en el resto de aceites estudiados, por lo que las percepciones sensoriales de madera, leñoso, frutado y almendra de estos defectos se deben a combinaciones de estos compuestos volátiles.

Además, en estos aceites algunos de los volátiles originados por la ruta de la lipoxigenasa, propios de EVOO, mostraron valores de OAV >1 , como E-2-hexenal (2,71 en helada; 4,98 en madera-humedad) y 1-hexanol (1,33 en helada; 1,93 en madera-humedad). Por otro lado, algunos compuestos volátiles mostraron valores de OAV >1 , pero diferentes para cada defecto. En los aceites con defecto helada los valores superiores de OAV correspondieron a E-2-heptenal (956,00), nonanal (80,00) y 1-octen-3-ol (70,00). Las notas sensoriales de estos aceites a humedad o jabonoso pueden atribuirse a E-2-heptenal. Estas muestras presentaron como defectos secundarios moho-humedad-tierra mojada (1-octenl-3-ol) y rancio (nonanal). En comparación, en los aceites con el defecto madera humedad los valores más elevados de OAV fueron ésteres responsables del atributo dulces, butanoato de etilo (OAV = 2,00) y 2-metil butanoato de etilo (OAV = 55,56).

En este estudio, el número de muestras con los defectos helada y madera-humedad no permite conocer los marcadores sensoriales, por tanto, se han analizado en profundidad los compuestos volátiles de ambos defectos en la Sección 4.3.

Se ha aplicado el procedimiento matemático de análisis por componentes principales (PCA) para determinar si los volátiles con valores de OAV >1 son capaces de mostrar diferencias entre muestras caracterizadas con defectos sensoriales, y de éstas con aceites de oliva vírgenes extra. El análisis estadístico con sólo las concentraciones de 15 compuestos volátiles permitió encontrar diferencias entre las muestras. La Figura 4.11 representa los dos primeros factores extraídos con este procedimiento estadístico.

El resultado del PCA muestra que los aceites con atributos sensoriales verde, dulce y frutado (muestras con defecto helada, madera-humedad y EVOO) se encuentran en los cuadrantes 1 y 4. Este hecho indica que las concentraciones de los compuestos seleccionados (OAV >1) son diferentes a las concentraciones mostradas por los defectos fermentativos (moho-humedad-tierra mojada, avinado-avinagrado y atrojado). Los aceites con estos defectos se encuentran en el cuadrante 2 y 3 con notas sensoriales de amargo, avinado, champiñón.

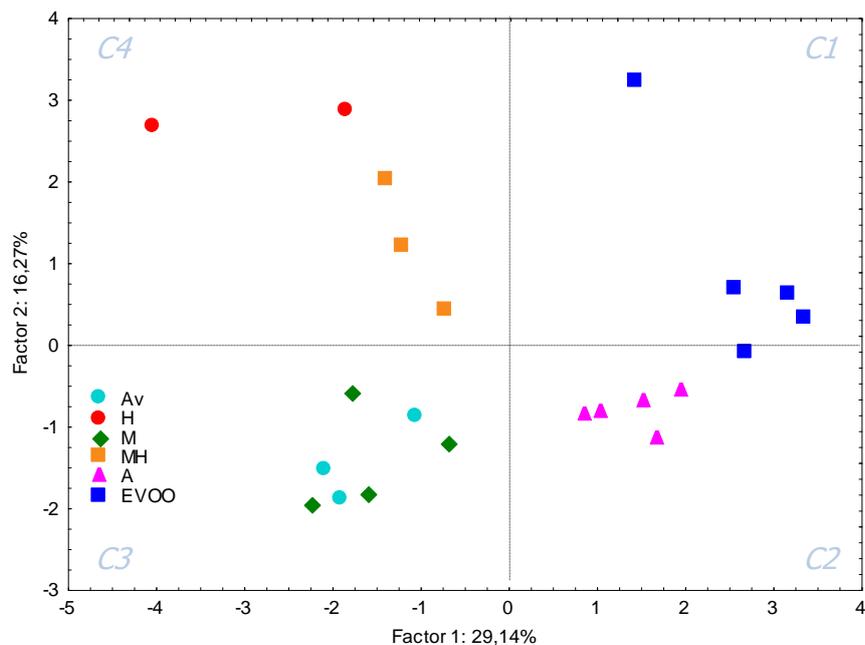


Figura 4.11. Análisis de componentes principales de 22 muestras de aceites de oliva vírgenes extra (EVOO) y aceites de oliva vírgenes caracterizados con defectos sensoriales helada (H), avinado-avinagrado (Av), moho-humedad-tierra mojada (M), madera-humedad (MH) y atrojado-borras (A) teniendo en cuenta los volátiles con OAV >1.

Una vez conocida la validez método y la capacidad de los volátiles para clasificar aceites de diferentes categorías, se decidió ampliar el número de muestras con un conjunto de aceites con y sin defectos (Tabla 3.2). También se ha aplicado PCA para determinar si la concentración de los volátiles que mostraron valores de OAV >1 son capaces de encontrar diferencias entre las 38 muestras caracterizadas con defectos sensoriales y las muestras de

EVOO. La Figura 4.12 representa los dos primeros factores extraídos con este procedimiento estadístico.

El resultado del PCA muestra 4 grupos de aceites. Por un lado, los EVOO se diferencian de los aceites con defectos, excepto una muestra que puede presentar ligeros defectos debido al almacenamiento (rancidez). Por otro lado, las muestras con defectos se encuentran clasificadas en tres grupos: helada y madera-humedad, moho-humedad-tierra mojada y avinado-avinagrado, y atrojado-borras. En el caso de los aceites con el defecto helada (H) y madera-humedad (MH) se localizan próximas entre si debido a que sus perfiles de compuestos volátiles son diferentes del resto de muestras (Tabla 4.5). Los aceites caracterizados con el defecto sensorial atrojado-borras (A), el panel de cata las caracterizó con el defecto secundario moho-humedad-tierra mojada y se encuentran muy cercanas a este defecto (M). Algunas de las muestras caracterizadas con el defecto avinado-avinagrado (Av) se sitúan en la zona central del eje X pero muy cercanas a las caracterizadas con el defecto moho-humedad-tierra mojada (M).

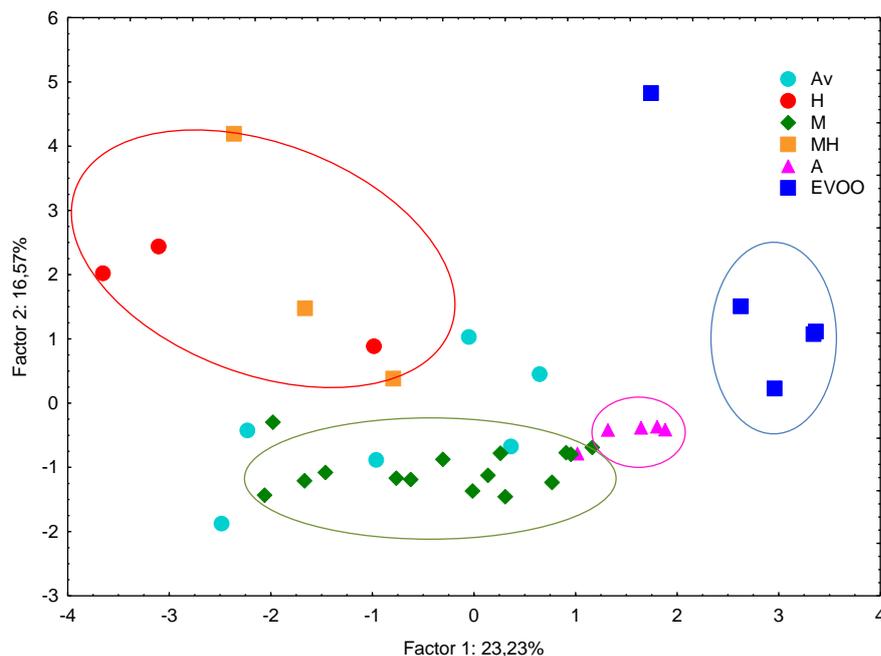


Figura 4.12. Análisis de componentes principales de las 38 muestras de aceites de oliva vírgenes extra (EVOO) y aceites de oliva vírgenes caracterizados con defectos sensoriales helada (H), avinado-avinagrado (Av), moho-humedad-tierra mojada (M), madera-humedad (MH) y atrojado-borras (A) teniendo en cuenta los volátiles con OAV >1.

Los resultados demuestran que el método validado basado en GCMS permite obtener información sobre la calidad de los VOO y detectar aceites con defectos sensoriales gracias a los compuestos volátiles. Aunque no todos los laboratorios poseen un cromatógrafo de gases

acoplado a un espectrómetro de masas, existen nuevos equipos de rutina, como el usado en esta tesis, que están extendiendo el uso de GCMS en laboratorios pequeños y medianos. No obstante, en la mayoría de los laboratorios sí existen equipos con detector FID. La comparación de los resultados obtenidos con GCMS con aquellos del GC-FID, tanto en sus parámetros de calidad como en su capacidad de detectar defectos, demuestran que ambos procedimientos son adecuados para este tipo de estudios. En caso de utilización de un método GC-FID se debe asegurar la identificación previa de los compuestos volátiles con estándares.

Las principales diferencias entre ambos procedimientos en cuanto a sus parámetros de calidad son una mayor sensibilidad, selectividad y precisión con GCMS. Respecto a la exactitud, ambos métodos son aceptables, con un nivel de confianza del 98%. Se ha observado una linealidad y precisión aceptable del método para la cuantificación de los compuestos volátiles, con valores bajos de RSD% (<10%) en repetibilidad y precisión intermedia. En cuanto a la linealidad determinada para el GCMS, no supone ninguna merma en la calidad de los resultados, teniendo en cuenta que las concentraciones de la mayoría de los compuestos volátiles en el aceite no suelen superar los 6 mg/kg, salvo cuando el aceite de oliva virgen presenta defectos con medianas de defectos elevados (<5). Además existe la posibilidad de usar una ecuación logarítmica.

Debido a la necesidad en el sector del aceite de oliva del desarrollo de herramientas de análisis que apoyen al panel de cata (EU, 2020) existen procedimientos analíticos disponibles, que deben ser validados y las aplicaciones deben demostrar su validez frente a muestras de diferentes características. Los compuestos volátiles del aceite de oliva como parámetro de evaluación objetiva de la calidad del VOO podrían servir de apoyo al análisis sensorial del panel de cata, así como se ha demostrado la utilidad de estos compuestos en la calidad del VOO, en la clasificación de aceites con o sin defectos, y diferenciar entre aceites con diferentes defectos, incluso en aceites con ligeros defectos (mediana de defectos <3).

4.2. Compuestos fenólicos

Como se ha descrito anteriormente, los compuestos fenólicos son considerados los principales responsables del sabor de los VOO, son responsables de los atributos sensoriales amargo y picante valorados positivamente desde el punto de vista de su calidad sensorial. Además, los fenoles poseen propiedades antioxidantes, que presentan un papel relevante en la protección de los aceites frente a la oxidación y, por tanto, en su estabilidad oxidativa, lo que es importante desde el punto de vista de la calidad. Por último, estas mismas propiedades antioxidantes les otorga un papel fundamental en los atributos saludables del VOO debido al aporte de compuestos bioactivos a la dieta, como se recoge en el Health Claim del VOO (EFSA, 2011).

El papel de los compuestos fenólicos, en estas distintas facetas de la calidad, les hace ser objetivo de un estudio de este tipo, en el que interesa establecer hasta qué punto estos compuestos proporcionan una información de utilidad en la evaluación de la calidad de los VOO. Aunque existen numerosos estudios sobre los compuestos fenólicos en VOO (Servili *et al.*, 2004; Sánchez de Medina *et al.*, 2015; Bajoub *et al.*, 2015), la mayoría de ellos están centrados en la categoría EVOO (Gómez-Rico *et al.*, 2009; Alkan *et al.*, 2012). No obstante, algunos aceites con defectos sensoriales pueden poseer concentraciones similares a EVOO, e incluso, atributos sensoriales amargo y picante a un nivel perceptible (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2015). Por este motivo, en este estudio se incluirán muestras de diferentes categorías, incluyendo aceites con defectos.

El interés de los fenoles desde el punto de vista sensorial y saludable ha contribuido a la existencia de numerosos métodos analíticos para la determinación de estos compuestos (Mateos *et al.*, 2001; Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2006; COI, 2009). Sin embargo, la armonización de todos los métodos es complicada y la comparación de sus resultados es difícil (Romero y Brenes, 2014). El COI (2009) ha establecido un método para la determinación de los compuestos fenólicos del VOO basado en la separación individual de los fenoles. Hasta el momento, el COI no ha especificado en su norma comercial (2015a) ningún límite para estos compuestos.

La determinación de fenoles se ha llevado a cabo mediante HPLC, utilizando patrones internos, bajo las condiciones detalladas en el apartado §3.2.2. Para la detección y cuantificación de los fenoles se han usado diferentes longitudes de onda (235, 280 y 335 nm).

La Figura 4.13 muestra los cromatogramas de una muestra de aceite de oliva virgen extra registrada a las diferentes longitudes de onda. La $\lambda = 280$ nm se ha usado para llevar a cabo la identificación y cuantificación de la mayor parte de los compuestos fenólicos (Tabla 4.7) (Mateos *et al.*, 2001), usando como patrón interno el ácido *p*-hidroxifenilacético (Figura 4.13A). La $\lambda = 235$ nm se ha usado para confirmar la detección de los fenoles encontrados a $\lambda = 280$ nm (Figura 4.13B), especialmente los derivados secoiridoideos. Y, por último, la $\lambda = 335$ nm (Figura 4.13C) se ha usado para la detección y cuantificación de las flavonas (ácido ferúlico, luteolina y apigenina), usando como patrón interno el ácido *o*-cumárico (Tabla 4.7).

Tabla 4.7. Compuestos fenólicos identificados en aceite de oliva virgen en los cromatogramas obtenidos a $\lambda = 280$ y 335 nm.

Código	Compuesto
<i>Cromatograma $\lambda = 280$ nm y $\lambda = 235$ nm</i>	
1	Hidroxitirosol (Hty)
2	Tirosol (Ty)
IS ₁	Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético
3	Ácido vainílico
4	Vainillina
5	Ácido <i>p</i> -cumárico
6	Acetato de hidroxitirosol (3,4-DHPEA-AC)
7	Forma dialdehídica de descarboximetil aglucona de oleuropeína (3,4-DHPEA-
8	Acetato de Tirosol (<i>p</i> -HPEA-AC)
9	Forma dialdehídica de descarboximetil aglucona de ligustrósido (<i>p</i> -HPEA-
10	Pinorresinol
11	Ácido cinámico
12	1-Acetoxipinorresinol
13	Forma aldehídica e hidroxílica de aglucona de oleuropeína (3,4-DHPEA-EA)

14 Forma aldehídica e hidroxílica de aglucona de ligustrósido (*p*-HPEA-EA)

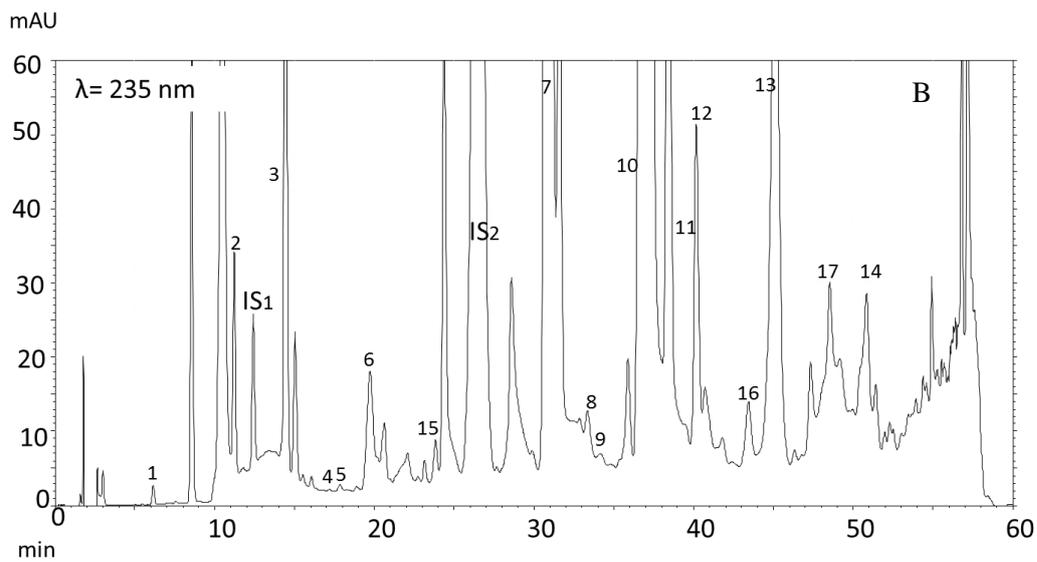
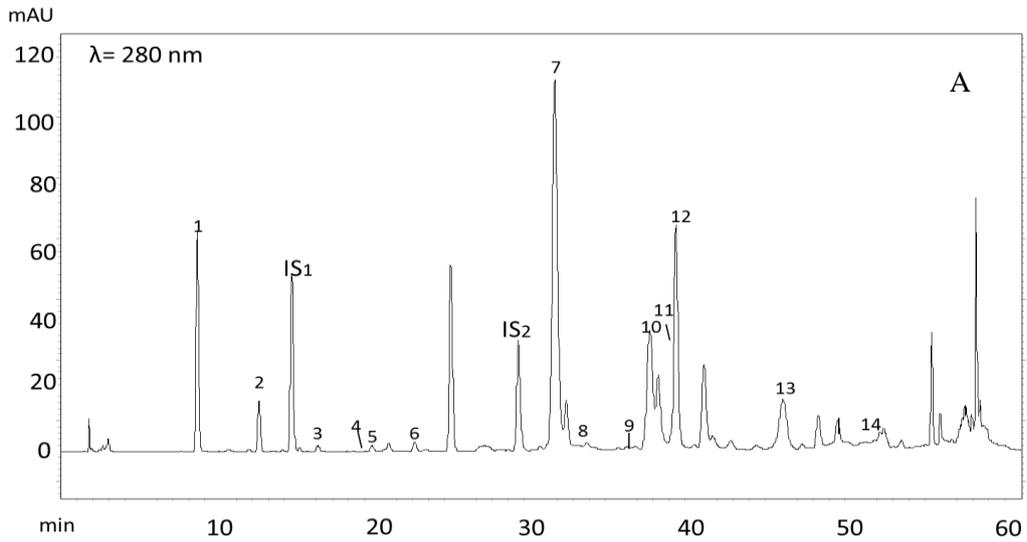
Cromatograma a $\lambda = 335$ nm

IS₂ Ácido *o*-cumárico

15 Ácido ferúlico

16 Luteolina

17 Apigenina



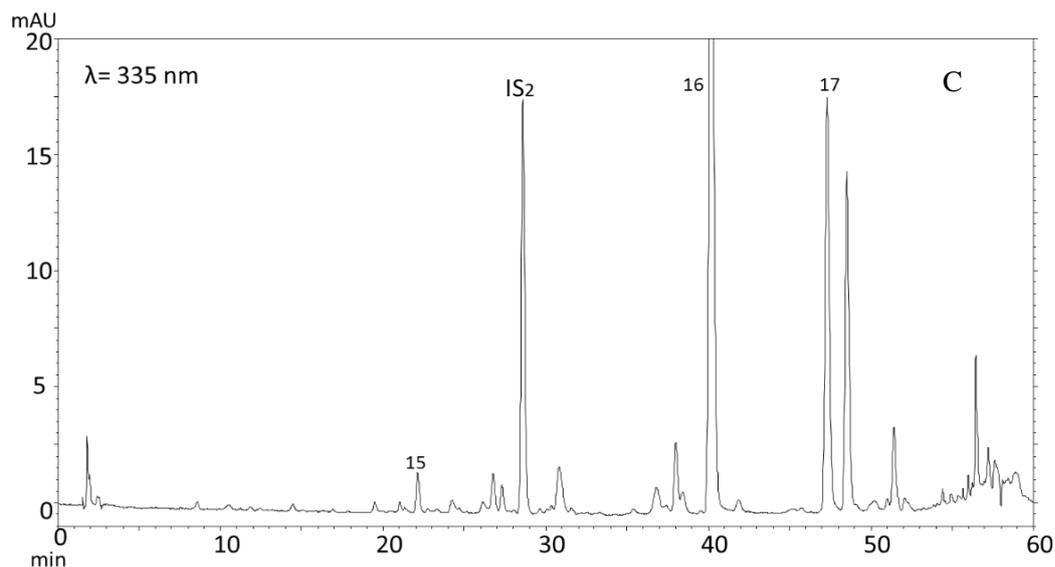


Figura 4.13. Cromatogramas a $\lambda = 280 \text{ nm}$ (A), 235 nm (B) y 335 nm (C) de compuestos fenólicos identificados en una muestra de EVOO. Los códigos se muestran en la Tabla 4.7.

4.2.1. Validación del método

Como se ha descrito anteriormente, el método implementado en la determinación de compuestos fenólicos fue desarrollado y validado por Mateos *et al.* (2001). No obstante, antes de su aplicación a las muestras objeto de estudio, se ha llevado a cabo una validación parcial del método, que ha estado centrada en la evaluación de los parámetros de calidad analíticos para la determinación de 4 de los compuestos fenólicos: ácidos vainílico, ferúlico y cinámico, y vainillina. Estos compuestos se encuentran en baja concentración tanto en EVOO como en aceites con defectos sensoriales (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2015; Sánchez de Medina *et al.*, 2015), por lo que existía interés en conocer los parámetros de calidad del método aplicado para su determinación. Asimismo, en este estudio se incluyeron los patrones internos *p*-hidroxifenilacético y *o*-cumárico, con el fin de evaluar como responderán al método.

4.2.1.1. Precisión

Se ha establecido la precisión del método evaluando tanto la repetibilidad como la precisión intermedia. Para ello se analizó 8 veces la misma muestra en una única sesión de trabajo y durante 8 días no consecutivos (véase §4.1.1.3.4).

La Tabla 4.8 muestra los valores de RSD% en repetibilidad y precisión intermedia para una muestra de EVOO (F20, Tabla 3.1).

Tabla 4.8. Repetibilidad, precisión intermedia y recuperación del método.

Compuesto	Repetibilidad RSD ¹ %	Precisión intermedia RSD ¹ %	Recuperación (%)
Ácido cinámico	4,02	5,81	81,84
Ácido ferúlico	0,20	3,12	82,10
Ácido vainílico	1,60	3,30	80,31
Vainillina	4,15	9,67	92,46
Ácido <i>o</i> -cumárico	1,87	5,85	95,07
Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético	1,78	2,46	94,76

Nota: ¹, desviación estándar relativa (RSD%).

Los resultados obtenidos en ambos estudios mostraron que el método presenta valores de RSD% inferiores al 10% en la determinación de los compuestos fenólicos. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Mateos *et al.* (2001). El ácido ferúlico mostró el valor mínimo (0,20%) para RSD% en repetibilidad y en precisión intermedia (3,12%); por el contrario, los valores máximo de RSD% correspondieron a la vainillina en ambos estudios (4,15% y 9,67%, respectivamente). En cuanto a los patrones internos estudiados (ácidos *o*-cumárico y *p*-hidroxifenilacético), la repetibilidad del método fue similar en ambos compuestos (1,87 y 1,78%). Sin embargo, el ácido *o*-cumárico mostró un RSD% en precisión intermedia superior (5,85%) al de ácido *p*-hidroxifenilacético (2,46%).

4.2.1.2. Linealidad

Se ha estudiado la linealidad de la respuesta proporcionada por el método basado en HPLC-DAD para cada uno de los compuestos. Para ello se han construido las correspondientes rectas de calibrado utilizando un intervalo de concentraciones de 0,05-10,00 mg/kg y se han analizado los coeficientes de regresión, obteniéndose valores entre 0,998 y 0,999 (Tabla 4.8). También se ha evaluado la distribución de los residuos de la regresión y la desviación estándar relativa de la regresión (RSD_b), la distribución de los residuales fue aleatoria y los valores de RSD_b entre 1,63 y 6,58 % (Tabla 4.9). Quedó establecida, por tanto, la linealidad de la respuesta en el intervalo de concentraciones evaluado.

Tabla 4.9. Resumen de los parámetros de calidad analíticos del método basado en HPLC-DAD.

Compuesto	λ^1	$R^2_{aj}^2$	RSD _b ³	Recta de calibrado	LOD ⁴	LOQ ⁴	Exactitud	Sensibilidad ($\times 10^5$)	W_R^5
Ácido cinámico	280	0,999	5,72	$Y = 1,39 \cdot 10^4 + 2,51 \cdot 10^6 X$	0,04	0,12	81,84	25,15	0,12-5,00
Ácido ferúlico	335	0,999	4,56	$Y = 3,08 \cdot 10^5 + 1,85 \cdot 10^3 X$	0,02	0,07	82,10	3,08	0,07-10,00
Ácido vainílico	280	0,999	3,43	$Y = -8,41 \cdot 10^3 + 5,95 \cdot 10^5 X$	0,03	0,09	80,31	5,96	0,09-5,00
Vainillina	280	0,999	6,58	$Y = 5,90 \cdot 10^3 + 1,13 \cdot 10^6 X$	0,03	0,11	92,46	11,31	0,11-5,00
Ácido <i>o</i> -cumárico	335	0,998	1,63	$Y = 1,62 \cdot 10^5 + 2,13 \cdot 10^3 X$	0,03	0,11	95,10	1,62	0,11-18,00
Ácido <i>p</i> -hidroxifenilacético	280	0,998	1,72	$Y = 6,81 \cdot 10^3 + 2,77 \cdot 10^4 X$	0,02	0,06	94,76	0,27	0,06-180,00

Nota: ¹, nm; ², coeficiente de regresión ajustada; ³, desviación estándar relativa (RSD); ⁴, límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) (mg/kg); ⁵, intervalo dinámico de trabajo (W_R) (mg/kg).

4.2.1.3. Límites de detección y cuantificación

Los LOD y LOQ se determinaron a partir de los datos de las rectas de calibrado (véase §4.1.1.3.2). La Tabla 4.9 muestra los resultados obtenidos para cada compuesto fenólico y para los 2 patrones internos. Se observa que el método ofrece una respuesta adecuada para detectar y cuantificar bajas concentraciones ($\text{LOD} \leq 0,04$, $\text{LOQ} \leq 0,11$), por lo que es útil para llevar a cabo el análisis de compuestos fenólicos del VOO en el que, a veces, pueden encontrarse niveles de trazas. Este es el caso del ácido vainílico (0,19 mg/kg) (Servili *et al.*, 2004) o vainillina (0,06 mg/kg) (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2015).

4.2.1.4. Intervalo dinámico de trabajo

El intervalo de trabajo se establece con el valor mínimo de LOQ y la concentración más alta ensayada con buena linealidad (Boqué *et al.*, 2002). La Tabla 4.9 muestra los intervalos obtenidos para los compuestos fenólicos evaluados. Todos ellos mostraron linealidad ($R_{aj}^2 > 0,990$) dentro del intervalo de concentraciones ensayado. Los compuestos que se encuentran en baja concentración en el aceite de oliva, como ácido vainílico o vainillina (Servili *et al.*, 2004), fueron probados en un rango más estrecho (0,05-5,00 mg/kg), dando lugar igualmente a resultados satisfactorios en linealidad.

4.2.1.5. Exactitud

En el estudio de la exactitud de los compuestos fenólicos se utilizó una muestra de aceite de oliva refinado a la que se añadieron estándares de los distintos compuestos en concentraciones conocidas. Previamente se llevó a cabo un análisis del aceite refinado para comprobar que carecía de estos compuestos observándose ausencia de respuesta en los tiempos de retención correspondientes.

La determinación de la exactitud se llevó a cabo a través de un procedimiento basado en estudios de recuperación (Boqué *et al.*, 2002). La exactitud se ha evaluado en términos de “exactitud aparente” y se han calculado los porcentajes de recuperación correspondientes (véase §4.1.1.3.5).

La Tabla 4.8 muestra los porcentajes de recuperación de los fenoles estudiados. En todos los casos se obtuvieron valores por encima del 80%. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Mateos *et al.* (2001). La vainillina fue el compuesto que mostró un porcentaje de recuperación más elevado (92,46%). Por el contrario, el porcentaje de recuperación más bajo correspondió al ácido vainílico (80,31%). Además, se observa que los patrones internos presentaron porcentajes de recuperación mayores que los obtenidos para los 4 fenoles estudiados.

4.2.1.6. Sensibilidad

Desde un punto de vista práctico, la sensibilidad corresponde al gradiente de la recta de calibrado. Dentro del rango lineal, la sensibilidad es, por tanto, la pendiente de la línea de calibración. La Tabla 4.9 muestra los valores obtenidos, siendo el ácido cinámico el compuesto que mostró un valor superior ($25,15 \times 10^5$). Por el contrario, el valor menor de sensibilidad correspondió al ácido ferúlico ($3,08 \times 10^5$). En cuanto a los patrones internos estudiados, el ácido *p*-hidroxifenilacético presentó el valor más bajo ($0,25 \times 10^5$), que fue 6 veces menor que la sensibilidad determinada para el *o*-cumárico ($1,62 \times 10^5$).

4.2.2. Compuestos fenólicos en muestras de aceite de oliva virgen

Para llevar a cabo el estudio de los compuestos fenólicos se han analizado 22 muestras comerciales proporcionadas por diferentes productores (Tabla 3.1.). La Tabla 4.10 muestra las concentraciones medias de los compuestos fenólicos individuales, así como las concentraciones de fenoles totales, *o*-difenoles, secoiridoides y lignanos de las muestras comerciales agrupadas según los diferentes defectos sensoriales y en muestras sin defectos (EVOO). Así mismo, se incluye el contenido de aquellos fenoles a los que hace referencia la alegación de salud del aceite de oliva (Health Claim on olive oil polyphenols) apoyado por el panel de la EFSA (EFSA, 2011) y regulado por la Unión Europea (CE, 2012). Estos fenoles son hidroxitirosol, tirosol y derivados. El Anexo I (Tabla 1) muestra las concentraciones de los compuestos fenólicos identificados en las 22 muestras comerciales.

Las muestras de EVOO presentaron mayor concentración de fenoles totales ($311,99 \pm 75,05$ mg/kg), que las muestras caracterizadas con diferentes defectos (media de $179,35 \pm 101,34$ mg/kg). La Tabla 4.10 muestra la concentración de los compuestos fenólicos que mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las muestras de EVOO y las muestras con defectos sensoriales.

En los EVOO, el hidroxitirosol mostró una concentración superior ($17,03 \pm 5,12$ mg/kg) a la determinada en los aceites con defectos sensoriales (media de $10,73 \pm 3,47$ mg/kg), obteniéndose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre ambos valores. Este compuesto es el fenol al que se le atribuye la mayor actividad antioxidante (Tsimidou, 2013), y es el más inestable, lo que corrobora una concentración menor en los aceites con defectos. Además, las muestras de EVOO mostraron un contenido superior de ácido vainílico ($0,76 \pm 0,54$ mg/kg) y vainillina ($0,05 \pm 0,04$ mg/kg) ($p < 0,05$) respecto a las muestras con defectos ($0,34 \pm 0,09$ mg/kg; $0,02 \pm 0,005$ mg/kg, respectivamente). Los ácidos fenólicos, entre ellos el ácido vainílico, junto con otros fenoles, prolongan la vida útil del aceite, retrasando las reacciones de oxidación, y contribuyen a algunas de sus propiedades sensoriales tales como los atributos picante, astringente y amargo (Berzas-Nevado *et al.*, 2009). Por otro lado, los lignanos (1-acetoxipinorresinol y pinorresinol), que son los compuestos fenólicos que perduran más en el aceite durante su almacenamiento (Brenes *et al.*, 2001), mostraron una concentración superior en las muestras de EVOO ($48,32 \pm 13,41$ mg/kg) frente a los aceites con defectos (media de $16,63 \pm 11,28$ mg/kg) ($p < 0,05$). En cuanto a la concentración de los *o*-difenoles, el contenido fue superior en los EVOO que en las muestras con defectos ($p < 0,05$). Estos compuestos son los fenoles que se degradan más rápidamente durante el almacenamiento del aceite a temperatura ambiente (Brenes *et al.*, 2001).

Tabla 4.10. Concentraciones (media \pm desviación estándar) (mg/kg) de los compuestos fenólicos en las muestras comerciales de aceite de oliva virgen agrupadas en defectos.

Compuestos	Avinado ¹	Atrojado ²	Helada	Moho ³	Madera ⁴	EVOO ⁵ (SD)
	n=3	n=5	n=2	n=4	n=3	n=5
Hidroxitirosol	11,30 \pm 1,59**	6,91 \pm 2,13**	9,98 \pm 1,12**	9,20 \pm 4,01**	16,25 \pm 2,40**	17,03 \pm 5,12*
Tirosol	9,77 \pm 4,24	8,69 \pm 1,95	8,65 \pm 3,08	10,70 \pm 3,02	16,68 \pm 3,29	10,42 \pm 2,14
Ácido vainílico	0,26 \pm 0,09	0,36 \pm 0,14	0,48 \pm 0,17	0,36 \pm 0,22	0,25 \pm 0,09	0,76 \pm 0,54*
Vainillina	0,03 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01	0,03 \pm 0,001	0,02 \pm 0,003	0,02 \pm 0,002	0,05 \pm 0,04*
Ácido <i>p</i> -Cumárico	0,22 \pm 0,10**	0,08 \pm 0,02**	0,15 \pm 0,018**	0,13 \pm 0,03**	0,26 \pm 0,02**	0,17 \pm 0,07
3,4-DHPEA-AC	3,83 \pm 0,39**	5,48 \pm 1,28**	4,78 \pm 0,91**	3,72 \pm 1,09**	1,27 \pm 0,51**	5,06 \pm 2,75
3,4-DHPEA-EDA	21,49 \pm 9,73**	4,26 \pm 1,81**	103,21 \pm 27,51**	9,80 \pm 4,52**	22,13 \pm 8,54**	92,02 \pm 30,32*
<i>p</i> -HPEA-AC	4,09 \pm 2,02**	1,76 \pm 0,81**	33,88 \pm 2,45**	2,90 \pm 1,05**	6,54 \pm 2,58**	35,71 \pm 14,39*
<i>p</i> -HPEA-EDA	1,34 \pm 0,75	1,63 \pm 0,90	1,49 \pm 0,39	1,71 \pm 1,02	1,11 \pm 0,21	2,17 \pm 1,13
Pinorresinol	5,81 \pm 1,25**	2,99 \pm 0,93**	10,07 \pm 1,59**	3,37 \pm 1,49**	8,63 \pm 2,12**	11,58 \pm 2,47*
Ácido cinámico	0,06 \pm 0,05	0,02 \pm 0,08	nd ⁶	0,15 \pm 0,02	0,17 \pm 0,11	nd ⁶
1-Acetoxipinorresinol	5,34 \pm 4,43**	6,66 \pm 1,34**	26,09 \pm 6,55**	6,34 \pm 2,45**	7,86 \pm 0,22**	36,73 \pm 11,50*
3,4-DHPEA-EA	50,00 \pm 10,80**	10,39 \pm 2,79**	110,11 \pm 38,25**	28,67 \pm 6,91**	90,97 \pm 25,54**	103,66 \pm 38,44*
<i>p</i> -HPEA-EA	41,49 \pm 9,48**	37,41 \pm 4,91**	45,99 \pm 10,19**	42,10 \pm 16,20**	95,03 \pm 30,48**	45,50 \pm 21,04
Ácido ferúlico	0,17 \pm 0,10	0,04 \pm 0,02	0,10 \pm 0,03	0,14 \pm 0,05	0,06 \pm 0,05	0,16 \pm 0,10

Luteolina	0,13 ± 0,08	0,13 ± 0,08	0,05 ± 0,001	0,10 ± 0,03	0,16 ± 0,09	0,33 ± 0,27*
Apigenina	0,12 ± 0,03	0,06 ± 0,02	0,07 ± 0,003	0,08 ± 0,03	0,37 ± 0,15	0,08 ± 0,06
<i>o</i> -Difenoles	86,75 ± 17,61**	27,17 ± 5,26**	228,13 ± 40,15**	56,49 ± 23,36**	138,78 ± 26,58**	218,10 ± 56,16*
Secoiridoides	114,32 ± 28,11**	53,70 ± 6,83**	260,80 ± 28,34**	82,28 ± 8,53**	209,24 ± 30,25**	243,18 ± 51,97*
Lignanós	11,15 ± 3,74**	9,65 ± 1,90**	36,16 ± 8,16**	9,70 ± 5,94**	16,49 ± 2,20**	48,32 ± 13,41*
Fenoles totales	155,46 ± 33,01**	86,88 ± 9,78**	355,13 ± 50,10**	119,48 ± 13,58**	267,74 ± 37,25**	361,99 ± 86,72
Fenoles Health Claim ⁷	143,37 ± 27,04**	76,54 ± 9,01**	318,09 ± 51,54**	108,79 ± 8,85**	249,98 ± 23,57**	311,99 ± 75,05*

Nota: ¹, avinado-avinagrado; ², atrojado-borras; ³, moho-humedad-tierra mojada; ⁴, madera-humedad; ⁵, aceite de oliva virgen extra, sin defectos (SD); ⁶, no detectado; ⁷, fenoles recomendados por el panel de la EFSA (EFSA, 2011); *, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras de EVOO y muestras con defectos; **, diferencias significativas ($p < 0,05$) entre muestras con diferentes defectos.

Además de observarse diferencias entre EVOO y aceites con defectos, se observó que existen diferencias en las concentraciones de fenoles de las muestras con defectos sensoriales (Tabla 4.10). Las muestras con el defecto moho-humedad-tierra mojada mostraron una concentración media de compuestos fenólicos de 119,48 mg/kg. El segundo derivado de tirosol, *p*-HPEA-EA, es el fenol con mayor concentración en estos aceites (42,10 mg/kg) y ha sido descrito como responsable del atributo picante (Tsimidou, 2013).

Como se ha explicado en la introducción (véase §1.6.1.3.), el defecto avinado-avinagrado es producido por una fermentación causada por la acción de microorganismos del género *Acetobacter* o *Lactobacillus*, entre otros. En el caso de *Lactobacillus plantarum*, produce un aumento de *o*-difenoles, en particular del segundo derivado de hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EA). La concentración de dicho compuesto en las muestras analizadas es superior (21,49 mg/kg) a la concentración observada en el resto de aceites con defectos producidos por fermentación, moho-humedad-tierra mojada y atrojado-borras (4,26 y 9,80 mg/kg, respectivamente).

En el caso de los aceites con el defecto principal atrojado-borras, estos mostraron las concentraciones más bajas de fenoles totales (86,88 mg/kg). Esta concentración tan reducida se puede explicar por la acción de los microorganismos responsables de la fermentación (*Clostridium* o *Pseudomonas*) (Morales *et al.*, 2005), que pueden afectar a la concentración de fenoles (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2015). De esta forma, el género *Pseudomonas* es capaz de proporcionar elevados niveles de la enzima catecol 2,3-dioxigenasa que degrada los fenoles (Hinteregger *et al.*, 1992). Por otro lado, el género *Clostridium* también contribuye a la degradación de los fenoles mediante la enzima 4-hidroxibenzoato descarboxilasa, que convierte a los fenoles en 4-hidroxibenzoato vía carboxilación anaeróbica (He y Wiegel, 1995). Los aceites con el defecto atrojado-borras mostraron concentraciones inferiores del

primer derivado de hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EDA; 4,26 mg/kg) y pinorresinol (2,99 mg/kg) en comparación con el resto de muestras (Tabla 4.10). Respecto a los atributos picante y amargo, estos aceites mostraron la menor intensidad en ambos casos (Tabla 4.4), lo cual puede relacionarse con la baja concentración de secoiridoides presente en estas muestras (53,70 mg/kg).

Las muestras caracterizadas con el defecto madera-humedad presentaron claras diferencias en su contenido de fenoles respecto al resto de muestras con defectos sensoriales. Estos aceites mostraron una concentración elevada de hidroxitirosol (16,25 mg/kg). Por otro lado, el contenido menor de 3,4-DHPEA-AC (1,27 mg/kg) correspondió a este defecto. Además, es destacable, la elevada concentración de pinorresinol y segundo derivado de tirosol (*p*-HPEA-EA) (8,63 y 95,03 mg/kg; Tabla 4.10). Este último fenol mostró, incluso, una concentración superior respecto a las muestras de EVOO (45,50 mg/kg). Por otro lado, el contenido medio de los fenoles descritos en la alegación de salud referente a los polifenoles del VOO (CE, 2012) en las muestras con el defecto madera-humedad ($249,98 \pm 23,57$ mg/kg) está en el límite de la cantidad establecida (250 mg/kg). Esta elevada concentración de fenoles (425,14 mg/kg) en una muestra con este defecto se relaciona con una mayor puntuación en los atributos de sabor picante y amargo (4,1 y 3,5; Tabla 4.4).

Por último, las muestras caracterizadas con el defecto helada mostraron un contenido de fenoles totales ($355,13 \pm 50,10$ mg/kg) muy similar al de EVOO ($361,99 \pm 86,72$ mg/kg). Los aceites con este defecto poseían una concentración de hidroxitirosol, tirosol y derivados (318,09 mg/kg) superior a la cantidad establecida (250 mg/kg) en la alegación de salud de polifenoles del VOO (CE, 2012).

Los valores máximos de concentración de fenoles correspondieron a los aceites con defectos madera-humedad y helada, que son dos defectos cuyo origen principal no se debe a procesos fermentativos. En este sentido, los aceites con estos defectos mostraron una concentración de acetato de tirosol (*p*-HPEA-AC) ($20,21 \pm 19,33$ mg/kg) mayor que la determinada en los aceites con defectos fermentativos ($2,92 \pm 1,17$ mg/kg) ($p < 0,05$). En cuanto al contenido del primer derivado del hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EDA), estas muestras presentaron también elevadas concentraciones (103,21 mg/kg en aceites con defecto helada; 22,13 mg/kg en madera-humedad). Además, la cantidad de pinorresinol en estas muestras ($9,35 \pm 1,02$ mg/kg) es superior a las cantidades observadas en los defectos fermentativos ($4,05 \pm 1,53$ mg/kg).

Una vez puesta de manifiesto la presencia de diferencias significativas en el contenido de fenoles de los aceites con diferentes defectos sensoriales, y con el fin de verificar la capacidad de los compuestos fenólicos como marcadores de calidad del VOO, se realizó una prueba de rango múltiple (test de Duncan) aplicada a las concentraciones determinadas por HPLC-DAD, que seleccionó los compuestos que ofrecían mayor información en la distinción entre aceites con defectos fermentativos y no fermentativos. El segundo derivado de hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EA) fue seleccionado por el test de Duncan por mostrar una concentración superior en los aceites con defectos fermentativos. Este fenol proporciona información útil ya que permite discriminar entre los defectos fermentativos y los no fermentativos.

Un análisis de agrupamiento (“cluster”) de las concentraciones de los 22 aceites comerciales (Figura 4.14) verifica matemáticamente que existen diferencias entre los aceites con y sin defectos, exceptuando el defecto helada. Estos aceites (EVOO y con defecto helada) aparecen separados del resto probablemente debido a su elevada concentración de fenoles totales (Figura 4.14A). Además, se llevó a cabo un PCA con la concentración de fenoles individuales del conjunto de muestras. La Figura 4.14B muestra el gráfico de PCA en el que el factor 1, con un 34,24% de la varianza explicada, permite la separación de las muestras de VOO y EVOO. Los EVOO se sitúan en el cuarto cuadrante, y se caracterizan por valores elevados de ácido vainílico (0,76 mg/kg), luteolina (0,33 mg/kg) y lignanos (1-acetoxipinorresinol y pinorresinol). Las muestras con defectos se sitúan en el primer y segundo cuadrante. Por otro lado, las muestras con defecto helada se sitúan en el cuarto cuadrante, muy cercanas a las muestras de EVOO, debido a que el contenido de fenoles no mostró diferencias significativas entre ambos tipos de aceites. Por otro lado, los aceites caracterizados con defecto atrojado-borras se sitúan muy próximas entre sí y cercanas a las muestras con defecto moho-humedad.

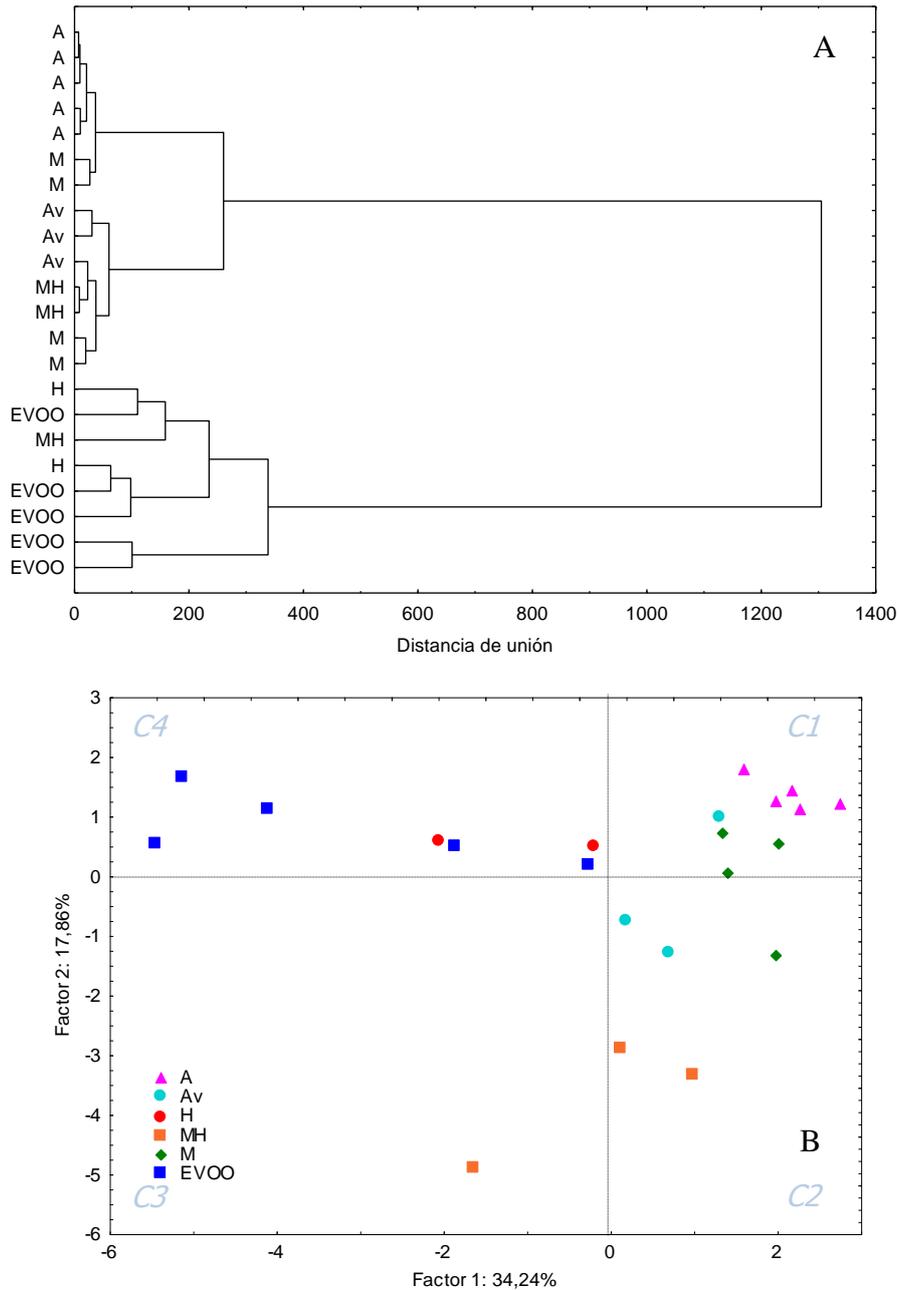


Figura 4.14. (A) Resultado de un análisis de agrupamiento arborescente de las concentraciones de los compuestos fenólicos de las 22 muestras comerciales analizadas. (B) Análisis de componentes principales de aceites de oliva extra vírgenes (EVOO) y aceites caracterizados con los defectos sensoriales helada (H), avinado-avinagrado (Av), moho-humedad-tierra mojada (M), madera-humedad (MH) y atrojado-borras (A).

El análisis de componentes principales (PCA) se llevó a cabo con la concentración de todos los compuestos fenólicos identificados en el aceite. No obstante, se ha estudiado la importancia de cada compuesto en los diferentes defectos. Para ello, se llevó a cabo un análisis de componentes principales con la concentración de los compuestos fenólicos que mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) de las muestras con defectos mostrados en la

Tabla 4.9. La Figura 4.15 muestra el gráfico de PCA en el que el factor 1, con un 76,54% de la varianza explicada.

Se observa en el PCA (Figura 4.15) una separación entre las muestras con defectos fermentativos (avinado-avinagrado, moho-humedad-tierra mojada y atrojado-borras) y no fermentativos (helada y madera-humedad). Existen diferencias significativas en las concentraciones de fenoles totales, o-difenoles, secoroidoides y lignanos de las muestras con ambas etiologías, lo que puede indicar que existen diferencias entre los perfiles fenólicos de las muestras según el origen del defecto. La muestra con el defecto avinado-avinagrado (F1) no se clasifica según su origen, lo que puede deberse a la presencia del defecto sensorial rancio, de origen oxidativo, como defecto secundario.

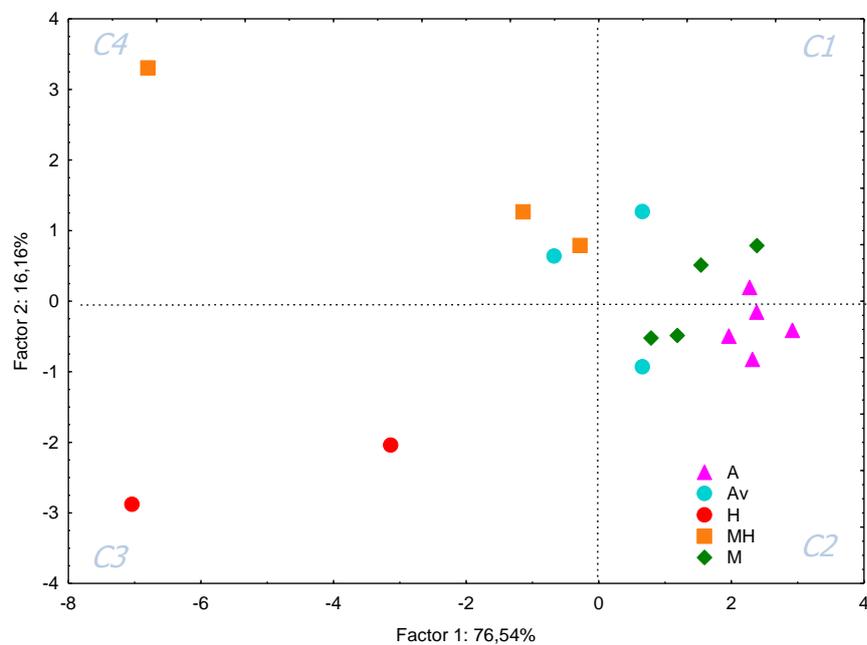


Figura 4.15. Análisis de componentes principales de las 22 muestras de aceites caracterizados con los defectos sensoriales helada (H), avinado-avinagrado (Av), moho-humedad-tierra mojada (M), madera-humedad (MH) y atrojado-borras (A) según la concentración de fenoles.

En resumen, el método para la determinación de los fenoles mostró una buena linealidad ($R_{aj}^2 > 0,990$) y valores bajos de RSD% en repetibilidad y en precisión intermedia (<10%), lo que indica un nivel adecuado de precisión. En general, las muestras caracterizadas con defectos mostraron un contenido de fenoles menor que los hallados en muestras EVOO, lo que conlleva a una menor calidad del aceite desde el punto de vista de su estabilidad y su implicación en la salud. Por otra parte, los aceites con defectos fermentativos (avinado-avinagrado, moho-humedad-tierra mojada y atrojado-borras) presentaron una concentración de fenoles totales inferior a los aceites con defectos no fermentativos (helada y madera-

humedad). Estos aceites mostraron un mayor contenido de hidroxitirosol, primer y segundo derivado de hidroxitirosol y pinorresinol ($p < 0,05$), así como, un elevado contenido de fenoles totales muy cercanos a los valores obtenidos en aceites de buena calidad. Hay que tener en cuenta que aún no se ha establecido ningún límite en la norma comercial (COI, 2015a) para la determinación de los compuestos fenólicos, por lo que en un futuro, a la hora de establecer el límite para la determinación de fenoles habría que considerar que las concentraciones de estos compuestos varían según el origen del defecto que presente el aceite de oliva.

4.3. Caracterización del defecto helada

- Morelló, J. R., Motilva, M. J., Ramo, T., Romero, M. P. (2003). Effect of freeze injuries in olive fruit on virgin olive oil composition. *Food Chemistry* 81, 547-553.
- Romero, M.P., Motilva, M.J. (2010). Effect of climatic conditions on quality of virgin olive oil. En: *Olives and Olive oil in Health and Disease Prevention*, pp. 43-50. V.R., Preedy y R.R. Watson (Editores). Elsevier, San Diego.
- Guillaume, C., Ravetti, L. Gwyn, S. (2010). Characterisation of phenolic compounds in oils produced from frosted olives. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87, 247-254.
- Vita-Serman, F., Babelis, G., Gallego, M.E., Kiessling, J., López, E., Sierra, E. (2014). A frost regime microclimatological study in southern Argentina (Añelo, Province of Neuquén). *Acta Horticulturae* 1057, 147-153.
- Steponkus, P.L, Dowgert, M.F., Gordon-Kamm, W.J. (1983). Destabilization of the Plasma membrane of isolated plant protoplasts during a freeze-thaw cycle: the influence of cold acclimation. *Criobiology* 20, 448-465.
- Wang L.J., Huang, W.D., Li, J.Y., Liu, Y.F., Shi, Y.L. (2004). Peroxidation of membrane lipid and Ca²⁺ homeostasis in grape mesophyll cells during the process of cross-adaptation to temperature stresses. *Plant Science* 167, 71-77.
- Yoshida, S., Sakai, A. (1968). The effect of thawing rate on freezing injury in plants. II. The change in the amount of ice in leaves as produced by the change in temperature. *Low Temperature Science Series Biological Sciences B* 26, 23-31.
- Levitt, J. (1980). *Responses of plants to environmental stress: chilling, freezing and high temperature stresses* (2nd Edition). Academic Press, New York.
- COI (2015b). Sensory analysis of olive oil. Method for the organoleptic assessment of virgin olive oil. COI/T. 20/Doc. n°15/Rev. 7. Madrid: Consejo Oleícola Internacional.
- Tsimidou, M. (2013). Analytical methodologies: phenolic compounds related to olive oil taste issues. En: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*, pp. 311-334. Aparicio R. y Harwood J. (Editores). 2° Edición, Springer, New York.

- Servili, M., Selvaggini, R., Esposito, S., Taticchi, A., Montedoro, G., Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspect of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A* 1054, 113-27.
- Caponio, F., Gomez, T., Pasqualone, A. (2001). Phenolic compounds in virgin olive oil: Influence of ripeness on organoleptic characteristics and self life. *European Food Research and Technology* 212, 329-333
- García-Rodríguez, R., Romero-Segura, C., Sanz, C., Sánchez-Ortiz, A., Pérez, A.G. (2011). Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Research International* 44, 629-635.
- Baccouri, O., Guerfel, 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.
- Gómez-Alonso, S., Mancebo-Campos, V., Desamparados Salvador M., Fregapane G. (2007). Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature. *Food Chemistry* 100, 36-42.
- Christie, P.J., Alfenito, M.R., Walbot, V. (1994). Impact of low temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194, 541-549.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. Stress-Induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7, 1085-1097.
- CE (2013). Reglamento nº1348/2013 de la Comisión que modifica el Reglamento (CEE) nº2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 338, 31-67.
- CE (2012). Reglamento nº432/2012 de la comisión por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 136/1-40.

- EFSA (2011). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage. Pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9(4), 2033. www.efsa.europa.eu/efsajournal.
- Wampler, B., Barringer, S.A. (2012). Volatile generation in bell peppers during frozen storage and thawing using selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). *Journal of Food Science* 77, C677-C683.
- Morales, M.T., Aparicio-Ruiz, R., Aparicio, R. (2013). Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Odor Issues. En: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*, pp. 261-311. Aparicio R. y Harwood J. (Editores). 2º Edición, Springer, New York.
- Morales, M.T., Alonso, M. V., Ríos, J.J., Aparicio, R. (1995). Virgin olive oil aroma: relationship between volatile compounds and sensory attributes by chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2925-2931.
- Aparicio, R., Morales, M.T., Alonso, M.V. (1996). Relationship between volatile compound and sensory attributes by statical sensory wheels-An application to virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73, 1253-1264.
- Zhuang, H., Hamilton-Kemp, T.R., Andersen, R.A., Hildebrand, D.F. (1992). Developmental change in C₆-Aldehyde formation by soybean leaves. *Plant Physiology* 100, 80-87.
- Vera, P., Uliaque, B., Canellas, E., Escudero, A., Nerína, C. (2012). Identification and quantification of odorous compounds from adhesives used in food packaging materials by headspace solid phase extraction and headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography-olfactometry-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 745,53-63.
- Márquez, V., Martínez, M., Guerra, M., Fariña, L., Boido, E., Dellacassa, E. (2013). Characterization of aroma-impact compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) using GC-olfactometry and GC-MS. *Food Research International* 53,808-815.

- García-González, D.L., Tena, N., Aparicio, R. (2010c). Quality characterization of the new virgin olive oil var. Sikitita by phenols and volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 12899-12905.
- Poerio, A., Bendini, A., Cerretani, L., Bonoli-Carbognin, M., Lercker, G. (2008). Effect of olive fruit freezing on oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110, 368-372.

4.4. Clorofila y derivados

La transformación que sufren las clorofilas durante la maduración de la aceituna, durante los procesos tecnológicos llevados a cabo para obtener el aceite o debido a los cambios químicos que se producen durante su almacenamiento, convierte a los derivados de la clorofila en marcadores de degradación del aceite (Gallardo-Guerrero *et al.*, 2005; Anniva *et al.*, 2006). Estas transformaciones ocurren, por ejemplo, durante los tratamientos térmicos que tienen lugar en la desodorización de aceites vegetales, en los que se ha demostrado la transformación de las clorofilas (Gandul-Rojas *et al.*, 1999; Serani y Piacenti, 2001). Algunos estudios han descrito que el contenido de pigmentos clorofílicos, especialmente de pirofeofitina *a*, podría ser un buen marcador de la degradación que se produce en el aceite durante la desodorización y, por tanto, de la posible adulteración de aceite de oliva virgen con aceites desodorizados (Serani y Piacenti, 2001; Aparicio-Ruiz *et al.*, 2012). En estos estudios, se comprobó también que la concentración de pirofeofitina *a* aumenta progresivamente a lo largo del tiempo de almacenamiento y que su cinética de formación depende de la temperatura (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2010). Por este motivo, este compuesto se ha propuesto como un marcador que permita establecer el grado de envejecimiento de los aceites y evitar que aceites no frescos, y posiblemente rancios, lleguen al mercado (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2014).

Actualmente, las normativas de algunos países han establecido la pirofeofitina *a* como marcador de calidad del aceite de oliva, y han fijado un límite para los EVOO (<17%) (AS, 2011; CDFA, 2014; DGE, 2012; SANS, 2013). No se ha especificado ningún límite para otras categorías de calidad diferentes a EVOO. Por otro lado, la norma comercial del COI (2015a) no ha establecido, hasta el momento, la determinación de este compuesto ni define ningún límite, ya que su uso para controlar la frescura de los aceites sigue siendo controvertido.

Aunque el contenido de pirofeofitina *a* se ha propuesto indistintamente como marcador de frescura y de calidad, estos dos conceptos son independientes (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2014), ya que un aceite fresco (recién obtenido) no necesariamente implica que sea de buena calidad. En este sentido, y con el fin de establecer un parámetro que permitan establecer la frescura del aceite, Aparicio-Ruiz *et al.* (2010) han desarrollado un modelo predictivo que permite conocer el contenido final de pirofeofitina *a*, y de este modo, establecer una fecha de consumo preferente según la temperatura ambiente durante el período de almacenamiento del aceite.

Con objeto de conocer si existe alguna relación entre el contenido de pirofeofitina *a* y la calidad sensorial del aceite, se han determinado las concentraciones de los pigmentos clorofílicos derivados de la clorofila (feofitina *a* y pirofeofitina *a*) aplicando el método descrito por Gertz y Fiebig (2006a) en muestras comerciales proporcionadas por diferentes productores (Tabla 3.1 y 3.2). La detección y cuantificación de los derivados clorofílicos se llevó a cabo mediante HPLC-DAD (véase §3.2.3.4). La Figura 4.32 muestra el cromatograma de los pigmentos clorofílicos identificados en un EVOO.

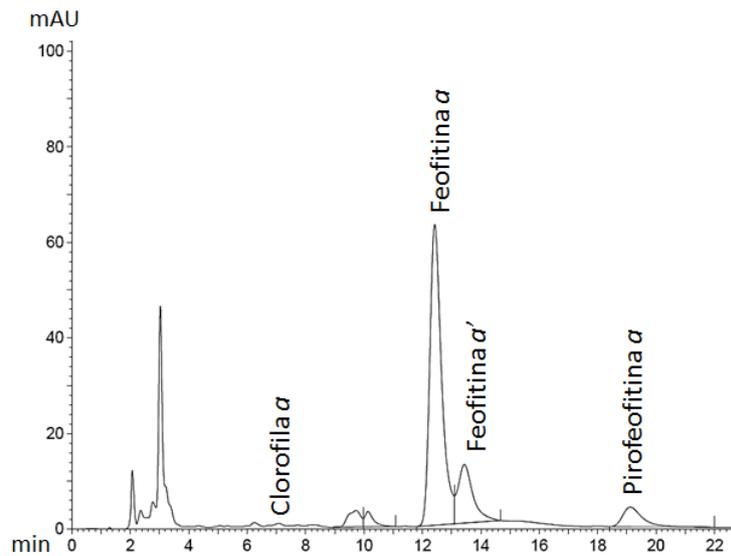


Figura 4.32. Cromatograma de pigmentos clorofílicos estudiados en las muestras de EVOO.

En una primera etapa, antes de proceder al análisis de las muestras comerciales, se estudiaron los parámetros de calidad analítica del método.

4.4.1. Validación del método

Se ha realizado el estudio de validación parcial del método para la determinación de clorofila *a* y feofitina *a*, incluyendo además la pirofeofitina *a*, que es el compuesto propuesto por algunas normas como marcador de calidad (AS, 2011; CDFA, 2014; DGE, 2012; SANS, 2013). Teniendo en cuenta que el método que se aplica para la determinación de estos pigmentos (Gertz y Fiebig, 2006a) utiliza los porcentajes de las áreas cromatográficas para establecer las cantidades, y con el fin de realizar la validación del método para su uso cuantitativo, se han realizado las rectas de calibrado con patrones de referencia, lo que permitió el estudio de la linealidad, sensibilidad, límites de detección y cuantificación e intervalo dinámico de trabajo.

4.4.1.1. Precisión

La muestra seleccionada para el estudio de precisión intralaboratorio del método fue un EVOO. Los estudios de repetibilidad se llevaron a cabo analizando la misma muestra 8 veces consecutivas. Por otra parte, la precisión intermedia (entre días) se estudió analizando la misma muestra durante 8 días no consecutivos (véase §4.1.1.3.4). La Tabla 4.19 muestra los valores de precisión RSD% obtenidos para cada compuesto identificado (clorofila *a*, feofitina *a* y pirofeofitina *a*).

Tabla 4.19. Repetibilidad y precisión intermedia del método.

Código	Compuesto	Repetibilidad (RSD%) ¹	Precisión intermedia (RSD%) ¹	Concentración (mg/kg)
1	Clorofila <i>a</i>	9,52	16,48	0,14
2	Feofitina <i>a</i>	3,85	7,54	0,24
3	Pirofeofitina <i>a</i>	5,52	9,56	2,88

Nota: ¹, desviación estándar relativa (RSD%).

Los valores de RSD% que se obtuvieron fueron menores del 10% en el caso de la repetibilidad. Estos resultados están de acuerdo con los encontrados en el estudio validación llevado a cabo por Gertz y Fiebig (2006a), en el que los valores mostrados para la pirofeofitina *a* fueron menores de 5,8%. De los 3 compuestos identificados, la clorofila *a* mostró el valor máximo de RSD% en repetibilidad (9,52%). Este compuesto, además, fue el que presentó una concentración inferior al resto (0,14 mg/kg). Por el contrario, el valor mínimo de RSD% correspondió a la feofitina *a*. Los valores aumentaron en todos los casos al estudiar la precisión intermedia.

4.4.1.2. Linealidad y sensibilidad

Se ha estudiado la linealidad de la respuesta (véase §4.1.1.3.1) del método para los 2 compuestos usados en la calibración, clorofila *a* y feofitina *a*. Como se explicó en la Sección de Materiales y Métodos (§3.2.3.4), la feofitina *a* y pirofeofitina *a* presentan el mismo espectro de absorción y el mismo factor de respuesta, lo que permite su cuantificación con la misma recta de calibrado, en este caso, realizada con feofitina *a* (Aparicio-Ruiz, 2008).

Se han realizado las rectas de calibrado de la clorofila *a* y feofitina *a*, se han analizado los coeficientes de correlación (R^2_{aj}) y las rectas de calibrado obtenidas para el intervalo de concentraciones estudiado (0,10-18,00 mg/kg). Este rango de concentración corresponde a los valores habitualmente determinados en VOO (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2010). El método presentó

respuesta lineal en todo el intervalo de concentraciones ($R^2_{aj}=0,98-0,99$). Además, las desviaciones estándar relativas (RSD_b) de ambas regresiones mostraron una linealidad aceptable para los dos compuestos, inferior al 5% (Tabla 4.20). En el análisis de residuales de la regresión no se observaron gráficos que mostraran un comportamiento no lineal.

La sensibilidad del método, se determinó como la pendiente de la recta de calibrado dentro del rango lineal de comportamiento del parámetro (Tabla 4.20). La feofitina *a* mostró un valor superior al de clorofila *a* ($7,71 \times 10^5$ y $3,69 \times 10^5$, respectivamente).

Tabla 4.20. Resumen de los valores de linealidad y sensibilidad del método.

Compuesto	λ^1	$R^2_{aj}^2$	RSD_b^3	Recta de calibrado	LOD ⁴	LOQ ⁴	Sensibilidad ($\times 10^5$)	W_R^5
Clorofila <i>a</i>	428	0,999	2,85	$Y = 9,46 \cdot 10^4 + 3,69 \cdot 10^5 X$	0,50	1,67	3,69	1,67-18,00
Feofitina <i>a</i>	410	0,985	4,67	$Y = -4,62 \cdot 10^5 + 7,71 \cdot 10^5 X$	0,92	3,01	7,71	3,01-18,00

Nota: ¹, nm; ², coeficiente de regresión ajustada; ³, desviación estándar relativa de la regresión; ⁴, límites de detección y cuantificación (mg/kg); ⁵, intervalo dinámico de trabajo (mg/kg).

4.4.1.3. Límites de detección y de cuantificación

Los LOD y LOQ se determinaron a partir de los datos obtenidos de las rectas de calibrado (véase §4.1.1.3.2). La Tabla 4.20 muestra los resultados obtenidos para los dos pigmentos clorofílicos estudiados. Se puede observar que el LOD de la clorofila *a* (0,50 mg/kg) es inferior al determinado para la feofitina *a* (0,92 mg/kg). El método ofrece una respuesta adecuada a niveles bajos de concentración, por lo que es útil para llevar a cabo el análisis de pigmentos con VOO que, a veces, pueden mostrar concentraciones a nivel de trazas (Aparicio *et al.*, 2008).

4.4.1.4. Intervalo dinámico de trabajo

El intervalo dinámico de trabajo se ha establecido con el valor mínimo de LOQ y la concentración más alta estudiada que mostró buena linealidad (Boqué *et al.*, 2002). La Tabla 4.20 muestra los intervalos obtenidos para los dos compuestos evaluados. La clorofila *a* y feofitina *a* mostraron linealidad ($R^2_{aj} \geq 0,990$) dentro del intervalo de concentraciones estudiado.

4.4.2. Pigmentos clorofílicos en el aceite de oliva virgen

Se han analizado las 38 muestras comerciales proporcionadas por diferentes productores descritas en las Tablas 3.1 y 3.2. El objetivo era comprobar si existían diferencias

en el contenido de pirofeofitina *a* entre aceites con defectos sensoriales y aceites sin defectos, y evaluar su capacidad como marcador para el control de la calidad de los aceites. El Anexo I (Tabla 4) muestra una tabla con el porcentaje de pirofeofitina *a* para las 38 muestras comerciales analizadas.

La Tabla 4.21 muestra el contenido medio (en porcentaje de área) de los aceites comerciales con y sin defectos; los aceites están agrupados de acuerdo con los defectos atrojado-borras, avinado-avinagrado, moho-humedad-tierra mojada, helada y madera humedad.

Tabla 4.21. Concentración (media \pm desviación estándar) (mg/kg) de clorofila *a*, feofitina *a* y pirofeofitina *a*, y el porcentaje en área de pirofeofitina *a* en las muestras comerciales con defectos sensoriales.

n	Defecto sensorial	Pirofeofitina <i>a</i> (%) ¹	Clorofila <i>a</i> (mg/kg)	Feofitina <i>a</i> (mg/kg)	Pirofeofitina <i>a</i> (mg/kg)
5	Atrojado-borras	6,40 \pm 1,56	0,36 \pm 0,21	10,33 \pm 8,94	0,90 \pm 0,75
6	Avinado-avinagrado	5,01 \pm 1,45	0,13 \pm 0,08	3,96 \pm 3,36	0,39 \pm 0,14
15	Moho-humedad	7,43 \pm 4,88	0,21 \pm 0,19	5,53 \pm 5,08	0,61 \pm 0,45
3	Helada	5,16 \pm 0,44	0,17 \pm 0,21	18,55 \pm 8,27*	1,16 \pm 0,40
3	Madera-humedad	4,30 \pm 1,39	0,09 \pm 0,06	15,78 \pm 5,08*	0,86 \pm 0,16
6	EVOO (sin defectos)	5,66 \pm 1,99	0,11 \pm 0,06	7,95 \pm 4,74	0,75 \pm 0,55

Nota: ¹, cálculo según el método propuesto por Gertz y Fiebig (2006a); *, $p < 0,05$.

Atendiendo al valor máximo permitido para la categoría EVOO que ha sido establecido en algunas normas -17%-, es destacable que todas las muestras menos una (código F30; Anexo I) mostraron valores de pirofeofitina *a* inferiores a este límite. Todas estas muestras serían en base a este criterio, clasificadas como EVOO. Este resultado demuestra que el parámetro posee una capacidad limitada, por sí mismo, en la determinación de la calidad, ya que estos aceites presentan defectos sensoriales claramente identificables, tanto sensorialmente, como mediante algunos de los compuestos previamente evaluados (compuestos volátiles y fenólicos). El contenido medio de pirofeofitina *a* es del mismo orden (~6%) para los diferentes defectos sensoriales (Tabla 4.21) y no mostró diferencias significativas entre ellos ($p < 0,05$).

Si se compara la información proporcionada por el panel de cata (Tablas 3.1 y 3.2) y el porcentaje de pirofeofitina *a* (Anexo I, Tabla 4) de las 38 muestras analizadas, es destacable que sólo el 18% del total de las muestras presentaron un contenido de pirofeofitina *a* que está de acuerdo con la categoría (EVOO, VOO, OVOO, LVOO) asignada por el panel de cata. Es decir, existe un 82% de desacuerdo entre la información proporcionada por el panel de cata y

el contenido de pirofeofitina *a*. Este desacuerdo puede deberse a que el contenido de pirofeofitina *a* está más relacionado con la frescura del aceite que con la calidad en sí. En términos generales, suele existir una confusión entre los conceptos de calidad y frescura del aceite. De hecho, aquellas normas que especifican un contenido máximo de este compuesto lo hacen describiendo el contenido de pirofeofitina *a* como un parámetro de calidad. Los conceptos de calidad y frescura son independientes (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2014). En ocasiones aceites no frescos pero obtenidos de aceitunas sanas tienen mejor calidad sensorial que aceites frescos pero obtenidos de aceitunas dañadas (por ejemplo, molestadas, macadas, infectadas). Las 38 muestras analizadas se encontrarían en este segundo apartado, lo que explicaría su bajo contenido en pirofeofitina *a* (muy alejado del máximo propuesto por diferentes normativas del 17%) aun siendo aceites de baja calidad.

Para profundizar en la relación de los pigmentos clorofílicos con la calidad de aceites de oliva vírgenes, se llevó a cabo la identificación de otros pigmentos clorofílicos, además de la pirofeofitina *a*. Estos pigmentos fueron la clorofila *a* y la feofitina *a*. En este caso, a diferencia del método descrito por Gertz y Fiebig (2006a), la cuantificación se realizó calculando la concentración en mg/kg para evitar cualquier cambio aparente asociado a los valores relativos de porcentaje. La Tabla 4.21 también muestra estas concentraciones en mg/kg.

En general, la concentración de feofitina *a* (3,96-15,78 mg/kg) fue superior a la de pirofeofitina *a* (0,37-0,81 mg/kg) en las muestras comerciales estudiadas. Esto se debe a la feofitización (conversión de clorofila a feofitina) que ocurre normalmente durante el batido y centrifugación del aceite, y que está favorecida por el efecto catalizador de los ácidos producidos por la ruptura de los tejidos del fruto (Mínguez-Mosquera *et al.*, 1990; 1992).

Por otro lado, es destacable el mayor contenido de feofitina *a* en los aceites con los defectos helada y madera-humedad, de las variedades Cornicabra y Picual (Anexo I, Tabla 4), frente a los aceites caracterizados con el resto de defectos; existiendo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los aceites con defectos fermentativos y no fermentativos. Existen estudios que argumentan que según la actividad de la enzima clorofilasa, dependiente de la variedad de la aceituna, varía la pigmentación del aceite (Roca y Mínguez-Mosquera, 2003). Por este motivo, variedades como Hojiblanca, Picual y Cornicabra, que presentan una actividad baja de esta enzima, mostraron una mayor pigmentación, obteniéndose una concentración media de feofitina *a* en estas variedades de 10,90 mg/kg, 7,12 mg/kg y 12,35

mg/kg, respectivamente. Por otro lado, otras variedades como Arbequina poseen una actividad mayor de la enzima, lo que explicaría la menor concentración media de feofitina *a* determinada en estos aceites (4,4 mg/kg).

Respecto al contenido de clorofila *a* en las muestras estudiadas, éste fue menor (~0,20 mg/kg) al resto de pigmentos. Esto se debe a que sólo el 20% de la clorofila presente en la aceituna se transfiere al aceite y a la reacción de feofitinización producida tanto en la aceituna como en el aceite extraído (Gallardo-Guerrero *et al.*, 2002). En este caso, los aceites con defectos helada y madera-humedad mostraron las concentraciones más bajas para este pigmento (0,05 mg/kg y 0,09 mg/kg, respectivamente). Como explican Rodríguez-Saona *et al.* (1995), el proceso de helada está relacionado con la degradación de los pigmentos, lo que podría indicar el bajo contenido de clorofila *a* en estos aceites.

La Figura 4.33 muestra las concentraciones de clorofila *a* (A), feofitina *a* (B) y pirofeofitina *a* (C) de los 38 aceites estudiados. Se observa que las muestras con defecto avinado-avinagrado son los aceites que mostraron menor contenido de feofitina *a* y pirofeofitina *a* (Tabla 4.21). Los aceites con defecto moho-humedad-tierra mojada presentaron concentraciones inferiores de los tres pigmentos respecto al resto de defectos, (Anexo I, Tabla 4). En cuanto a los aceites con defecto atrojado-borras, la muestra F10 mostró el contenido más elevado de clorofila *a* (1,02 mg/kg) (Figura 4.33A) y pirofeofitina *a* (2,22 mg/kg) de todos los aceites determinados (Figura 4.33C). Sin embargo, el resto de muestras analizadas con este defecto presentaron niveles inferiores. Los aceites con el defecto madera-humedad y helada mostraron un contenido superior al resto de defectos de feofitina *a*. En general, los aceites con defectos fermentativos (avinado-avinagrado, moho-humedad-tierra mojada y atrojado) presentaron concentraciones inferiores de clorofila *a*, feofitina *a* y pirofeofitina *a* que los aceites con defectos no fermentativos (helada y madera-humedad), exceptuando las muestras F31, F32 y F35 (defecto moho-humedad-tierra mojada) y la muestra F10 (defecto atrojado-borras) (Tabla 4.21). En cuanto a los EVOO, la muestra F21 mostró un contenido superior de los tres pigmentos al resto de las muestras de EVOO.

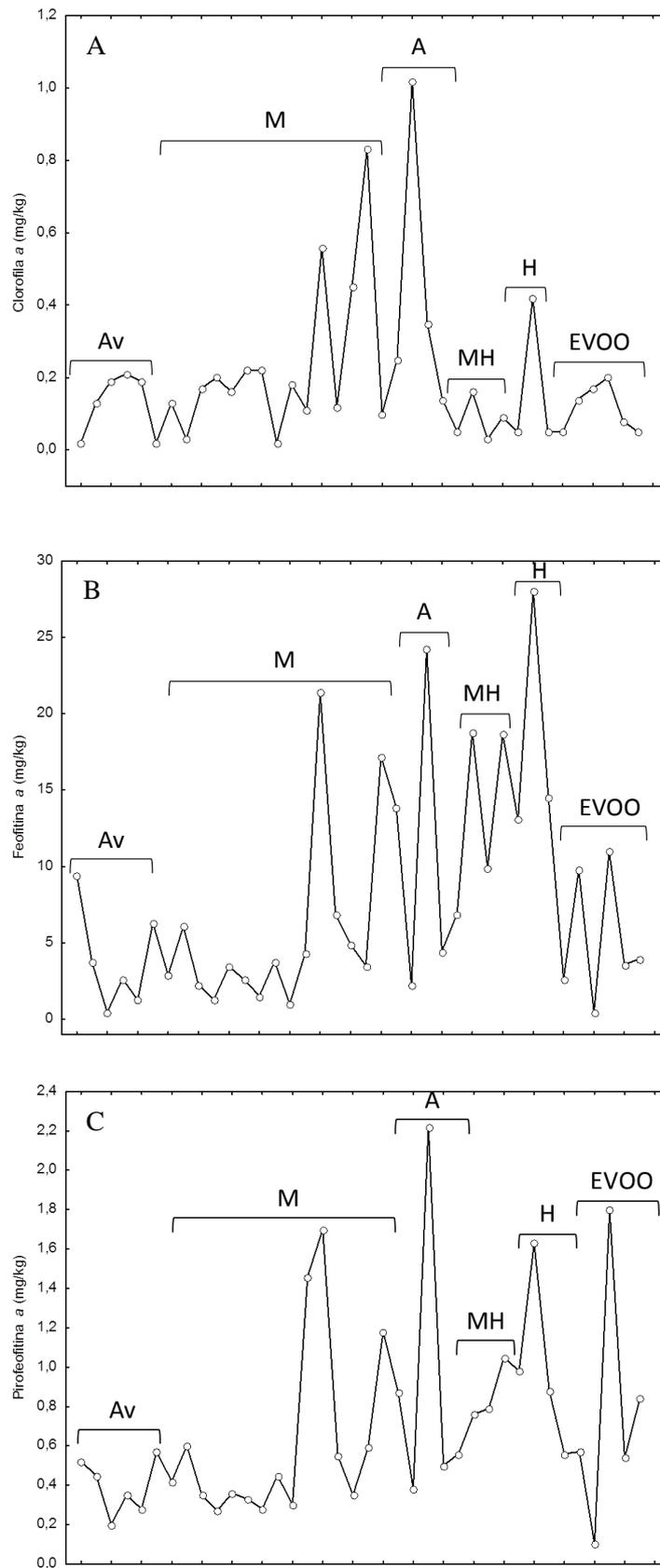


Figura 4.33. Representación de la concentración de clorofila *a* (A), feofitina *a* (B) y pirofeofitina *a* (C) de aceites caracterizados con los defectos sensoriales helada (H), avinado-avinagrado (Av), moho-humedad-tierra mojada (M), madera-humedad (MH) y atrojado-borras (A) y sin defectos (EVOO).

Para comprobar si existe relación entre el contenido de pirofeofitina *a*, la frescura del aceite y las condiciones de almacenamiento, se llevó a cabo el análisis de 6 aceites que su categoría inicial era EVOO, almacenados con y sin refrigeración durante 4 años. Estos aceites se almacenaron, bajo condiciones controladas, en botellas de cristal de color topacio, 3 estuvieron refrigerados a 4 °C y otros 3 a temperatura ambiente (~25°C). La Tabla 4.22 muestra las concentraciones medias (mg/kg) de clorofila *a*, feofitina *a* y pirofeofitina *a*, y el contenido de pirofeofitina *a* en porcentaje de área de estos aceites.

Tabla 4.22. Concentraciones (media \pm desviación estándar¹) (mg/kg) de clorofila *a*, feofitina *a* y pirofeofitina *a*, y porcentaje de área de pirofeofitina *a* de las muestras de EVOO después de ser almacenadas durante cuatro años.

Código muestra	Condiciones almacenamiento	Pirofeofitina <i>a</i> (%) ²	Clorofila <i>a</i> (mg/kg)	Feofitina <i>a</i> (mg/kg)	Pirofeofitina <i>a</i> (mg/kg)
A1	25°C	60,35 \pm 1,56*	0,17 \pm 0,005	1,40 \pm 0,40	2,01 \pm 0,33*
A2	25°C	31,12 \pm 2,35*	0,20 \pm 0,01	1,80 \pm 0,58	1,93 \pm 0,50*
A3	25°C	51,30 \pm 4,58*	0,08 \pm 0,02	3,84 \pm 0,87	4,03 \pm 0,78*
A4	4°C	8,08 \pm 0,65*	0,05 \pm 0,01	7,00 \pm 1,22	0,80 \pm 0,10*
A5	4°C	1,31 \pm 0,35*	0,14 \pm 0,01	2,89 \pm 0,35	0,23 \pm 0,05*
A6	4°C	6,70 \pm 0,89*	0,10 \pm 0,01	4,70 \pm 0,17	0,52 \pm 0,11*

Nota: ¹, desviación estándar de repetibilidad (duplicado de la muestra); ², cálculo según el método propuesto por Gertz y Fiebig (2006a); *, $p < 0,05$.

Destaca el elevado porcentaje de área de pirofeofitinas *a* en los aceites almacenados a temperatura ambiente, que fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$) de los valores determinados en los aceites refrigerados, lo que demuestra el efecto de la temperatura en la cinética de conversión de feofitina *a* a pirofeofitina *a* (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2010). Por otro lado, las concentraciones expresada en valor absoluto (mg/kg) de pirofeofitina *a* también mostraron diferencias significativas entre las condiciones de almacenamiento.

En este estudio se ha observado una linealidad y precisión aceptable del método para la cuantificación de los pigmentos clorofílicos, con valores bajos de RSD% (<10%) en repetibilidad. Por otro lado, se ha comprobado que existe poca relación entre el porcentaje en área de pirofeofitina *a* y la calidad sensorial del aceite. Esto se debe, parcialmente, a que este parámetro está afectado por otros factores ajenos a la calidad (frescura del aceite y temperatura del almacenamiento), lo que dificulta la interpretación de este compuesto desde un punto de vista sensorial. Por otra parte, se observó una influencia varietal en el contenido de feofitina *a*, por ejemplo, cuando se comparan concentraciones de aceites var. Arbequina y Cornicabra (Tabla 4.22), lo que corrobora el estudio realizado por Roca y Mínguez-Mosquera, 2003. Asimismo, se observó que aquellos aceites obtenidos de aceitunas heladas poseían una menor concentración de clorofila *a*. Por tanto, en términos generales, los

pigmentos clorofílicos, y en particular la pirofeofitina *a*, ofrecen una información limitada sobre la calidad. No obstante, la pirofeofitina *a* podría considerarse como indicador de la frescura del aceite y proporciona información útil sobre las condiciones de almacenamiento. Teniendo en cuenta que la temperatura afecta a la cinética de formación de la pirofeofitina *a* (Tabla 4.22), este compuesto sería de utilidad para conocer el tiempo transcurrido desde la obtención del aceite o para conocer anomalías en la temperatura durante su conservación y almacenamiento. La interpretación de este parámetro en términos de cómo ha sido la conservación del aceite y qué fecha de consumo preferente tendría, se facilita si además se conoce el contenido de pirofeofitina *a* del aceite inicial tras su obtención (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2014). Ello permitiría comparar el contenido de pirofeofitina *a* inicial (t_0) con el valor determinado a cualquier tiempo (t), y contrastar esta diferencia con el valor esperado según el modelo cinético de formación de las pirofeofitinas (Aparicio-Ruiz *et al.*, 2010). Si el contenido de pirofeofitina *a* en un tiempo determinado (t) es superior al esperado según el modelo cinético, ello significaría que el almacenamiento del aceite no ha sido el adecuado.

4.5. Ésteres alquílicos

- Pérez-Camino, M.C., Cert, A., Romero-Segura, A., Cert-Trujillo, R., Moreda, W. (2008). Alkyl esters of fatty acids a useful tool to detect soft deodorized olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6740-6744.
- Jabeur, H., Zribi, A., Abdelhedi, R., Bouaziz, M. (2015). Effect of olive storage conditions on Chemlali olive oil quality and the effective role of fatty acids alkyl esters in checking olive oils authenticity. *Food Chemistry* 169, 289-296.
- COI (2012). Method of analysis: Determination of the content of waxes, fatty acid methyl esters and fatty acid ethyl esters by capillary gas chromatography using 3 grams of silica. COI/T. 20/Doc n°3. Madrid: International Olive Council.
- COI (2013a). Trade Standard applying to olive oils and olive-pomace oils. COI/T. 15/Doc n°3/Rev. 7. Madrid: Consejo Oleícola Internacional.
- COI (2015a). Trade Standard applying to olive oils and olive-pomace oils. COI/T. 15/Doc n°3/Rev. 8. Madrid: Consejo Oleícola Internacional.
- Gómez-Coca, R.B., Moreda, W., Pérez-Camino, M.C. (2012). Fatty acid alkyl esters presence in olive oil vs. organoleptic assessment. *Food Chemistry* 135, 1205-1209.
- Biedermann, M, Bongartz, A., Mariani, C., Grob, K. (2008a). Fatty acid methyl and ethyl esters as well as wax esters for evaluating the quality of olive oils. *European Food Research and Technology* 228, 65-74.
- Angerosa, F., Lanza, B., Marsilio, V. (1996). Biogenesis of “fusty” defect in virgin olive oils. *Grasas y Aceites* 47, 142-150.
- Springett, M. B. (1993). Formation of off-flavours due to microbiological and enzymic action. En: *Food Taints and Off-flavours*, pp. 244-255. Saxby, M.J. (Editor). Blackie Academic & Professional, London.
- Beltrán, G., Cuadros, L. (2015). Contenido de los ésteres alquílicos durante la maduración y evolución durante el almacenamiento. XVII Simposium científico-técnico. Expoliva.
- Morales, M.T., Luna, G., Aparicio, R. (2005). Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chemistry* 91, 293-301.

- Di Giacinto, L., Di Loreto, G., Di Serio, G., Giansante, L., Faberi, A., Marianella, R.M., Ricchetti, L., Perri, E., Serraiocco, A., Vito, R. (2014). Monitoraggio degli alchil esteri (AE) nell'olio extra vergine di oliva (MONITORALCHIL). Risultati dell'attività sperimentale 2012-2014. *CRA-OLI, Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia*.
- Morales, M.T., Aparicio-Ruiz, R., Aparicio, R. (2013). Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Odor Issues. En: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*, pp. 261-311. Aparicio R. y Harwood J. (Editores). 2° Edición, Springer, New York.
- Romero, I., García-González, D.L., Aparicio-Ruiz, R., Morales, M.T. (2015). Validation of SPME-GCMS method for the analysis of virgin olive oil volatiles responsible for sensory defect. *Talanta* 134, 394-401.

4.6. Diacilgliceroles

Los diacilgliceroles (DAG) pueden encontrarse en el aceite de oliva virgen en sus dos formas isoméricas: 1,2-DAG y 1,3-DAG. Cuando los aceites se obtienen de aceitunas sanas, el contenido de 1,2-DAG es más elevado que el de 1,3-DAG, por el contrario, en aceites lampantes la concentración de 1,3-DAG es superior a la de 1,2-DAG (Pérez-Camino *et al.*, 2001; Caponio *et al.*, 2013); motivo por el cual estos isómeros se han venido considerando como indicadores de la calidad de las aceitunas (Pérez-Camino *et al.*, 2001). En las últimas décadas también se ha estudiado su utilidad en la detección de aceites desodorizados y en la determinación de la frescura del aceite (Pérez-Camino *et al.*, 2001; Fronimaki *et al.*, 2002; Caponio *et al.*, 2013), porque tanto durante la desodorización como durante el almacenamiento la razón 1,3/1,2-DAG aumenta. Algunos autores (Pérez-Camino *et al.*, 200) han sugerido que la razón entre estos isómeros puede ser un marcador para la evaluación del grado de envejecimiento de un EVOO debido al proceso de isomerización de 1,2-DAG a 1,3-DAG que puede producirse durante el almacenamiento. Sin embargo, del mismo modo que ocurre con las pirofeofitinas, existe controversia sobre el papel que pueden tener estos compuestos en relación con la calidad y frescura del aceite, ya que la formación de los isómeros 1,3 puede ocurrir también mediante una hidrólisis enzimática o química de triacilgliceroles que, en ese caso, se produce antes o durante el proceso de extracción del aceite.

Actualmente existen diferentes normativas que han establecido a los 1,2-DAG, producidos por la biosíntesis incompleta de los triglicéridos, como marcadores de calidad del aceite de oliva y han fijado un porcentaje igual o superior al 35% para clasificar los aceites como EVOO (AS, 2011; CDFA, 2014; SANS, 2013). De este modo, el gobierno alemán, basándose en el método propuesto por Gertz y Fiebig (2006b), ha establecido un valor igual o superior al 40% para un EVOO (DGE, 2012). Por otro lado, el COI (2013b), que tiene un método oficial para la determinación de DAG, no ha indicado hasta el momento ningún límite para estos compuestos en las categorías de aceites de oliva vírgenes.

En este estudio se ha determinado el contenido de los isómeros 1,2-DAG y 1,3-DAG (Tabla 4.34) en una serie de muestras comerciales proporcionadas por diferentes productores (Tabla 3.1 y 3.2). Se ha aplicado un método basado en el descrito por Pérez-Camino *et al.* (1996) que realiza la cuantificación mediante GC-FID utilizando 1,3-dipalmitina como patrón interno (véase §3.2.5.4). La Figura 4.41 muestra el cromatograma de los 1,2 y 1,3-DAG

identificados en una muestra de EVOO y, como puede observarse, los DAG están formados por los ácidos grasos mayoritarios en el aceite de oliva, oleico y palmítico (León-Camacho *et al.*, 2013; COI, 2013b).

Tabla 4.34. Diacilgliceroles identificados en muestras de aceite de oliva virgen.

Código	Compuesto
Patrón interno (IS)	1,3-Dipalmitina
1,2-OP	1,2-Oleoil-palmitoil-glicerol
1,3-OP	1,3-Oleoil-palmitoil-glicerol
1,2-OO	1,2-Dioleoil-glicerol
1,3-OO	1,3-Dioleoil-glicerol

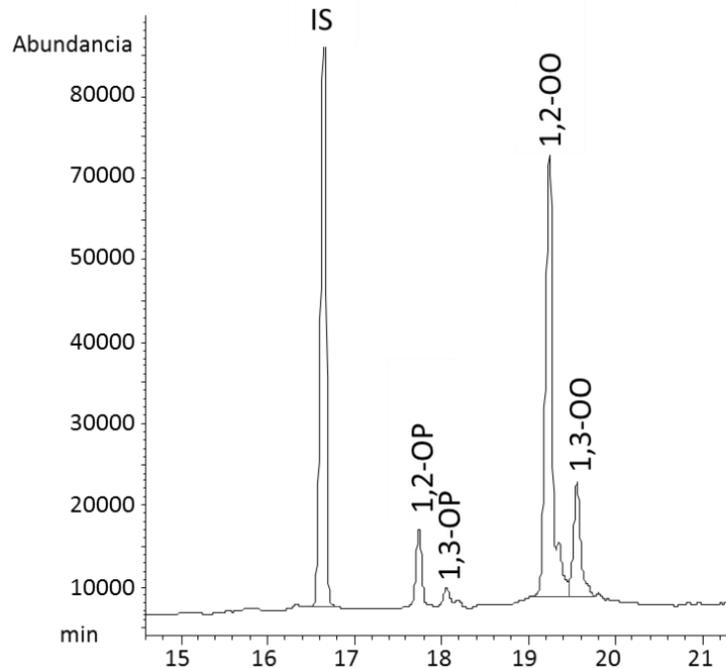


Figura 4.41. Cromatograma de los isómeros de diacilgliceroles identificados en una muestra de EVOO. Nota: IS, patrón interno; O: oleico; P: palmítico. Los códigos se muestran en la Tabla 4.34.

4.6.1. Validación del método

Se ha llevado a cabo una validación parcial del método mediante la que se ha evaluado la precisión tanto en términos de repetibilidad como de precisión intermedia, considerando la variabilidad entre días. Para ello se seleccionó una muestra de EVOO (F20, Tabla 3.1), que para el estudio de repetibilidad se analizó 8 veces consecutivas en el mismo día, y para el estudio de precisión intermedia se analizó durante 8 días no consecutivos (véase §4.1.1.3.4). La Tabla 4.35 muestra los valores obtenidos en cada caso, que vienen expresados como

desviación estándar relativa (RSD%) para cada compuesto identificado y del contenido (%) de los sumatorios de ambos isómeros (1,2-DAG y 1,3-DAG).

Tabla 4.35. Repetibilidad y precisión intermedia del método.

Código	Repetibilidad (RSD%) ¹	Precisión intermedia (RSD%) ¹	Concentración (%)
1,2-OP	10,64	11,69	13,77
1,3-OP	7,35	10,30	4,01
1,2-OO	7,56	11,96	59,93
1,3-OO	10,23	11,34	22,29
Σ1,2-DAG	6,40	6,90	73,70
Σ1,3-DAG	8,05	11,56	26,30

Nota; desviación estándar relativa (RSD%); los códigos se muestran en la Tabla 4.43.

En el estudio de repetibilidad se determinaron valores de RSD% inferiores o cercanos al 10% (Tabla 4.35). En cuanto a los compuestos individuales, 1,2-oleoil-palmitoil-glicerol (1,2-OP) mostró el valor máximo de RSD% en repetibilidad (10,64%). Por el contrario, el valor mínimo correspondió a 1,3-oleoil-palmitoil-glicerol (1,3-OP; 7,35%). Los valores de RSD% de los sumatorios 1,2-DAG y 1,3-DAG fueron menores al 10% (6,40% y 8,05% respectivamente).

En el estudio de precisión intermedia, destacan los valores de RSD% para los compuestos individuales que fueron superiores al 10%. En cuanto a los sumatorios, 1,2 y 1,3-DAG mostraron RSD% de 6,90% y 11,56% respectivamente, volviendo a ser superiores los valores para 1,3-DAG.

Los valores de RSD% obtenidos en ambos estudios indican que el método tiene buena precisión para la determinación de estos compuestos. Además, las normas establecidas hasta el momento (AS, 2011; DGE, 2012; CDFA, 2014; SANS, 2013) especifican la determinación exclusivamente del sumatorio de los 1,2-DAG como marcador de calidad del aceite, este sumatorio mostró valores adecuados (RSD<10%) tanto en repetibilidad como en precisión intermedia.

4.6.2. Diacilgliceroles en el aceite de oliva virgen

El Anexo I (Tabla 6) muestra los porcentajes de los sumatorios de 1,2-DAG y 1,3-DAG, el contenido total de diacilgliceroles y la razón entre los sumatorios de 1,3 y 1,2-DAG para los 38 aceites comerciales analizados. La Tabla 4.36 muestra los valores medios de los EVOO (sin defectos), LVOO, OVOO y VOO agrupados según los diferentes defectos

sensoriales (atrojado-borras, avinado-avinagrado, moho-humedad-tierra mojada, helada, madera humedad).

Tabla 4.36. Porcentaje de área (media \pm desviación estándar) de 1,2 y 1,3-DAG, porcentaje total de diacilglicerol (peso/peso) (media \pm desviación estándar), y la razón $\Sigma 1,3/\Sigma 1,2$ en las muestras comerciales.

n	Defecto sensorial	1,2-DAG%	1,3-DAG%	DAG ¹	$\Sigma 1,3/\Sigma 1,2$
5	Atrojado-borras	47,37 \pm 16,45	54,80 \pm 14,10	6,31 \pm 2,86	1,36 \pm 0,77
6	Avinado-avinagrado	40,03 \pm 11,04	59,97 \pm 11,04	7,44 \pm 1,78	1,66 \pm 0,73
15	Moho-humedad	42,04 \pm 10,60	57,97 \pm 10,58	7,09 \pm 4,54	1,52 \pm 0,61
3	Helada	54,03 \pm 6,66	45,97 \pm 6,64	5,54 \pm 0,40	0,87 \pm 0,23
3	Madera-humedad	55,20 \pm 8,97	44,80 \pm 8,97	4,78 \pm 0,02	0,84 \pm 0,28
6	EVOO (sin defectos)	68,55 \pm 12,38*	30,47 \pm 13,58*	2,93 \pm 0,88*	0,40 \pm 0,18*

Nota: ¹, contenido de diacilglicerol 1,2-DAG + 1,3-DAG; *, $p < 0,05$.

Como se ha descrito anteriormente, diferentes normativas (AS, 2011; CDFA, 2014; SANS, 2013) establecen un contenido legal de 1,2-DAG $\geq 35\%$ para poder clasificar el aceite como EVOO. Atendiendo a este valor, y teniendo en cuenta sólo las muestras con defectos, el 25% de los aceites mostraron valores inferiores a este límite ($\geq 35\%$), lo que impediría su clasificación como EVOO. Por otro lado, el 75% de las muestras con diferentes defectos sensoriales presentaron un contenido de 1,2-DAG de un EVOO, de acuerdo con las normativas citadas, a pesar de que algunos aceites tenían medianas de defectos incluso superiores a 5 (Tabla 4.4). La Figura 4.42 muestra un diagrama de barras de las 38 muestras comerciales analizadas.

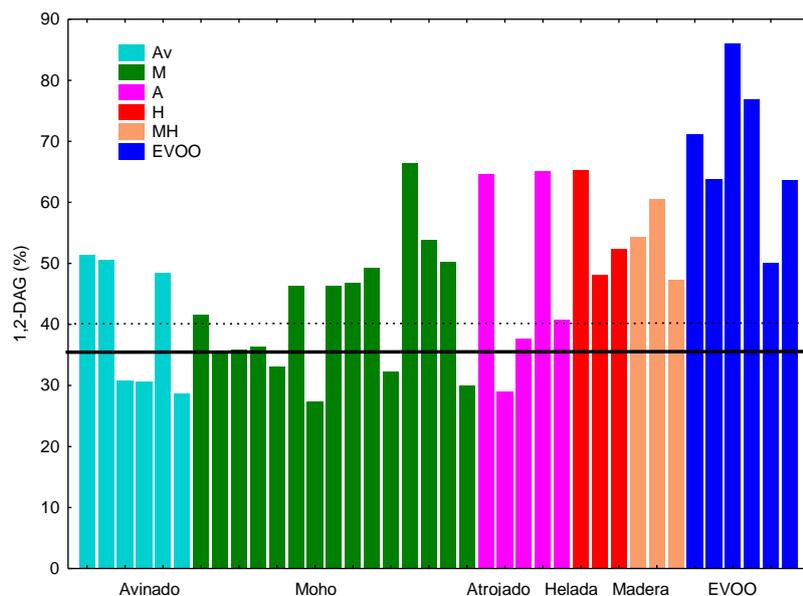


Figura 4.42. Diagrama de barras de 1,2-DAG (%) de las 38 muestras comerciales analizadas. La línea discontinua corresponde al contenido máximo de 1,2-DAG según la normativa DGE (2012) y la continua al contenido máximo según las normativas AS (2011), CDFA (2014) y SANS (2013).

Como puede observarse, atendiendo al límite establecido por las diferentes normativas (AS, 2011; CDFA, 2014; SANS, 2013), sólo 8 muestras presentaron valores inferiores al 35%. Estas muestras poseían defectos con orígenes fermentativos. La muestra F28 con el defecto sensorial moho-humedad-tierra mojada fue la que mostró un menor contenido de 1,2-DAG (27,27 mg/kg), y además, fue el aceite que presentó la mediana de defectos mayor cuando fue evaluada por panel de cata (6,7; Tabla 3.2).

Si se considera el límite fijado por el gobierno alemán para un EVOO ($\geq 40\%$) (DGE, 2012) (Figura 4.42), el 59% de las muestras con defectos sensoriales tienen contenidos de 1,2-DAG que corresponden a EVOO, hecho que corrobora que este marcador puede resultar ineficaz para determinar la calidad sensorial de las categorías del aceite de oliva virgen.

En el caso de los aceites con defectos fermentativos, mostraron un contenido menor de 1,2-DAG, y por tanto, un contenido mayor de 1,3-DAG (Tabla 4.36), en comparación a los determinados en EVOO. Esta diferencia con respecto a los EVOO no se observó en los aceites con defectos no fermentativos. Estos resultados indican que en el proceso de fermentación de la aceituna los triglicéridos han sido hidrolizados de 1,2-DAG a 1,3-DAG, como se muestra en la Figura 4.43, o debido a una isomerización, lo que está de acuerdo con lo indicado por Pérez-Camino *et al.*, (2001). De esta manera, aunque los DAG no poseen una relación directa con la calidad pueden ser un indicador de aceitunas deterioradas por procesos fermentativos.

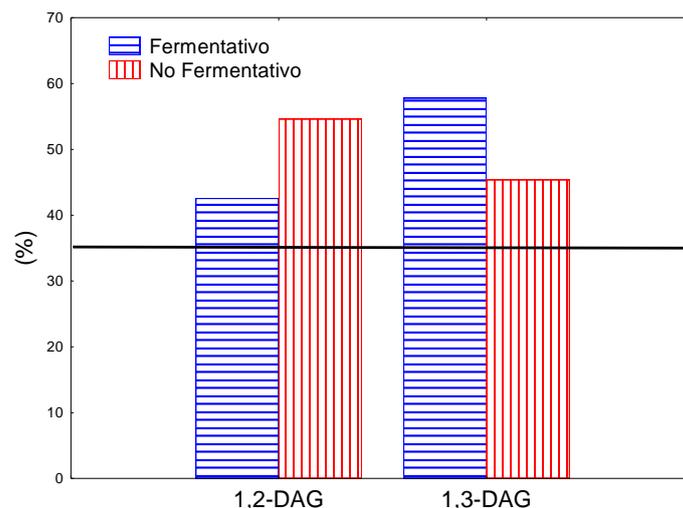


Figura 4.43. Diagrama de barras del porcentaje de 1,2-DAG y 1,3-DAG de los defectos fermentativos y no fermentativos.

Como se explicó anteriormente, la reacción incompleta de formación de los triacilgliceroles y las reacciones hidrolíticas producidas en las aceitunas son las responsables de la presencia de DAG en la fracción polar del VOO (1-3 %) (León-Camacho *et al.*, 2013). En la Tabla 4.36 se observa que el contenido total de DAG en las muestras de EVOO (2,90%) es inferior al 3%, mostrando diferencias significativas ($p < 0,05$) en comparación con los aceites con defectos fermentativos (atrojado-borras, avinado-avinagrado y moho-humedad-tierra mojada). En este sentido, el contenido de DAG aumenta en los aceites con defectos sensoriales, siendo el defecto avinado-avinagrado el que mostró un mayor contenido (7,44%).

La Tabla 4.36 también muestra la razón de los isómeros 1,3 y 1,2. Si la razón es >1 , el contenido de 1,3-DAG es mayor al contenido de 1,2-DAG. La Figura 4.44 muestra que este hecho ocurre en las muestras con defectos fermentativos. Sin embargo, cuando la razón entre ambos isómeros es <1 , el contenido de 1,2-DAG es superior a la cantidad de 1,3-DAG, como ocurre en los aceites con defectos no fermentativos (helada y madera-humedad) y en los EVOO (Figura 4.44). Es destacable que los valores correspondientes a los aceites con defectos no fermentativos, son superiores a los de EVOO, que se puede deber a que la hidrólisis enzimática o química de los triacilgliceroles se produzca también en estos defectos aunque su origen no sea fermentativo.

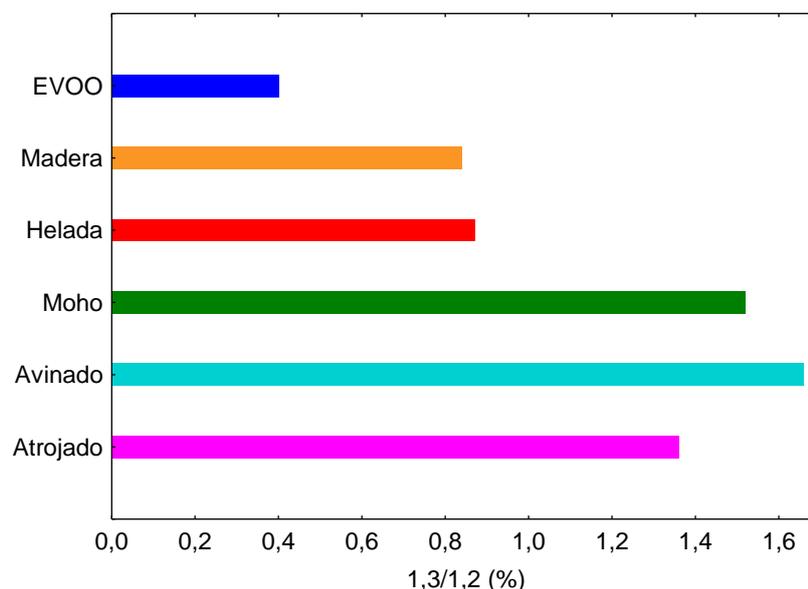


Figura 4.44. Diagrama de barras de la razón $\Sigma 1,3/\Sigma 1,2$ de las muestras con defectos y las muestras de EVOO.

La comparación de la información proporcionada por el panel de cata (Tablas 3.1 y 3.2) y el contenido de 1,2-DAG (Anexo I, Tabla 6) de las 38 muestras comerciales analizadas revela que en el 63% de los aceites existe un desacuerdo entre ambas informaciones. Es decir,

que el contenido de DAG clasifica a los aceites en un categoría (EVOO, VOO y LVOO) diferente a la asignada por el panel de cata, lo que indica que la información aportada por cada procedimiento es diferente.

En este estudio se han observado valores bajos de RSD% ($<10\%$) en repetibilidad y precisión intermedia del método para la determinación de 1,2-DAG, a pesar de que los valores de RSD% en repetibilidad para algunos compuestos individuales eran ligeramente superiores ($>10\%$). Por otro lado, se ha comprobado que existe una relación clara del isómero 1,3-DAG con algunos procesos fermentativos. Sin embargo, se ha constatado que existe una escasa relación entre el contenido del isómero 1,2-DAG y la calidad sensorial del aceite. Además, se ha observado que el contenido de 1,2-DAG en aceites comerciales con defectos sensoriales cumple con los límites establecidos por algunas normas ($\geq 35\%$) para los EVOO. Debido a lo anterior, al no existir una relación directa con la calidad, aunque ofreciendo información sobre la fermentación sufrida por la aceituna, es difícil controlar la calidad del aceite de oliva virgen con estos compuestos únicamente, ya que ofrecen una información parcial.

4.7. Análisis comparativo de los parámetros de calidad estudiados: fortalezas, debilidades y oportunidades

- CE (2013). Reglamento nº1348/2013 de la Comisión que modifica el Reglamento (CEE) nº2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 338, 31-67.
- Aparicio, R., Morales, M.T., García-González, D.L. (2012). Towards new analyses of aroma and volatiles to understand sensory perception of olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 114, 1114-1125.
- Tena, N., Wang, S.C, Aparicio-Ruiz, R., García-González, D.L., Aparicio, R. (2015). An in depth assessment of analytical methods for olive oil purity, safety and quality characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 4509-4526.
- Tsimidou, M. (2013). Analytical methodologies: phenolic compounds related to olive oil taste issues. En: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*, pp. 311-334. Aparicio R. y Harwood J. (Editores). 2º Edición, Springer, New York.
- Morales, M.T., Luna, G., Aparicio, R. (2005). Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chemistry* 91, 293-301.
- Pérez-Camino, M.C., Modera, W., Cert, A. (2001). Effects of olive oil fruit quality and oil storage practices on the diacylglycerols content of virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 699-704.
- Caponio, F., Paradiso, V.M., Bilancia, M.T., Summo, C., Pasqualone, A., Gomes, T. (2013). Diacylglycerol isomers in extra virgin olive oil: Effect of different storage conditions. *Food Chemistry* 140, 772-776.
- EC (2013). European Communities. Workshop on olive oil authentication. Madrid, Spain.
- COI (2015b). Sensory analysis of olive oil. Method for the organoleptic assessment of virgin olive oil. COI/T. 20/Doc. nº15/Rev. 7. Madrid: Consejo Oleícola Internacional.
- EFSA (2011). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage. Pursuant

to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9(4), 2033. www.efsa.europa.eu/efsajournal.

AS (2011). Australian Standard: Olive oils and olive-pomace oils. Committee FT-034. Olive Oils. Available: www.standards.org.au

DGE (2012). Hinweise zu den DGF-Einheitsmethoden C-VI 15 (08) und C-VI 16 (08) zur Bestimmung von Pyropheophytin a und isomeren Diacylglycerinen. Germany: German Society for Fat Science.

SANS (2013). Olive oils and pomace olive oils. South Africa: South African National Standards.

CDFA (2014). California Department of Food and Agriculture. Proposed Grade and Labeling Standards for olive oil, refined-olive oil and olive-pomace oil. Estado de California.



Conclusions /Conclusiones

5. CONCLUSIONS

1. Quality parameters of two analytical methods (GCMS and GC-FID) were studied for the determination of 32 volatile compounds of virgin olive oil (VOO). GCMS method showed higher sensitivity and selectivity, and better results in repeatability and precision than GC-FID method. As to linearity, over 50% of compounds analyzed by GC-FID method showed higher working range (0.1-15.0 mg/kg) than GCMS method. Both methods, however, showed similar accuracy values.

2. Markers of different sensory defects were determined and their contribution to the aroma, according to their OAV, was evaluated. It has been proved the usefulness of these compounds in the differentiation of VOO samples from different categories, including oils qualified with some slight sensory defects (virgin olive oil category). Also, these markers have allowed discriminating VOOs according to sensory defects perceived in the aroma.

3. The concentration of several phenols (hydroxytyrosol, vanillic acid, vanillin, 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-AC, lignans, 3,4-DHPEA-EA and luteolin) has allowed discriminating between VOOs of different qualities ($p < 0,05$), while 3,4-DHPEA-EA has allowed distinguishing between fermentative defects oils (winey-vinegary, musty-humidity-earthly or fusty) and non-fermentative defects (wet-wood and frostbitten olives) perceived in VOOs. The method showed good linearity and precision.

4. Frostbitten olives defect has been characterized for the first time and it has been demonstrated that two sensory profiles are related to the kind of freezing affecting to olives. One of them is characterized by soapy, humidity and a light strawberry aroma sensory descriptors, while its chemical characteristic concerns to three phenols (pinosresinol, *p*-coumaric acid, *p*-HPEA-EA) and four volatiles (ethyl 2-methylbutanoate, E-2-heptenal, 2 heptanol, ethyl propanoate). The another profile is characterized by woody and frozen sensory descriptors, and high concentration of two phenols (luteolin, apigenin) and three volatiles (pentanal, E-2-heptanal, octanal).

5. It has been confirmed that pyropheophytins are not related to organoleptic quality, but they are a good marker of EVOO freshness, and furthermore they can provide useful information about its storage conditions.

6. Olive oils with median of defects over than 3 showed concentrations of ethyl esters within the legal limit for extra virgin, which demonstrate low relation to quality. It has been determined that there is a low correlation between ethyl esters concentration and the ethanol content. The variation of the content of alkyl esters in extra virgin and fusty sensory defect oils was studied when they were subjected to accelerated oxidative processes. It has been observed that the content of alkyl esters is not affected in extra virgin olive oil, while it is reduced in oils with fusty defect. This study shows that there is not a direct relationship between alkyl esters and quality, although there is some relationship with oils undergone fermentation processes.

7. It has been demonstrated that concentrations of 1,2 and 1,3-diacylglycerols isomers are not useful to discriminate good quality virgin olive oils from virgin olive oils qualified with sensory defects coming from non-fermentative processes, but they could be useful in the case of fermentative processes. These compounds show apparent causal relationship to some sensory attributes, but they are not directly responsible for their perceptions by consumers.

8. The contribution of various parameters to the sensory quality was assessed, and there were three different behaviors. A causal relationship, which is characteristic of flavour compounds (volatiles and phenol), because they are directly responsible for the sensory attributes. An apparently causal relationship (alkyl esters and diacylglycerols), in which the parameters show a causal relation to VOO sensory quality, but they are not directly responsible for the production of sensory attributes. And finally, a casual relationship (pyropheophytins) wherein compounds are not responsible for the production of sensory attributes, but they are mathematically correlated with them. Of all these compounds, indicators based on causal relationship are the only compounds that provide objective information about VOO organoleptic quality.

5. CONCLUSIONES

1. Se han estudiado los parámetros de calidad de dos métodos analíticos para la determinación de 32 compuestos volátiles en aceite de oliva virgen (GCMS y GC-FID). El método GCMS mostró mayor sensibilidad y selectividad y mejores resultados en repetibilidad y precisión intermedia que el método GC-FID. En cuanto a linealidad, más de un 50% de los compuestos analizados mediante GC-FID presentaron un rango lineal de trabajo (0,1-15,0 mg/kg) superior al establecido en GCMS. Ambos métodos mostraron valores similares de exactitud.

2. Se han establecido los marcadores de diferentes defectos sensoriales y se ha evaluado su contribución al aroma mediante el cálculo de sus OAV. Se ha demostrado la utilidad de estos compuestos en la diferenciación de muestras de diferentes categorías, incluyendo aceites con algún ligero defecto sensorial (categoría virgen). Asimismo, estos marcadores han permitido discriminar aceites según su defecto sensorial.

3. La concentración de ciertos fenoles (hidroxitirosol, ácido vainílico, vainillina, 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-AC, lignanos, 3,4-DHPEA-EA y luteolina) ha permitido diferenciar aceites de buena calidad de aceites con defectos sensoriales ($p < 0,05$), mientras que 3,4-DHPEA-EA ha permitido diferenciar aceites con defectos fermentativos (avinado-avinagrado, moho-humedad o atrojado-borras) de no fermentativos (madera-humedad o helada). El método presentó buena linealidad y precisión.

4. Se ha caracterizado por primera vez el defecto sensorial helada, del que existen dos perfiles sensoriales que están relacionados con el tipo de congelación que sufre la aceituna. Uno de ellos está caracterizado con los descriptores jabonoso, humedad y ligero aroma a fresa, y por los niveles de concentración de tres fenoles (pinorresinol, ácido *p*-cumárico, *p*-HPEA-EA) y cuatro volátiles (2-metilbutanoato de etilo, E-2-heptenal, 2-heptanol, propanoato de etilo). El otro perfil está caracterizado con los descriptores madera y congelado, y por los niveles de concentración de dos fenoles (luteolina, apigenina) y tres volátiles (pentanal, E-2-heptenal, octanal).

5. Se ha comprobado que las pirofeofitinas no están relacionadas con la calidad organoléptica, pero sí es un buen indicador de la frescura del aceite, y pueden proporcionar información útil sobre las condiciones de almacenamiento del aceite de oliva virgen.

6. Los aceites con mediana de defectos superiores a 3 mostraron concentraciones de ésteres etílicos por debajo del límite legal establecido para los vírgenes extra, lo que pone de manifiesto la escasa relación de estos compuestos con la calidad. Se ha determinado que existe una baja correlación entre las concentraciones de los ésteres etílicos y el contenido de etanol. Se ha estudiado la variación en el contenido de ésteres alquílicos en muestras de aceites de oliva vírgenes extra y con el defecto sensorial atrojado-borras cuando son sometidas a procesos oxidativos acelerados. Se ha observado que el contenido de ésteres alquílicos no se ve afectado en los aceites vírgenes extra, mientras que se reduce en el aceite atrojado-borras. El estudio pone de manifiesto que la relación entre los esterres alquílicos y la calidad no es directa aunque puede existir cierta relación con los aceites sometidos a procesos fermentativos.

7. Se ha demostrado que las concentraciones de los isómeros 1,2 y 1,3-diacilgliceroles no serían útiles para diferenciar aceites de buena calidad de aceites con defectos provenientes de procesos no fermentativos, pero podrían serlo en el caso de defectos fermentativos. Estos compuestos presentan una relación aparentemente causal con algunos atributos sensoriales pero no son directamente responsables de ellos.

8. Se ha evaluado la posible contribución de los diferentes parámetros a la calidad sensorial, y se han observado tres comportamientos diferentes. Una relación causal, característica de los compuestos de “flavor” (volátiles y fenoles), en la que los propios compuestos son los responsables directos de los atributos sensoriales. Una relación aparentemente causal (ésteres alquílicos y diacilgliceroles), en la que los parámetros muestran una relación causal con la calidad sensorial del aceite de oliva, pero no son los responsables directos de la producción de los atributos sensoriales. Y, por último, una relación casual (pirofeofitinas) en la que los compuestos no son los responsables de la producción de los atributos sensoriales, sino que se correlacionan matemáticamente con ellos. De todos ellos, los indicadores basados en la relación causal son los que proporcionan una información objetiva sobre la calidad organoléptica del aceite.



Bibliografía

- Acree, T., Barnard, J., Cunningham, D. (1994). A procedure for the sensory analysis of gas chromatographic effluents. *Food Chemistry* 14, 273-286.
- Alkan, D., Tokatli, F., Ozen, B. (2012). Phenolic characterization and geographical classification of commercial extra virgin olive oils produced in Turkey. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 89, 261-268.
- Allouche, Y., Jiménez, A., Uceda, M., Aguilera, M.P, Gaforio, J.J., Beltrán, G. (2010). Influence of olive paste preparation conditions on virgin olive oil triterpenic compounds at laboratory-scale. *Food Chemistry* 119, 765-769.
- Amelotti, G., Daghetta, A., Ferrario, A. (1989). Content and structure of partial glycerides in virgin olive oil: Their evolution by different working process and preservation form. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 66, 681-692.
- Angerosa, F., Camera, L., d'Alessandro, N., Mellerio, G. (1998). Characterization of seven new hydrocarbon compounds present in the aroma of virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 648-653.
- Angerosa, F., Campestre, C. (2013). Sensory quality: Methodologies and applications. En: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*, pp. 523-560. Aparicio, R., Harwood, J. (Editores). 2º Edición, Springer, New York.
- Angerosa, F., Lanza, B., Marsilio, V. (1996). Biogenesis of "fusty" defect in virgin olive oils. *Grasas y Aceites* 47, 142-150.
- 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.
- Anniva, C., Grigoriadou, D., Psomiadou, E., Tsimidou, M.Z. (2006). Pheophytin α degradation products as useful indices in the quality control of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 83, 371-375.
- Aparicio, R., Aparicio-Ruiz, R. (2000). Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A* 881, 93-104.

- Aparicio, R., Conte, L.S., Fiebig, H.J. (2013). Olive oil authentication. En: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*, pp. 589-654. Aparicio, R., Harwood, J. (Editores). 2º Edición, Springer, New York.
- Aparicio, R., García-González, D.L. (2013). Olive oil Characterization and Traceability. En: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*, pp. 431-478. Aparicio, R., Harwood, J. (Editores). 2º Edición, Springer, New York.
- Aparicio, R., Morales, M.T. (1998). Characterization of olive ripeness by green aroma compound of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46, 1116-1122.
- Aparicio, R., Morales, M.T., Alonso, M.V. (1996). Relationship between volatile compound and sensory attributes by statical sensory wheels-An application to virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73, 1253-1264.
- Aparicio, R., Morales, M.T., Alonso, V. (1997). Authentication of European Virgin Olive Oils by Their Chemical Compounds, Sensory Attributes, and Consumers' Attitudes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 1076-1083.
- Aparicio, R., Morales, M.T., García-González, D.L. (2012). Towards new analyses of aroma and volatiles to understand sensory perception of olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 114, 1114-1125.
- Aparicio, R., Roda, L., Albi, M.A., Gutiérrez, F. (1999). Effect of Various Compounds on Virgin Olive Oil Stability Measured by Rancimat. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 47, 4150-4155.
- Aparicio-Ruiz, R. (2008). Características de las reacciones de termodegradación de pigmentos clorofílicos y carotenoides en aceite de oliva virgen. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla.
- Aparicio-Ruiz, R., Aparicio, R. García-González, D.L. (2014). Does 'best before' date embody extra-virgin olive oil freshness? *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 554-556.
- Aparicio-Ruiz, R., García-González, D.L, Oliver-Pozo, C., Tena, N., Morales, M.T, Aparicio, R. (2015). Phenolic profile of virgin olive oils with and without sensory defects: Oils

- with non-oxidative defects exhibit a considerable concentration of phenols. *European Journal of Lipid Science and Technology* 116, Article in press.
- Aparicio-Ruiz, R., Mínguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B. (2010). Thermal degradation kinetics of chlorophyll pigments in virgin olive oils. 1. Compounds of series a. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 6200-6208.
- Aparicio-Ruiz, R., Roca, M., Gandul-Rojas, B. (2012). Mathematical model to predict the formation of pyropheophytin *a* in virgin olive oil during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 7040-7049.
- Armaforte, E., Mancebo-Campos, V., Bendini, A., Salvador, MD., Fregapane, G., Cerretani, L. (2007). Retention effects of oxidized polyphenols during analytical extraction of phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of Separation Science* 30, 2401-2406.
- AS (2011). Australian Standard: Olive oils and olive-pomace oils. Committee FT-034. Olive Oils. Available: www.standards.org.au
- Azadmard-Damirchi, S., Dutta, PC. (2006). Novel solid-phase extraction method to separate 4-desmethyl-, 4-monomethyl-, and 4,4'-dimethylsterols in vegetable oils. *Journal of Chromatography A* 1108, 183-187.
- Bada-Gancedo, J.C., Prieto-Gonzalez, M.M., Bernat, J.X., Graciani-Constante, E., León-Camacho, M. (2002). Application of two heating methods in physical refining of high-FA olive and sunflower oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79, 209-214.
- Bajoub, A., Carrasco-Pancorbo, A., Ajal, E.A., Ouazzani, N., Fernández-Gutiérrez, A. (2015). Potential of LC-MS phenolic profiling combined with multivariate analysis as an approach for the determination of the geographical origin of north Moroccan virgin olive oils. *Food Chemistry* 166, 292-300.
- Baccouri, O., Guerfel, 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.

- Bartolini, G., Prevost, G., Messeri, C., Carignani, G., Menini, U.G. (1998). Olive germplasm: cultivars and world-wide collections. FAO, Rome
- Barjol, J.L. (2013). Introduction. En: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*, pp. 1-17. Aparicio, R., Harwood, J. (Editores). Springer, New York.
- Beltrán, G., Cuadros, L. (2015). Contenido de los ésteres alquílicos durante la maduración y evolución durante el almacenamiento. XVII Simposium científico-técnico. Expoliva.
- Bendini, A., Cerretani, L., Valli, E., Mazzini, C., Lercker, G. (2009). Application of analytical methods to determine mildly deodorized olive oils in commercial extra virgin olive oils. *Industrie alimentari* 496, 46-51.
- Berger, R.G. (1995). En Y.H. Hui and G.G. Khachatourians (Eds.). *Food biotechnology: Microorganisms*. New York: VCH.
- Berzas Nevado, J.J., Castañeda Peñalvo, G., Rodríguez Robledo, V., Vargas Martínez, G. (2009). New CE–ESI–MS analytical method for the separation, identification and quantification of seven phenolic acids including three isomer compounds in virgin olive oil. *Talanta* 79, 1238-1246.
- Biedermann, M., Bongartz, A., Mariani, C., Grob, K. (2008a). Fatty acid methyl and ethyl esters as well as wax esters for evaluating the quality of olive oils. *European Food Research and Technology* 228, 65-74.
- Biedermann, M., Haase-Aschoff, P., Grob, K. (2008b). Wax ester fraction of edible oils: Analysis by on-line LC–GC–MS and GC × GC–FID. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110, 1084-1094.
- Blank, I. (2002). Gas chromatography – olfactometry in food aroma analysis. En: *Flavor, Fragrance, and Odor Analysis*, pp. 297–332. Marsili, R. (Editor). Marcel Dekker, New York.
- Brenes, M., García, A., García, P., Garrido A. (2001). Acid hydrolysis of secoiridoide aglycons during storage of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 5609-5614.
- Breslin, P. (2001). Human gustation and flavour. *Flavour and Fragrance Journal* 16,439-456.

- Boggia, R., Borgogni, C., Hysenaj, V., Leardi, R., Zunina, P. (2014). Direct GC–(EI) MS determination of fatty acid alkyl esters in olive oils. *Talanta* 119, 60-67.
- Boqué, R., Maroto, A., Riu, J., Rius, F.X. (2002). Validation of analytical methods. *Grasas y Aceites* 53, 128-143.
- Callejón, R.M., González, A.G., Troncoso, A.M., Morales, M.L. (2008) Optimization and validation of headspace sorptive extraction for the analysis of volatile compounds in wine vinegars. *Journal of Chromatography A* 1204, 93-103.
- Caponio, F., Gomez, T., Pasqualone, A. (2001). Phenolic compounds in virgin olive oil: Influence of ripeness on organoleptic characteristics and self-life. *European Food Research and Technology* 212, 329-333.
- Caponio, F., Paradiso, V.M., Bilancia, M.T., Summo, C., Pasqualone, A., Gomes, T. (2013). Diacylglycerol isomers in extra virgin olive oil: Effect of different storage conditions. *Food Chemistry* 140, 772-776.
- Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Rapid quantification of the phenolic fraction of Spanish virgin olive oils by capillary electrophoresis with UV detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 7984-7991.
- Cavalli, J.F., Fernández, X., Lizzani-Cuvelier, L. (2004). Characterization of volatile compounds of French and Spanish virgin olive oils by HS-SPME: Identification of quality-freshness markers. *Food Chemistry* 88, 151-157.
- CDFA (2014). California Department of Food and Agriculture. Proposed Grade and Labeling Standards for olive oil, refined-olive oil and olive-pomace oil. Estado de California.
- CE (1991). Reglamento nº2568/1991 de la Comisión relativo a las características de los aceites de olivo y los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 248, 1-114.
- CE (2003). Reglamento nº1989/2003 de la Comisión que modifica el Reglamento (CEE) nº2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 295, 57-77.

- CE (2008). Reglamento nº640/2008 de la Comisión que modifica el Reglamento (CEE) nº2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 178, 11-16.
- CE (2012). Reglamento nº432/2012 de la comisión por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 136/1-40.
- CE (2013). Reglamento nº1348/2013 de la Comisión que modifica el Reglamento (CEE) nº2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 338, 31-67.
- Chaintreau, A. (2002). Quantitative use of gas chromatography-olfactometry: the GC-“SNIF” method. En: *Flavor, Fragrance, and Odor Analysis*, pp. 333-348. Marsili, R., (editor). Marcel Dekker, Inc, New York.
- Chatonnet, P., Labadie, D., Boutou, S., Fleury, A. Carrillo, J.D, Palacio, A.T. (2009). Identificación y cuantificación rápida de los contaminantes químicos considerados como defectos organolépticos más importantes del vino. *Acenología* www.acenología.com
- Christie, P.J., Alfenito, M.R., Walbot, V. (1994). Impact of low temperature stress on general phenylpropanoid and anthocyanin pathways: Enhancement of transcript abundance and anthocyanin pigmentation in maize seedlings. *Planta* 194, 541-549.
- Cimato, A., Dello Monaco, D., Distante, C., Epifani, M., Siciliano, P., Taurino, A.M., Zuppa, M., Sani, G. (2006). Analysis of single-cultivar extra virgin olive oils by means of an Electronic Nose and HS-SPME/GC/MS methods. *Sensors and Actuators B* 114, 674-680.
- Clodoveo, M.L. (2012). Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and future - An overview. *Trends in Food Science and Technology* 25, 13-23.
- COI (2009). Determinación de los biofenoles de los aceites de olive mediante HPLC. COI/T.20/Doc. nº 29. Madrid: Consejo Oleícola Internacional.

- COI (2010). Method of analysis: Determination of the content of waxes, fatty acid methyl esters and fatty acid ethyl esters by capillary gas chromatography. COI/T. 20/Doc n°28/Rev. 1. Madrid: International Olive Council.
- COI (2012). Method of analysis: Determination of the content of waxes, fatty acid methyl esters and fatty acid ethyl esters by capillary gas chromatography using 3 grams of silica. COI/T. 20/Doc n°3. Madrid: International Olive Council.
- COI (2013a). Trade Standard applying to olive oils and olive-pomace oils. COI/T. 15/Doc n°3/Rev. 7. Madrid: Consejo Oleícola Internacional.
- COI (2013b). Determination of composition of triacylglycerols and composition and content of di-acylglycerols by capillary gas chromatography, in vegetable oils. COI/T. 20/Doc n°32. Madrid: Consejo Oleícola Internacional.
- COI (2014). Consejo Oleícola Internacional. Datos producción, consumo, exportación e importación europea y mundial de aceite de oliva. www.internacionaoliveoil.org
- COI (2015a). Trade Standard applying to olive oils and olive-pomace oils. COI/T. 15/Doc n°3/Rev. 8. Madrid: Consejo Oleícola Internacional.
- COI (2015b). Sensory analysis of olive oil. Method for the organoleptic assessment of virgin olive oil. COI/T. 20/Doc. n°15/Rev. 7. Madrid: Consejo Oleícola Internacional.
- Compañó Beltrán, R. y Ríos Castro, A. (2002). *Garantía de la Calidad en los Laboratorios Analíticos*. Síntesis, S.A. Madrid.
- Criado, M.N., Morelló, J.R., Motilva, M.J., Romero, M.P. (2004). Effect of growing area on pigment and phenolic fractions of virgin olive oils of the Arbequina variety in Spain. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 81, 633-640.
- Damtoft, S., Franzyk, H., Jensen, S.R. (1993). Biosynthesis of secoiridoid glucosides in Oleaceae. *Phytochemistry* 34, 1291-1299.
- Damtoft, S., Franzyk, H., Jensen, S.R. (1995). Biosynthesis of iridoids in *Syringa* and *Fraxinus*: Secoiridoid precursors. *Phytochemistry* 40, 773-784

- Da Silva, M.A, Lundahl, D.S, McDaniel, M.R. (1994). The capability and psychophysics of Osme: a new GC-olfactometry technique. En: *Trends of Flavour Research*, pp.191-209. Maarse, H., Van der Heij, D.G (Editores). Elsevier, Amnsterdam.
- DGE (2012). Hinweise zu den DGF-Einheitsmethoden C-VI 15 (08) und C-VI 16 (08) zur Bestimmung von Pyropheophytin a und isomeren Diacylglycerinen. Germany: German Society for Fat Science.
- DGE (2015). Qualität und Vermarktung von Olivenölen in der Europäischen Union. Germany: German Society for Fat Science.
- Di Giacinto, L., Di Loreto, G., Di Serio, G., Giansante, L., Faberi, A., Marianella, R.M., Ricchetti, L., Perri, E., Serraiocco, A., Vito, R. (2014). Monitoraggio degli alchil esteri (AE) nell'olio extra vergine di oliva (MONITORALCHIL). Risultati dell'attività sperimentale 2012-2014. *CRA-OLI, Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia*.
- Di Giovacchino, L., Sestili, S., Di Vincenzo, D. (2002) Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology* 104,587-601.
- Di Giovacchino, L. (2013). Technological aspects. En: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*, pp. 57-96. J. Harwood y R. Aparicio (Editores). 2º Edición, Springer, New York.
- Dimandja, J.M.D., Stanfill, S.B., Grainger, J., Patterson D.G. (2000). Application of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC-GC) to the qualitative analysis of essential oils. *Journal of High Resolution Chromatography* 23, 208-214.
- Dixon, R.A., Paiva, N.L. Stress-Induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell* 7, 1085-1097.
- EC (2013). European Communities. Workshop on olive oil authentication. Madrid, Spain.
- EFSA (2011). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage. Pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9(4), 2033. www.efsa.europa.eu/efsajournal.

- Escuderos, M.E. (2011). Olive oil aroma evaluation by gas chromatographic method: a critical review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 41, 70-80.
- EU, HORIZON 2020 Work Programme 2014-2015. Olive Oil Authentication, 2014. <http://ec.europa.eu/research/participants/portal/desktop/en/opportunities/h2020/topics/2329-sfs-14a-2014.html>
- EURACHEM (1998). The Fitness for Purpose of Analytical Methods, A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. EURACHEM Secretariat, Teddington, Middlesex.
- FDA (2001). Bioanalytical Method Validation. Guidance for Industry.
- Fernández, M.A., Assof, M., Jofre, V., Silva, M.F. (2014). Volatile Profile Characterization of Extra Virgin Olive Oils from Argentina by HS-SPME/GC-MS and Multivariate Pattern Recognition Tools. *Food Analytical Methods* 7, 2122-2136.
- Fregapane, G., Lavelli, V., León, S., Kapuralin, J., Salvador, M.D. (2006). Effect of filtration on virgin olive oil stability during storage. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108, 134-142.
- Fronimaki., P., Spyros, A., Christophoridou, S., Dais, P. (2002). Determination of the diglyceride content in Greek virgin olive oils and some commercial olive oils by employing ³¹P NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2207-2213.
- Gallardo-Guerrero, L., Gandul-Rojas, B., Roca, M., Mínguez-Mosquera, M.I. (2005). Effect of storage on the original pigment profile of Spanish virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 82, 33-39.
- Gallardo-Guerrero, L., Roca, M., Mínguez-Mosquera, M.I. (2002). Distribution of chlorophylls and carotenoids in ripening olives and between oil and alperujo when processed using a two-phase extraction system. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 79, 105-109.
- Galvano, F., La Fauci, L., Graziani, G., Ferracane, R., Masella, R., Di Giacomo, C., Scacco, C., D'Archivio, M., Vanella, L., Galvano, G. (2007). Phenolic compounds and

- antioxidant activity of Italian extra virgin olive oil Monti Iblei. *Journal of Medicinal Food* 10, 650-656.
- Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, L., Roca, M., Aparicio-Ruiz, R. (2013). Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Color Issues. En: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*, pp. 219-260. Aparicio R. y Harwood J. (Editores). 2º Edición, Springer, New York.
- Gandul-Rojas, B., Roca, M., Mínguez-Mosquera, M.I. (1999). Chlorophyll and carotenoid pattern in virgin olive oil. Adulteration control. En: Proceeding of the 1st international congress on pigments in food technology (PFI), pp. 381-386. Mínguez-Mosquera, M.I., Jarén-Galán, M., Hornero-Méndez, H. PFT Press, Sevilla.
- García, R., Martín, N., Cabrita, M.J. (2013). Putative markers of adulteration of extra virgin olive oil with refined olive oil: prospects and limitations. *Food Research International* 54, 2039-2044.
- García-González, D.L., Aparicio, R. (2010). Research in olive oil: Challenges for the near future. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 12569-12577.
- García-González, D.L., Aparicio-Ruiz, R., Aparicio, R. (2009b). Olive oil. En: *Gourmet and Health-Promoting Specialty Oils*, pp. 33-72. R.A Moreau y A. Kamal-Eldin (Editores). AOCS Press, Urbana, Illinois.
- García-González, D.L., Barie, N., Rapp, M., Aparicio R. (2004). Analysis of virgin olive oil volatiles by a novel electronic nose based on a miniaturized SAW Sensor Array coupled with SPME enhanced headspace enrichment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 7475-7479.
- García-González, D.L., Luna, G., Morales, M.T., Aparicio, R. (2009a). Stepwise geographical traceability of virgin olive oils by chemical profiles using artificial neural network models. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111, 1003-1013.
- García-González, D.L., Morales, M.T., Aparicio, R. (2010a). Olive and olive oil. En: *Handbook of Fruit and Vegetable Flavors*, pp. 821-847. Hui, Y.H. (Editor), Wiley, New Jersey.

- García-González, D.L., Romero, N., Aparicio, R. (2010b). Comparative study of virgin olive oil quality from single varieties cultivated in Chile and Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 8357-8364.
- García-González, D.L., Vivancos, J., Aparicio, R. (2011). Mapping brain activity induced by olfaction of virgin olive oil aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 10200-10210.
- García-González, D.L., Tena, N., Aparicio, R. (2010c). Quality characterization of the new virgin olive oil var. Sikitita by phenols and volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 12899-12905.
- García-Mesa, J.A., Pereira-Caro, G., Fernández-Hernández, A., García-Ortiz, A. (2008). Influence of lipid matrix in the bitterness perception of virgin olive oil. *Food Quality and Preference* 19, 421-430.
- García-Rodríguez, R., Romero-Segura, C., Sanz, C., Sánchez-Ortiz, A., Pérez, A.G. (2011). Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Research International* 44, 629-635.
- Gertz, C., Fiebig H.J. (2006a). Pyropheophytin a: Determination of thermal degradation products of chlorophyll a in virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108, 1062-1065.
- Gertz C, Fiebig HJ (2006b). Isomeric diacylglycerols – determination of 1,2- and 1,3 diacylglycerols in virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 108, 1066-1069.
- Gilbert-López, B., Robles-Molina, J., García-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A. (2010). Rapid determination of BTEXS in olives and olive oil by headspace-gas chromatography/mass spectrometry (HS-GC-MS). *Talanta* 83, 391-399.
- Gimeno, E., Castellote, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., De la Torre, M.C., López-Sabater, M.C. (2002). The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, α -tocopherol, and β -carotene) in virgin olive oil. *Food Chemistry* 78, 207-211.

- Giuffrida, D., Salvo, F., Salvo, A., La Pera, L., Dugo, G. (2007). Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties. *Food Chemistry* 101, 833–837.
- Gómez-Alonso, S., Mancebo-Campos, V., Desamparados Salvador M., Fregapane G. (2007). Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature. *Food Chemistry* 100, 36-42.
- Gómez-Coca, R.B., Moreda, W., Pérez-Camino, M.C. (2012). Fatty acid alkyl esters presence in olive oil vs. organoleptic assessment. *Food Chemistry* 135, 1205-1209.
- Gómez-Coca, R.B., Cruz-Hidalgo, R., Fernández, G.D., Pérez-Camino, M.C., Moreda, W. (2014). Analysis of methanol and ethanol in virgin olive oil. *MethodsX* 1, 207-211.
- Gómez-Rico, A., Fregapane, G., Salvador, M. D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International* 41, 433-440.
- Gómez-Rico, A., Inarejos-García, A. M., Salvador, M. D., Fregapane, G. (2009). Effect of malaxation conditions on phenol and volatile profiles in olive paste and the corresponding virgin olive oils (*Olea europaea* L. cv. Cornicabra). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 3587-3595.
- González, G., Herrador, M.A., Asuero, A.G. (2010). Intra-laboratory assessment of method accuracy (trueness and precision) by using validation standards. *Talanta* 82, 1995-1998.
- Grosch, W. (1994) Determination of potent odourants in foods by Aroma Extract Dilution Analysis (AEDA) and calculation of Odour Activity Values (OAVs). *Flavour and Fragrances Journal* 9, 147-158.
- Guillaume, C., Gertz, C., Ravetti, L. (2014). Pyropheophytin *a* and 1,2-diacyl-glycerols over time under different storage conditions in natural olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 91, 697-709.

- Guillaume, C., Ravetti, L. Gwyn, S. (2010). Characterisation of phenolic compounds in oils produced from frosted olives. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87, 247-254.
- Harrison, A.G. (1970). High-resolution mass spectra of aliphatic aldehydes. *Organization Mass Spectrometry* 3, 549-555.
- He, Z., Wiegel, J. (1995). Purification and characterization of an oxygen-sensitive reversible 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Clostridium hydroxybenzoicum*. *European Journal of Biochemistry* 229, 77-82.
- Hinteregger, C., Leitner, R., Loidl, M., Ferschl, A., Streichsbier, F. (1992). Degradation of phenol and phenolic compounds by *Pseudomonas putida* EKII. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37, 252-259.
- Hornero-Méndez, D., Gandul-Rojas, B., Mínguez-Mosquera, M.I. (2005). Routine and sensitive SPE-HPLC method for quantitative determination of pheophytin a and pyropheophytin a in olive oils. *Food Research International* 38, 1067-1072.
- Hrcirik, K., Fritsche, S. (2004). Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 106, 540-549.
- Iconomou, D., Arapoglou, D., Israilides, C. (2010). Improvement of phenolic antioxidants and quality characteristics of virgin olive oil with the addition of enzymes and nitrogen during olive paste processing. *Grasas y Aceites* 61, 303-311.
- ISO (1993) Internal Organization for Standardization, 3534-1. Statistics, Vocabulary and symbols. Ginebra.
- ISO (1994a). Internal Organization for Standardization, 5725. Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results. Ginebra.
- ISO (2009a). Internal Organization for Standardization, 29841. Vegetables fats and oils- Determination of the degradation products of chlorophylls *a* and *a'* (pheophytins *a*, *a'* and pyropheophytins. Ginebra.

- ISO (2009b). International Organization for Standardization, 29822. Vegetable fats and oils—Isomeric diacylglycerols—Determination of relative amounts of 1,2- and 1,3-diacylglycerols. Ginebra.
- IUPAC (1998). International Union of Pure and Applied Chemistry. Compendium of Analytical Nomenclature, En: Definitive Rules 1987. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- IUPAC (1999). International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized Guidelines for In-House Validation of Methods of Analysis (Technical reports). www.iupac.org/publications/pac/1999/.
- IUPAC (2001). International Union of Pure and Applied Chemistry. Selectivity in Analytical Chemistry Technical Draft. www.iupac.org/publications/pac/2001/.
- Jabeur, H., Zribi, A., Abdelhedi, R., Bouaziz, M. (2015). Effect of olive storage conditions on Chemlali olive oil quality and the effective role of fatty acids alkyl esters in checking olive oils authenticity. *Food Chemistry* 169, 289-296.
- Kalua, C.M., Allen, M.S., Bedgood Jr, D.R., Bishop, A.G., Prenzler, P.D., Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry* 100, 273-286.
- Kandyli, P., Vekiari, A.S., Kanellaki, M., Grati Kamoun, N., Msallem, M., Kourkoutas, Y. (2011). Comparative study of extra virgin olive oil flavor profile of Koroneiki variety (*Olea europaea* var. *Microcarpa alba*) cultivated in Greece and Tunisia during one period of harvesting. *Food Science and Technology* 44, 1333-1341.
- Kesen, S., Kelebek, H., Selli, S. (2014). Characterization of the key aroma compounds in turkish olive oils from different geographic origins by application of aroma extract dilution analysis (AEDA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 391-401.
- Kotti, F., Cerretani, L., Gargouri, M., Chiavaro, E., Bendini, A. (2010). Evaluation of the volatile fraction of commercial virgin olive oils from Tunisia and Italy: relation with olfactory attributes. *Journal of Food Biochemistry* 35, 681-698.

- La Camera, S., Gouzerh, G., Dhondt, S., Hoffmann, L., Fritig, B., Legrand, M., Heitz, T. (2004). Metabolic reprogramming in plant innate immunity: The contributions of phenylpropanoid and oxylipin pathways. *Immunological Reviews* 198, 267-284.
- Lavanchy, A., Houriet, R., Gäumann, T. (1979). The mass spectrometric fragmentation of n-alkanes. *Organization Mass Spectrometry* 14, 79-85.
- León-Camacho, M., Morales, M.T., Aparicio, R. (2013). Chromatographic Methodologies: Compounds for olive oil traceability issues. En: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*, pp. 163-218. Aparicio R. y Harwood J. (Editores). 2º Edición, Springer, New York.
- Levitt, J. (1980). *Responses of plants to environmental stress: chilling, freezing and high temperature stresses* (2nd Edition). Academic Press, New York.
- Luna, G. (2003). Caracterización de aceites de olive vírgenes europeos: implicaciones del análisis sensorial y la actitud de los consumidores. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, España.
- Luna, G., Morales, M.T., Aparicio, R. (2006a). Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions *Food Chemistry* 98, 243-252.
- Luna, G., Morales, M.T., Aparicio, R. (2006b). Changes Induced by UV Radiation during Virgin Olive Oil Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 4790-4794.
- Maia, L., Casal, S., Oliveira, M.B. (2008). Validation of a micromethod for quantification of lutein and beta-carotene in olive oil. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies* 31, 733-742.
- Mailer, R.J., Ayton, J., Graham, K. (2010). The influence of growing region, cultivar and harvest timing on the diversity of Australian olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 87, 877-884.
- Malik, N.S.A., Bradford, J.M. (2006). Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. *Scientia Horticulturae* 110, 274-278.
- Mariani, C., Fedeli, E. (1986). Individuazione di oli di estrazione in quelli di pressione [olio di oliva]. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 63, 3-17.

- Marinas, A., Lafont, F., Aramendía, M.A., García, I.M., Marinas, J.M., Urbano, F.J. (2010). Chapter 71- Multiresidue Analysis of Low and Medium Polarity Pesticides in Olive Oil by GC-MS/MS. En: *Olives and olive oil in health and disease prevention*, pp. 667-683. V.R Preedy y R.R. Watson (Editores). Elsevier, San Diego.
- Márquez, V., Martínez, M., Guerra, M., Fariña, L., Boido, E., Dellacassa, E. (2013). Characterization of aroma-impact compounds in yerba mate (*Ilex paraguariensis*) using GC-olfactometry and GC-MS. *Food Research International* 53,808-815.
- Martínez-Suárez, J.M., Muñoz-Aranda, E., Alba-Mendoza, J., Lanzón-Rey, A. (1975). Informe sobre utilización del analizador de rendimientos "Abencor". *Grasas y Aceites* 26, 379-385.
- Mateos, R., Espartero, J.L., Trujillo, M., Ríos, J.J., León-Camacho, M., Alcudia, F., Cert A. (2001). Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 2185-2192.
- McDaniel, M.R., Miranda-López, R., Watson, B.T., Micheals, N.J., Libbey, L.M. (1990). Pinot noir aroma: a sensory/gas chromatographic approach. En: *Flavors and Off-flavors*, pp. 23-26. Charalambus, G. (Editor). Elsevier, Amsterdam.
- McNair, H.M., Miller, J.M. (1997). *Basic gas chromatography*. Wiley, New Jersey.
- Miller, N.J., Miller, J.C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4ª Edición, Pearson Educación, Madrid.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, M.L. (1992). Rapid method of quantification of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oil by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 60-63.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B. (1995). High-performance liquid chromatographic study of alkaline treatment of chlorophyll. *Journal of Chromatography A* 690, 161-176.

- Mínguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B., Garrido-Fernández, J., Gallardo-Guerrero, L. (1990). Pigment present in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 67, 192-196.
- Morales, M.T., Alonso, M. V., Ríos, J.J., Aparicio, R. (1995). Virgin olive oil aroma: relationship between volatile compounds and sensory attributes by chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43, 2925-2931.
- Morales, M.T., Aparicio, R. (1999). Effect of extraction conditions on sensory quality of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 76,295-300.
- Morales, M.T., Aparicio-Ruiz, R., Aparicio, R. (2013). Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Odor Issues. En: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*, pp. 261-311. Aparicio R. y Harwood J. (Editores). 2º Edición, Springer, New York.
- Morales, M.T., Aparicio, R., Gutiérrez, F. (1992). Técnicas de aislamiento y concentración de volátiles de aceites vegetales. *Grasas y Aceites* 43, 164-173.
- Morales, M.T., Aparicio, R., Ríos, J.J. (1994). Dynamic headspace gas chromatography method for determining volatiles in virgin olive oil. *Journal Chromatography A* 668, 455-462.
- Morales, M.T., Calvente, J.J., Aparicio, R. (1996). Influence of olive ripeness on the concentration of green aroma compounds in virgin olive oil. *Flavour and Fragrance Journal* 11, 171-178.
- Morales, M.T., Luna, G., Aparicio, R. (2005). Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chemistry* 91, 293-301.
- Morales, M.T., Ríos, J.J., Aparicio, R. (1997). Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: Flavors and off-flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 45, 2666-2673.
- Morelló, J. R., Motilva, M. J., Ramo, T., Romero, M. P. (2003). Effect of freeze injuries in olive fruit on virgin olive oil composition. *Food Chemistry* 81, 547-553.

- Moussa, Y.M., Gerosopoulos, D., Metzidakis, I., Kiritsakis, A. (1996). Effect of altitude on fruit and oil quality characteristics of 'Mastoides' olives. *Journal of the Science of Food Agriculture* 71, 345-350.
- Nibbering, N. (2004). The McLafferty rearrangement: a personal recollection. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 15, 956-958.
- Noel, J.P., Austin, M.B., Bomati, E.K. (2005). Structure–function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 249-253.
- Pardo, J.E., Cuesta, M.A., Alvarruiz, A., Granell, J.D., Álvarez-Ortíz, M. (2011). Evaluation of potential and real qualities of virgin olive from the designation of origin (DO) “Aceite Montes de Alcaraz” (Albacete, Spain). *Food Chemistry* 124, 1684-1690.
- Peres, F., Jeleń, H.H., Majcher, M.M., Arraias, M., Martins, L.L., Ferreira-Dias, S. (2013). Characterization of aroma compounds in Portuguese extra virgin olive oils from Galega Vulgar and Cobrançosa cultivars using GC-O and GC×GC-ToFMS. *Food Research International* 54, 1979-1986.
- Pérez-Camino, M.C., Cert, A., Romero-Segura, A., Cert-Trujillo, R., Moreda, W. (2008). Alkyl esters of fatty acids a useful tool to detect soft deodorized olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6740-6744.
- Pérez-Camino, M. C., Moreda, W., Cert, A. (1996). Determination of diacylglycerol isomers in vegetable oils by solid-phase extraction followed by gas chromatography on a polar phase. *Journal of Chromatography A* 721, 305-314.
- Pérez-Camino, M.C., Modera, W., Cert, A. (2001). Effects of olive oil fruit quality and oil storage practices on the diacylglycerols content of virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 699-704.
- Pérez-Camino, M.C., Moreda, W., Mateos, R., Cert, A. (2002). Determination of esters of fatty acids with low molecular weight alcohols in olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 4721-4725.
- Pirisi, FM., Cabras, P., Falqui, CC., Migliorini, M., Muggelli, M. (2000). Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 1191-1196.

- Poerio, A., Bendini, A., Cerretani, L., Bonoli-Carbognin, M., Lercker, G. (2008). Effect of olive fruit freezing on oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110, 368-372.
- Pouliarekou, E., Badeka, A., Tasioula-Margari, M., Kontakos, S., Longobardi, F., Kontominas, M.G. (2011). Characterization and classification of Western Greek olive oils according to cultivar and geographical origin based on volatile compounds. *Journal of Chromatography A* 1218, 7534-7542.
- Pretsch, E., Bühlmann, P., Affolter, C., Herrera, A., Martinez, R. (2001). *Determinación estructural de compuestos orgánicos*. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona.
- Purcaro, G., Cordero, C., Liberto, E., Bicchi, C., Conte, L.S. (2014). Toward a definition of blueprint of virgin olive oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* 1334, 101-111.
- Ranalli, A., Contento, S. (2010). Analytical assessment of destoned and organic-destoned extra virgin olive oil. *European Food Research and Technology* 230, 965-971.
- Ranalli, A., Marchegiani, D., Contento, S., Girardi, F., Nicolosi, M.P., Brullo, M.D. (2009). Variations of iridoid oleuropein in Italian olive varieties during growth and maturation. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111, 678-687.
- Reboredo-Rodríguez, P., Gonzalez-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. (2012). Dynamic headspace/GC-MS to control the aroma fingerprint of extra-virgin olive oil from the same and different olive varieties. *Food Control* 25, 684-695.
- Ribes, A., Carrera, G., Gallego, E., Roca, X., Berenguer, M.J., Guardino, X. (2007). Development and validation of a method for air-quality and nuisance odors monitoring of volatic organic compound using multi-sorbent adsorption and gas chromatography/mass spectrometry thermal desorption system. *Journal of Chromatography A* 1140, 44-55.
- Roca, M., Mínguez-Mosquera, M.I. (2001). Changes in chloroplast pigments of olive varieties during fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 832-840.

- Roca, M., Mínguez-Mosquera, M.I. (2003). Involvement of chlorophyllase in chlorophyll metabolism in olive varieties with high and low chlorophyll content. *Physiologia Plantarum* 117, 459-466.
- Rodríguez-Saona, L.E., Barrett, D.M., Selivonchick, D.P. (1995). Peroxidase and lipooxygenase influence on stability of polyunsaturated fatty acids in sweet corn (*Zea mays* L.) during frozen storage. *Journal of Food Science* 60, 1041-1044.
- Romero, C., Brenes, M. (2014). Comment on addressing analytical requirements to support health claims on “Olive oil polyphenols” (EC Regulation 432/212). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 62, 10210-10211.
- Romero, I., García-González, D.L., Aparicio-Ruiz, R., Morales, M.T. (2015). Validation of SPME-GCMS method for the analysis of virgin olive oil volatiles responsible for sensory defect. *Talanta* 134, 394-401.
- Romero, M.P., Motilva, M.J. (2010). Effect of climatic conditions on quality of virgin olive oil. En: *Olives and Olive oil in Health and Disease Prevention*, pp. 43-50. V.R., Preedy y R.R. Watson (Editores). Elsevier, San Diego.
- Sánchez de Medina, V., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D. (2015). Characterization of monovarietal virgin olive oils by phenols profiling. *Talanta* 132, 424-432.
- SANS (2013). Olive oils and pomace olive oils. South Africa: South African National Standards.
- Sayago, A., Morales, M.T., Aparicio, R. (2004). Detection of hazelnut oil in virgin olive oil by a spectrofluorimetric method. *European Food Research and Technology* 218, 480-483.
- Schnürer, J., Olsson J., Börjesson, T. (1999). Fungan volatiles as indicators of food and feeds spoilage. *Fungal Genetics and Biology* 27, 209-217.
- Selvaggini, R., Servili, M., Urbani, S., Esposito, S., Taticchi, A., Montedoro, G.F. (2006). Evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil by direct injection in high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54, 2832-2838.

- Serani, A., Piacenti, D. (2001). Sistema analitico per l'identificazione di oli deodorati in oli vergini di oliva. Nota 1 - Analisi dei pigmento clorofilliani in oli vergini di oliva. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse* 78, 459-463.
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G., Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspect of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A* 1054, 113-27.
- Sparkman, D.O., Penton, Z.E., Kitson, F.G. (2011). *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*. 2ª Edición. Elsevier, Amsterdam.
- Springett, M. B. (1993). Formation of off-flavours due to microbiological and enzymic action. En: *Food Taints and Off-flavours*, pp. 244-255. Saxby, M.J. (Editor). Blackie Academic & Professional, London.
- Spyros, A., Philippidis, A., Dais, P. (2004). Kinetics of Diglyceride Formation and Isomerization in Virgin Olive Oils by Employing ^{31}P NMR Spectroscopy. Formulation of a Quantitative Measure to Assess Olive Oil Storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 157-164.
- Steponkus, P.L, Dowgert, M.F., Gordon-Kamm, W.J. (1983). Destabilization of the Plasma membrane of isolated plant protoplasts during a freeze-thaw cycle: the influence of cold acclimation. *Criobiology* 20, 448-465.
- Suarez, M., Macia, A., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2008). Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Chromatography* 1214, 90-99.
- Tena, N., Lazzez, A., Aparicio-Ruiz, R., Garcia-Gonzalez, D.L. (2007). Volatile compounds characterizing Tunisian chemlali and chétoui virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 7852-7858.
- Tena, N., Wang, S.C, Aparicio-Ruiz, R., García-González, D.L., Aparicio, R. (2015). An in depth assessment of analytical methods for olive oil purity, safety and quality characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63, 4509-4526.

- Tranchida, P.Q., Donato, P., Cacciola, F., Beccaria, M., Dugo, P., Mondello, L. (2013). Potential of comprehensive chromatography in food analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 52, 186-205.
- Tsimidou, M. Z., Georgiou, A., Koidis, A., Boskou, D. (2005). Loss of stability of “veiled” (cloudy) virgin olive oils in storage. *Food Chemistry* 93, 377-383.
- Tsimidou, M. (2013). Analytical methodologies: phenolic compounds related to olive oil taste issues. En: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*, pp. 311-334. Aparicio R. y Harwood J. (Editores). 2º Edición, Springer, New York.
- UNE-EN ISO (2015). Sistemas de gestión de calidad. Fundamentos y vocabulario (ISO 9000:2015). Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). Madrid.
- UNE-EN ISO (2005). Internal Organization for Standardization, 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Ginebra.
- Van Ruth, S.M., O'Connor, C.H. (2001). Evaluation of three gas chromatography-olfactometry methods: comparison of odour intensity-concentration relationships of eight volatile compounds with sensory headspace data. *Food Chemistry* 74, 341-347.
- Vas, G., Vékey, K. (2004). Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry* 39, 233-254.
- Vaz-Freire, L.T., da Silva, M.D.R.G., Freitas, A.M.C. (2009). Comprehensive two-dimensional gas chromatography for fingerprint pattern recognition in olive oils produced by two different techniques in Portuguese olive varieties Galega Vulgar, Cobrançosa e Carrasquenha. *Analytica Chimica Acta* 633, 263-270.
- Vergara-Domínguez, H., Gandul-Rojas, B., Roca, M. (2011). Formation of oxidised chlorophyll catabolites in olives. *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 851-857.
- Vera, P., Uliaque, B., Canellas, E., Escudero, A., Nerína, C. (2012). Identification and quantification of odorous compounds from adhesives used in food packaging materials by headspace solid phase extraction and headspace solid phase microextraction

- coupled to gas chromatography-olfactometry-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 745,53-63.
- Vichi, S., Pizzale, L., Conte L. C., Buxaderas, S., López-Tamames, E. (2003a). Solid-Phase Microextraction in the Analysis of Virgin Olive Oil Volatile Fraction: Modifications Induced by Oxidation and Suitable Markers of Oxidative Status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 6564-6571.
- Vichi, S., Pizzale, L., Conte L. C., Buxaderas, S., López-Tamames, E. (2003b). Solid-phase microextraction in the analysis of virgin olive oil volatile fraction: characterization of virgin olive oils from two distinct geographical areas of Northern Italy. *Food Chemistry* 51, 6572-6577.
- Vichi, S., Castellote, A.I., Pizzale, L., Conte L. C., Buxaderas, S., López-Tamames, E. (2003c). Analysis of virgin olive oil volatile compounds by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with mass spectrometric and flame ionization detection. *Journal of Chromatography A* 983, 19-33.
- Vichi, S., Pizzale, L., Conte L. C., Buxaderas, S., López-Tamames, E. (2005). Simultaneous determination of volatile and semi-volatile aromatic hydrocarbons in virgin olive by headspace solid-phase microextraction coupled to gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1090, 146-154.
- Vita-Serman, F., Babelis, G., Gallego, M.E., Kiessling, J., López, E., Sierra, E. (2014). A frost regime microclimatological study in southern Argentina (Añelo, Province of Neuquén). *Acta Horticulturae* 1057, 147-153.
- Wampler, B., Barringer, S.A. (2012). Volatile generation in bell peppers during frozen storage and thawing using selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). *Journal of Food Science* 77, C677-C683.
- Wang L.J., Huang, W.D., Li, J.Y., Liu, Y.F., Shi, Y.L. (2004). Peroxidation of membrane lipid and Ca²⁺ homeostasis in grape mesophyll cells during the process of cross-adaptation to temperature stresses. *Plant Science* 167, 71-77.
- Williams, M., Salas, J.J., Sánchez, J., Harwood, J.L. (2000) Lipoxygenase pathway in olive callus culture (*Olea europaea*). *Phytochemistry* 53, 13-19.

- Yeshurum, Y., Sobel, N. (2010). An odor is not worth a thousand words: from multidimensional odors to unidimensional odor objects. *Annual Review of Psychology* 61, 219-241.
- Yoshida, S., Sakai, A. (1968). The effect of thawing rate on freezing injury in plants. II. The change in the amount of ice in leaves as produced by the change in temperature. *Low Temperature Science Series Biological Sciences B* 26, 23-31.
- Yorulmaz, A., Tekin, A., Turan, S. (2011). Improving olive oil quality with double protection: Destoning and malaxation in nitrogen atmosphere. *European Journal of Lipid Science and Technology* 113, 637-643.
- Zhuang, H., Hamilton-Kemp, T.R., Andersen, R.A., Hildebrand, D.F. (1992). Developmental change in C₆-Aldehyde formation by soybean leaves. *Plant Physiology* 100, 80-87.



Anexo

Tabla 1. Concentración (mg/kg) de los compuestos fenólicos de 22 muestras comerciales.

Código muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	<i>o</i> -Difenoles	Secoiridoides	Lignanós	Fenoles Totales	Fenoles Health ²
F1	9,80	5,09	0,21	0,02	0,10	3,59	27,23	3,72	0,65	4,44	0,11	10,29	44,86	16,68	0,33	0,06	0,12	85,54	89,42	14,73	127,30	111,62
F2	11,14	13,39	0,37	0,03	0,29	4,28	26,99	6,28	2,14	6,92	nd	3,99	62,42	53,26	0,09	0,11	0,08	104,95	144,81	10,91	191,79	179,91
F3	12,97	10,83	0,20	0,03	0,28	3,61	10,26	2,29	1,22	6,06	0,08	1,75	42,72	54,54	0,08	0,23	0,15	69,79	108,75	7,80	147,29	138,44
F4	6,78	21,36	0,35	0,02	0,16	6,52	7,84	2,26	2,10	4,78	0,03	9,83	26,80	45,38	0,01	0,09	0,08	48,02	82,12	14,61	134,38	119,04
F5	5,62	9,13	0,68	0,01	0,10	2,82	1,94	1,74	3,11	1,67	0,05	1,14	19,72	62,48	0,15	0,15	0,09	30,25	87,25	2,81	110,60	106,55
F6	14,61	7,22	0,21	0,02	0,17	1,95	12,18	3,87	0,96	2,57	0,40	4,09	33,31	23,87	0,06	0,12	0,05	62,16	70,32	6,66	105,63	97,97
F7	9,80	5,09	0,21	0,02	0,10	3,59	17,23	3,72	0,65	4,44	0,11	10,29	34,86	36,68	0,33	0,06	0,12	65,54	89,42	14,73	127,30	111,62
F8	4,70	7,59	0,34	0,01	0,07	4,11	2,49	1,13	1,05	1,62	0,02	5,65	9,52	36,16	0,02	0,09	0,06	20,91	49,23	7,27	74,64	66,76
F9	7,57	6,49	0,46	0,01	0,09	4,20	3,69	1,57	0,98	2,66	0,02	6,55	8,99	42,67	0,02	0,13	0,05	24,57	56,32	9,21	86,13	76,15
F10	5,54	8,50	0,27	0,02	0,10	6,05	5,06	2,07	2,02	4,06	0,03	7,95	10,17	30,07	0,05	0,10	0,10	26,92	47,31	12,01	82,14	69,47
F11	6,55	9,20	0,19	0,01	0,07	5,99	7,02	3,01	1,06	3,02	0,04	8,07	15,20	41,07	0,07	0,27	0,05	35,02	64,34	11,08	100,86	89,09
F12	10,20	11,69	0,53	0,05	0,05	7,05	3,06	1,02	3,06	3,59	0,01	5,07	8,06	37,10	0,02	0,06	0,04	28,43	51,28	8,66	90,65	81,24
F13	14,08	17,19	0,30	0,02	0,23	1,79	14,33	4,09	0,87	6,29	0,11	7,71	45,85	62,00	0,01	0,06	0,82	76,09	123,04	14,00	175,73	160,18
F14	18,84	13,16	0,14	0,02	0,28	0,76	37,11	12,61	1,28	10,45	0,30	7,75	179,69	142,24	0,11	0,28	0,12	236,67	360,32	18,20	425,14	405,69
F15	15,84	19,70	0,32	0,02	0,26	1,25	14,95	2,92	1,18	9,15	0,09	8,12	47,39	80,83	0,04	0,14	0,16	79,57	144,35	17,27	202,37	184,06
F16	10,66	8,93	0,34	0,03	0,15	3,86	70,67	12,02	1,71	8,30	nd	18,82	67,25	36,93	0,13	0,01	0,17	152,45	176,56	27,12	239,99	212,03
F17	10,60	11,58	0,68	0,03	0,16	5,67	81,23	19,85	2,76	11,39	nd	31,55	122,33	68,03	0,07	0,13	0,03	219,96	274,35	42,94	366,10	322,06
F18	20,81	1,14	0,59	nd ¹	nd	1,16	165,8	nd	71,13	2,33	nd	28,55	60,25	4,69	0,09	35,64	10,12	283,66	321,87	30,88	402,31	324,98
F19	18,48	11,44	0,79	0,02	0,14	5,58	87,69	74,68	2,88	12,22	nd	48,97	134,77	55,35	0,11	0,12	0,02	246,63	280,68	61,19	453,24	387,98
F20	21,59	6,78	0,26	0,01	0,14	1,63	152,35	13,68	1,66	12,94	nd	33,70	38,47	20,67	0,12	0,21	0,03	214,24	213,15	46,65	304,25	255,10
F21	21,84	10,21	1,66	0,08	0,30	9,12	148,00	33,58	nd	9,61	nd	36,15	107,45	32,35	0,16	0,23	0,16	286,63	287,80	45,76	359,92	362,54
F22	11,10	12,08	0,61	0,12	0,15	3,72	63,35	39,78	0,84	14,60	nd	45,32	129,33	75,21	0,34	0,99	0,06	208,50	267,89	59,92	396,76	334,57

Nota: ¹, no detectado; ², fenoles recomendados por el panel de la EFSA (EFSA, 2011); 1, hidroxitirosol; 2, tirosol; 3, ácido vainílico; 4, vainillina; 5, ácido p-cumárico; 6, acetato de hidroxitirosol; 7, forma dialdehídica de decarboximetil aglucona de oleuropeína; 8, acetato de tirosol; 9, forma dialdehídica de decarboximetil aglucona de ligustrósido; 10, ácido cinámico; 11, 1-acetoxipinorresinolforma aldehídica e hidroxílica de aglucona de oleuropeína; 12, forma aldehídica e hidroxílica de aglucona de ligustrósido; 13, ácido o-cumárico; 14, ácido ferúlico; 15, luteolina; 17, apigenina.

Tabla 4. Concentración (mg/kg) de clorofila *a*, feofitina *a* y pirofeofitina *a* de las 38 muestras comerciales.

Código muestra	Variiedad	Categoría	Defecto sensorial	PPPa ⁵	Cl _a (mg/kg)	PPa (mg/kg)	PPPa (mg/kg)
F1	Picual	OVOO ¹	Avinado	3,28	0,02	9,42	0,52
F2	Hojiblanca	VOO ²	Avinado	6,35	0,13	3,72	0,45
F3	Hojiblanca	OVOO	Avinado	3,10	0,19	0,44	0,20
F4	Hojiblanca	OVOO	Moho	7,94	0,13	2,89	0,42
F5	Picual	VOO	Moho	6,33	0,03	6,07	0,60
F6	Picual	OVOO	Moho	6,32	0,17	2,25	0,35
F7	Hojiblanca	OVOO	Moho	5,89	0,20	1,27	0,27
F8	Hojiblanca	OVOO	Atrojado	4,67	0,25	13,87	0,87
F9	Hojiblanca	OVOO	Atrojado	8,07	0,35	2,19	0,38
F10	Picual	OVOO	Atrojado	2,85	1,02	24,29	2,22
F11	Picual	VOO	Atrojado	7,72	0,14	4,44	0,50
F12	Picual	VOO	Atrojado	5,46	0,05	6,90	0,56
F13	Picual	VOO	Madera	2,86	0,16	18,80	0,76
F14	Cornicabra	VOO	Madera	5,67	0,03	9,90	0,79
F15	Cornicabra	VOO	Madera	4,39	0,09	18,64	1,05
F16	Picual	OVOO	Helada	4,47	0,05	13,05	0,98
F17	Picual	VOO	Helada	4,89	0,42	28,07	1,63
F18	Hojiblanca	EVOO ³	-	4,71	0,05	2,60	0,56
F19	Hojiblanca	EVOO	-	5,48	0,14	9,80	0,57
F20	Hojiblanca	EVOO	-	3,86	0,17	0,45	0,10
F21	Hojiblanca-Lechín-Manzanilla	EVOO	-	4,52	0,20	10,98	1,80
F22	Arbequina	EVOO	-	5,98	0,08	3,58	0,54
F23	Arbequina	VOO	Avinado	5,52	0,21	2,64	0,35
F24	Hojiblanca	VOO	Avinado	6,29	0,19	1,25	0,28
F25	Arbequina	VOO	Avinado	5,56	0,02	6,29	0,57
F26	Picual	VOO	Moho	4,56	0,16	3,44	0,36
F27	Picual	VOO	Moho	4,85	0,22	2,60	0,33
F28	Manzanilla	LVOO ⁴	Moho	4,70	0,22	1,51	0,28
F29	Picual	VOO	Moho	6,39	0,02	3,77	0,45
F30	Hojiblanca	VOO	Moho	11,02	0,18	0,99	0,30
F31	Picual	VOO	Moho	23,34	0,11	4,28	1,46
F32	Picual	OVOO	Moho	6,69	0,56	21,40	1,70
F33	Picual	VOO	Moho	6,60	0,12	6,88	0,55
F34	Picual	VOO	Moho	5,01	0,45	4,89	0,35
F35	Picual	VOO	Moho	6,65	0,83	3,49	0,59
F36	Picual	OVOO	Moho	10,25	0,10	17,20	1,18
F37	Picual	LVOO	Helada	4,92	0,05	14,55	0,88
F38	Arbequina-Manzanilla	EVOO	-	9,45	0,05	3,94	0,84

Nota: 1, aceite de oliva corriente, 2, aceite de oliva virgen; 3, aceite de oliva virgen extra; 4, aceite de oliva virgen lampante; ⁵, cálculo según el método propuesto por Gertz y Fiebig (2006a).

Tabla 6. Contenido (porcentaje de área) de 1,2-DAG y 1,3-DAG, y el contenido total de diacilgliceroles en las 38 muestras comerciales.

Código muestra	Variedad	Categoría	Defecto sensorial	1,2DAG%	1,3DAG%	DAG% ⁵	$\Sigma 1,3/\Sigma 1,2$
F1	Picual	OVOO1	Avinado	51,35	48,65	5,60	0,95
F2	Hojiblanca	VOO2	Avinado	50,45	49,55	5,90	0,98
F3	Hojiblanca	OVOO	Avinado	30,80	69,20	9,75	2,25
F4	Hojiblanca	OVOO	Moho	41,50	58,50	6,70	1,41
F5	Picual	VOO	Moho	35,70	64,30	5,07	1,80
F6	Picual	OVOO	Moho	35,80	64,20	5,10	1,79
F7	Hojiblanca	OVOO	Moho	36,30	63,70	7,15	1,75
F8	Hojiblanca	OVOO	Atrojado	64,50	35,50	6,60	0,55
F9	Hojiblanca	OVOO	Atrojado	28,95	71,05	10,86	2,45
F10	Picual	OVOO	Atrojado	37,60	62,40	3,06	1,66
F11	Picual	VOO	Atrojado	65,05	45,80	5,66	0,70
F12	Picual	VOO	Atrojado	40,75	59,25	5,35	1,45
F13	Picual	VOO	Madera	65,25	34,75	4,75	0,53
F14	Cornicabra	VOO	Madera	48,00	52,00	4,80	1,08
F15	Cornicabra	VOO	Madera	52,35	47,65	4,78	0,91
F16	Picual	OVOO	Helada	54,30	45,70	5,95	0,84
F17	Picual	VOO	Helada	60,56	39,47	5,53	0,65
F18	Hojiblanca	EVOO3	-	71,15	28,85	3,70	0,41
F19	Hojiblanca	EVOO	-	63,80	36,20	3,55	0,57
F20	Hojiblanca	EVOO	-	85,95	14,05	2,90	0,16
F21	Hojiblanca-Lechín-Manzanilla	EVOO	-	76,75	23,25	2,15	0,30
F22	Arbequina	EVOO	-	50,00	50,00	2,60	1,00
F23	Arbequina	VOO	Avinado	30,55	69,45	8,65	2,27
F24	Hojiblanca	VOO	Avinado	48,35	51,65	6,10	1,07
F25	Arbequina	VOO	Avinado	28,70	71,30	8,65	2,48
F26	Picual	VOO	Moho	33,05	66,95	7,53	2,03
F27	Picual	VOO	Moho	46,20	53,80	6,10	1,16
F28	Manzanilla	LVOO4	Moho	27,27	72,75	23,10	2,67
F29	Picual	VOO	Moho	46,30	53,70	7,15	1,16
F30	Hojiblanca	VOO	Moho	46,80	53,20	6,00	1,14
F31	Picual	VOO	Moho	49,25	50,75	5,80	1,03
F32	Picual	OVOO	Moho	32,15	67,85	5,65	2,11
F33	Picual	VOO	Moho	66,45	33,55	4,35	0,50
F34	Picual	VOO	Moho	53,75	46,25	7,15	0,86
F35	Picual	VOO	Moho	50,25	49,75	5,00	0,99
F36	Picual	OVOO	Moho	29,90	70,10	4,55	2,34
F37	Picual	LVOO	Helada	47,25	52,75	5,15	1,12
F38	Arbequina-Manzanilla	EVOO	-	36,60	63,40	2,70	0,57

Nota: 1, aceite de oliva corriente, 2, aceite de oliva virgen; 3, aceite de oliva virgen extra; 4, aceite de oliva virgen lampante; ⁵, porcentaje en peso de 1,2-DAG +1,3-DAG presente en la muestra.