



TESIS DOCTORAL

***Desarrollo de Tratamientos
Postcosecha en la Aceituna para
Regular el Amargor del Aceite de
Oliva Virgen***

KHALED YOUSFI

Sevilla 2008

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas o instituciones que de una forma u otra han hecho posible la realización de este trabajo:

Al **Doctor José M^a García Martos**, Director de esta Tesis, por su constante apoyo en todos los aspectos de la investigación, y por su inestimable dedicación en el asesoramiento, consecución y en especial por los innumerables conocimientos aportados. Por sus sugerencias e ideas de las que tanto provecho he sacado. Realmente creo que después de estos años hemos conseguido crear una buena amistad. Gracias José María.

Al **Doctor Antonio Guerrero Conejo** por la tutoría del trabajo

A **D^a M^a del Carmen Martínez Peláez**, por la substancial ayuda prestada durante el desarrollo de todas las técnicas analíticas en el laboratorio, pero sobre todo, por su extremada simpatía y amistad.

A todas las instituciones que me han abierto las puertas para realizar mi proyecto:

Al **Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación de España**, a través de la Agencia Española de Cooperación Internacional por concederme la beca predoctoral.

Al **Proyecto Europeo “Citrisuade. SP5. P12/03”** dentro del Programa Interreg III A (Portugal- España), a través del **Consejo Superior de Investigaciones Científicas** por la beca concedida, como valiosa ayuda financiera para poder finalizar mi Tesis.

A los **Proyectos CAO 01-004** de la Junta Andalucía y **AGL2005-03959** del Plan Nacional de I+D+I –FEDER por haber financiado la investigación realizada en esta Tesis

Al **Director del Instituto de la Grasa, Dr. Francisco Millán Rodríguez**, por facilitarme el acceso permanente a sus laboratorios para poder desarrollar adecuadamente mi proyecto, y en su persona a todos los investigadores, becarios, empleados (administración, recepción y biblioteca) y limpiadoras del centro por vuestro compañerismo y amistad.

A **mis compañeros de piso: Javi, Juan y José** a los que verdaderamente considero como mis otros hermanos y con los que me divierto sin tapujos.

A **mis jefes del ‘Bus turístico’ SEVIRAMA: Mariano Palancar, Pepa, Charo y José Belloso** por vuestro cariño y amistad.

A **mis Padres** por su larga paciencia y su profundo amor, cada uno su manera, creyendo en mi en todo momento y en todo lo que propongo.

A **mis Hermanos y Hermanas** por vuestro cariño y respeto continuo, a los que deseo mucha suerte y felicidad en vuestras vidas.

<u>I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</u>	1
<u>I. 1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DEL CULTIVO DEL OLIVO</u>	1
<u>I. 2. EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN</u>	2
<u>I. 2. 1. Síntesis y acumulación del aceite durante el desarrollo y la maduración de la aceituna</u>	3
<u>I. 2. 2. Evaluación del grado de maduración de la aceituna de molino</u>	5
<u>I. 2. 3. Elaboración del aceite de oliva virgen</u>	7
<u>I. 2. 4. Denominaciones y clasificaciones de los aceites que se obtienen de la aceituna</u>	9
<u>I. 2. 5. Composición química del aceite de oliva</u>	11
<u>I. 2. 5. 1. Fracción saponificable</u>	11
<u>I. 2. 5. 2. Fracción insaponificable</u>	14
<u>I. 2. 5. 2. 1. Tocoferoles</u>	14
<u>I. 2. 5. 2. 2. Derivados fenólicos</u>	14
<u>I. 2. 5. 2. 3. Fitoesteroles</u>	23
<u>I. 2. 5. 2. 4. Hidrocarburos</u>	24
<u>I. 2. 5. 2. 5. Alcoholes terpénicos</u>	24
<u>I. 2. 5. 2. 6. Pigmentos</u>	24
<u>I. 2. 5. 2. 7. Volátiles</u>	25
<u>I. 2. 5. 2. 8. Otros componentes</u>	25
<u>I. 2. 6. Producción, consumo, exportación e importación</u>	25
<u>I. 2. 7. Propiedades dietéticas del aceite de oliva</u>	30
<u>I. 2. 8. La pérdida de calidad, problemática fundamental</u>	31

<u>I. 2. 8. 1.</u> Principales tipos de deterioro del aceite de oliva virgen.....	31
<u>I. 2. 8. 2.</u> Mecanismos responsables de la pérdida de calidad de los aceites de oliva vírgenes.....	31
<u>I. 2. 8. 3.</u> Factores determinantes del deterioro del aceite de oliva virgen.....	33
<u>I. 2. 8. 3. 1.</u> Cambios en la composición y características del aceite durante la maduración.....	33
<u>I. 2. 8. 3. 2.</u> Efecto del riego sobre la calidad del aceite de oliva.....	35
<u>I. 2. 8. 3. 3.</u> Influencia del sistema de cosecha en la calidad del aceite de oliva.....	37
<u>I. 2. 8. 3. 4.</u> Influencia de las condiciones poscosecha en la calidad del aceite de oliva.....	38
<u>I. 2. 8. 4.</u> El adelanto de la campaña, sistema para minimizar el deterioro del aceite.....	40
<u>I. 3. EL PROBLEMA DEL AMARGOR EN EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.....</u>	43
<u>I. 3. 1. Importancia del amargor en el aceite de oliva.....</u>	43
<u>I. 3. 2. Causas del amargor en el aceite de oliva virgen</u>	44
<u>I. 3. 3. Valoración físico-química y sensorial del amargor en el aceite de oliva virgen.....</u>	44
<u>I. 3. 4. Técnicas poscosecha desarrolladas para modificar las características sensoriales de los frutos.....</u>	46
<u>I. 3. 4. 1.</u> Desverdizado de cítricos.....	47
<u>I. 3. 4. 2.</u> Eliminación de astringencia del caqui.....	48
<u>I. 3. 4. 3.</u> Tratamientos poscosecha en la aceituna de molino.....	50
<u>I. 3. 4. 3. 1.</u> Conservación refrigerada.....	50
<u>I. 3. 4. 3. 2.</u> La modificación atmosférica.....	52
<u>I. 4. OBJETIVOS.....</u>	53
<u>II. MATERIAL Y MÉTODOS.....</u>	55
<u>II. 1. MATERIAL BIOLÓGICO.....</u>	55

<u>II. 2.</u> DETERMINACIÓN DEL GRADO DE MADURACIÓN DE LAS ACEITUNAS.....	55
<u>II. 2. 1.</u> Determinación objetiva del color del fruto.....	55
<u>II. 2. 2.</u> Dureza del fruto	55
<u>II. 2. 3.</u> Índice de Madurez.....	56
<u>II. 3.</u> EXTRACCIÓN FÍSICA DEL ACEITE DE OLIVA.....	57
<u>II. 3. 1.</u> Extracción a escala del laboratorio y cálculo del rendimiento graso ‘Abencor’	57
<u>II. 3. 2.</u> Extracción a escala industrial.....	58
<u>II. 4.</u> DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD.....	59
<u>II. 5.</u> EXTRACCIONES QUÍMICAS.....	60
<u>II. 5. 1.</u> Extracción química del contenido total de grasa (Método Soxhlet).....	60
<u>II. 5. 2.</u> Extracción con adición de disolvente previo al triturado.....	61
<u>II. 5. 2. 1.</u> Extracción con hexano.....	61
<u>II. 5. 2. 2.</u> Extracción con la mezcla hexano: isopropanol (3/2, v/v).....	61
<u>II. 6.</u> DESARROLLO DE MÉTODOS OBJETIVOS PARA LA EVALUACIÓN DEL GRADO DE MADUREZ DE LA ACEITUNA.....	62
<u>II. 7.</u> EVOLUCIÓN DE LA CALIDAD, COMPOSICION FENOLICA Y PRESENCIA DEL ATRIBUTO AMARGO EN EL ACEITE DURANTE LA MADURACIÓN DE LA ACEITUNA. INFLUENCIA DE LA PLUVIOMETRÍA.....	62
<u>II. 8.</u> DETERMINACIÓN DEL MOMENTO DE ENTRADA DEL ATRIBUTO AMARGO EN EL ACEITE DE OLIVA.....	63

<u>II. 9. DETERMINACIÓN DE SI LA ENTRADA DEL ATRIBUTO AMARGO AL ACEITE DE OLIVA ESTÀ RELACIONADA CON UNA ACTIVIDAD ENZIMATICA</u>	63
<u>II. 10. TRATAMIENTOS FÍSICOS REALIZADOS SOBRE LA ACEITUNA PARA LA DISMINUCIÓN DEL AMARGOREN EL ACEITE VIRGEN</u>	64
<u>II. 10. 1. Tratamientos térmicos</u>	64
<u>II. 10. 1. 1. Tratamiento en cámaras termostatzadas</u>	64
<u>II. 10. 1. 1. 1. Refrigeración a 5 °C</u>	64
<u>II. 10. 1. 1. 2. Calentamiento en atmósfera de aire</u>	64
<u>II. 10. 1. 1. 3. Calentamiento en atmósfera modificada</u>	65
<u>II. 10. 1. 2. Inmersión en agua caliente</u>	65
<u>II. 10. 1. 2. 1. Tratamientos a escala de laboratorio</u>	66
<u>II. 10. 1. 2. 1. 1. Ensayos preliminares</u>	66
<u>II. 10. 1. 2. 1. 2. Identificación de la temperatura idónea de tratamiento</u>	66
<u>II. 10. 1. 2. 2. Tratamientos térmicos a escala industrial</u>	67
<u>II. 11. ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE CALIDAD DEL ACEITE</u>	68
<u>II. 11. 1. Parámetros físico-químicos</u>	68
<u>II. 11. 1. 1. Determinación del grado de acidez</u>	68
<u>II. 11. 1. 2. Determinación del índice de peróxidos</u>	69
<u>II. 11. 1. 3. Absorción espectrofotométrica en la región ultravioleta</u>	70
<u>II. 11. 1. 4. Estabilidad oxidativa ‘Rancimat’</u>	70
<u>II. 11. 1. 5. Determinación espectrofotométrica del contenido en carotenos y Clorofilas</u>	71
<u>II. 11. 1. 6. Composición en ácidos grasos</u>	72
<u>II. 11. 1. 7. Determinación de la composición y del contenido en esteroides mediante cromatografía de gases con columna capilar</u>	73
<u>II. 11. 1. 8. Determinación del contenido en eritrodiool y uvaol</u>	76
<u>II. 11. 1. 9. Determinación del contenido en ceras mediante cromatografía de gases con columna capilar</u>	77
<u>II. 11. 1. 10. Análisis de compuestos volátiles del aceite de oliva</u>	78
<u>II. 11. 1. 11. Determinación de Tocoferoles por HPLC</u>	79
<u>II. 11. 1. 12. Determinación de fenoles por extracción en fase sólida y cromatografía líquida de alta eficacia</u>	81

<u>II. 11. 2.</u> Valoración sensorial.....	83
<u>II. 12.</u> TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.....	83
<u>III.</u> RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	85
<u>III. 1.</u> DETERMINACIÓN OBJETIVA DEL GRADO DE MADURACIÓN DE LAS ACEITUNAS.....	85
<u>III. 2.</u> EVOLUCIÓN DE LA CALIDAD, COMPOSICION FENOLICA Y PRESENCIA DEL ATRIBUTO AMARGO EN EL ACEITE DURANTE LA MADURACIÓN DE LA ACEITUNA. INFLUENCIA DE LA PLUVIOMETRÍA.....	90
<u>III. 3.</u> DETERMINACIÓN DEL MOMENTO DE ENTRADA DEL ATRIBUTO AMARGO EN EL ACEITE DE OLIVA.....	101
<u>III. 4.</u> IMPLICACIÓN DE UNA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN LA ENTRADA DEL ATRIBUTO AMARGO EN EL ACEITE DE OLIVA.....	102
<u>III. 5.</u> TRATAMIENTOS FÍSICOS REALIZADOS A ESCALA DE LABORATORIO SOBRE LA ACEITUNA PARA LA DISMINUCIÓN DEL AMARGOR EN EL ACEITE VIRGEN.....	103
<u>III. 5. 1.</u> Tratamientos térmicos en cámara.....	103
<u>III. 5. 1. 1.</u> Conservación en frío.....	103
<u>III. 5. 1. 2.</u> Tratamientos de calor mediante transmisión por aire.....	114
<u>III. 5. 1. 3.</u> Tratamientos con atmósfera modificada.....	119
<u>III. 5. 2.</u> Tratamientos térmicos por inmersión.....	125
<u>III. 5. 2. 1.</u> Ensayos preliminares.....	125
<u>III. 5. 2. 2.</u> Condiciones idóneas de tratamiento de la aceituna ‘Picual’.....	130
<u>III. 5. 2. 3.</u> Tratamientos a escala de laboratorio de ajuste para la escala industrial.....	131
<u>III. 5. 2. 4.</u> Tratamientos a escala industrial.....	140
<u>III. 5. 2. 4. 1.</u> Campaña 2002-03.....	140

<u>III. 5. 2. 4. 2.</u> Campaña 2004-05.....	147
<u>III. 5. 2. 4. 3.</u> Campaña 2005-06.....	153
<u>IV.</u> CONCLUSIONES.....	159
<u>V.</u> BIBLIOGRAFÍA.....	163

<u>I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</u>	1
<u>I. 1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DEL CULTIVO DEL OLIVO</u>	1
<u>I. 2. EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN</u>	2
<u>I. 2. 1. Síntesis y acumulación del aceite durante el desarrollo y la maduración de la aceituna</u>	3
<u>I. 2. 2. Evaluación del grado de maduración de la aceituna de molino</u>	5
<u>I. 2. 3. Elaboración del aceite de oliva virgen</u>	7
<u>I. 2. 4. Denominaciones y clasificaciones de los aceites que se obtienen de la aceituna</u>	9
<u>I. 2. 5. Composición química del aceite de oliva</u>	11
<u>I. 2. 5. 1. Fracción saponificable</u>	11
<u>I. 2. 5. 2. Fracción insaponificable</u>	14
<u>I. 2. 5. 2. 1. Tocoferoles</u>	14
<u>I. 2. 5. 2. 2. Derivados fenólicos</u>	14
<u>I. 2. 5. 2. 3. Fitoesteroles</u>	23
<u>I. 2. 5. 2. 4. Hidrocarburos</u>	24
<u>I. 2. 5. 2. 5. Alcoholes terpénicos</u>	24
<u>I. 2. 5. 2. 6. Pigmentos</u>	24
<u>I. 2. 5. 2. 7. Volátiles</u>	25
<u>I. 2. 5. 2. 8. Otros componentes</u>	25
<u>I. 2. 6. Producción, consumo, exportación e importación</u>	25
<u>I. 2. 7. Propiedades dietéticas del aceite de oliva</u>	30
<u>I. 2. 8. La pérdida de calidad, problemática fundamental</u>	31
<u>I. 2. 8. 1. Principales tipos de deterioro del aceite de oliva virgen</u>	31
<u>I. 2. 8. 2. Mecanismos responsables de la pérdida de calidad de los aceites de oliva vírgenes</u>	31
<u>I. 2. 8. 3. Factores determinantes del deterioro del aceite de oliva virgen</u>	33
<u>I. 2. 8. 3. 1. Cambios en la composición y características del aceite durante la maduración</u>	33
<u>I. 2. 8. 3. 2. Efecto del riego sobre la calidad del aceite de oliva</u>	35
<u>I. 2. 8. 3. 3. Influencia del sistema de cosecha en la calidad del aceite de oliva</u>	37
<u>I. 2. 8. 3. 4. Influencia de las condiciones poscosecha en la calidad del aceite de oliva</u>	38
<u>I. 2. 8. 4. El adelanto de la campaña, sistema para minimizar el deterioro del aceite</u>	40

<u>I. 3.</u> EL PROBLEMA DEL AMARGOR EN EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.....	43
<u>I. 3. 1.</u> Importancia del amargor en el aceite de oliva.....	43
<u>I. 3. 2.</u> Causas del amargor en el aceite de oliva virgen	44
<u>I. 3. 3.</u> Valoración físico-química y sensorial del amargor en el aceite de oliva virgen.....	44
<u>I. 3. 4.</u> Técnicas poscosecha desarrolladas para modificar las características sensoriales de los frutos.....	46
<u>I. 3. 4. 1.</u> Desverdizado de cítricos.....	47
<u>I. 3. 4. 2.</u> Eliminación de astringencia del caqui.....	48
<u>I. 3. 4. 3.</u> Tratamientos poscosecha en la aceituna de molino.....	50
<u>I. 3. 4. 3. 1.</u> Conservación refrigerada.....	50
<u>I. 3. 4. 3. 2.</u> La modificación atmosférica.....	52
<u>I. 4.</u> OBJETIVOS.....	53
<u>II.</u> MATERIAL Y MÉTODOS.....	55
<u>II. 1.</u> MATERIAL BIOLÓGICO.....	55
<u>II. 2.</u> DETERMINACIÓN DEL GRADO DE MADURACIÓN DE LAS ACEITUNAS.....	55
<u>II. 2. 1.</u> Determinación objetiva del color del fruto.....	55
<u>II. 2. 2.</u> Dureza del fruto	55
<u>II. 2. 3.</u> Índice de Madurez.....	56
<u>II. 3.</u> EXTRACCIÓN FÍSICA DEL ACEITE DE OLIVA.....	57
<u>II. 3. 1.</u> Extracción a escala del laboratorio y cálculo del rendimiento graso ‘Abencor’.....	57
<u>II. 3. 2.</u> Extracción a escala industrial.....	58
<u>II. 4.</u> DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD.....	59
<u>II. 5.</u> EXTRACCIONES QUÍMICAS.....	60
<u>II. 5. 1.</u> Extracción química del contenido total de grasa (Método Soxhlet).....	60
<u>II. 5. 2.</u> Extracción con adición de disolvente previo al triturado.....	61
<u>II. 5. 2. 1.</u> Extracción con hexano.....	61
<u>II. 5. 2. 2.</u> Extracción con la mezcla hexano: isopropanol (3/2, v/v).....	61

II. 6. DESARROLLO DE MÉTODOS OBJETIVOS PARA LA EVALUACIÓN DEL GRADO DE MADUREZ DE LA ACEITUNA.....	62
II. 7. EVOLUCIÓN DE LA CALIDAD, COMPOSICION FENOLICA Y PRESENCIA DEL ATRIBUTO AMARGO EN EL ACEITE DURANTE LA MADURACIÓN DE LA ACEITUNA. INFLUENCIA DE LA PLUVIOMETRÍA.....	62
II. 8. DETERMINACIÓN DEL MOMENTO DE ENTRADA DEL ATRIBUTO AMARGO EN EL ACEITE DE OLIVA.....	63
II. 9. DETERMINACIÓN DE SI LA ENTRADA DEL ATRIBUTO AMARGO AL ACEITE DE OLIVA ESTÀ RELACIONADA CON UNA ACTIVIDAD ENZIMATICA.....	63
II. 10. TRATAMIENTOS FÍSICOS REALIZADOS SOBRE LA ACEITUNA PARA LA DISMINUCIÓN DEL AMARGOREN EL ACEITE VIRGEN.....	64
II. 10. 1. Tratamientos térmicos.....	64
II. 10. 1. 1. Tratamiento en cámaras termostatzadas.....	64
II. 10. 1. 1. 1. Refrigeración a 5 °C.....	64
II. 10. 1. 1. 2. Calentamiento en atmósfera de aire.....	64
II. 10. 1. 1. 3. Calentamiento en atmósfera modificada.....	65
II. 10. 1. 2. Inmersión en agua caliente.....	65
II. 10. 1. 2. 1. Tratamientos a escala de laboratorio.....	66
II. 10. 1. 2. 1. 1. Ensayos preliminares.....	66
II. 10. 1. 2. 1. 2. Identificación de la temperatura idónea de tratamiento.....	66
II. 10. 1. 2. 2. Tratamientos térmicos a escala industrial.....	67
II. 11. ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE CALIDAD DEL ACEITE.....	68
II. 11. 1. Parámetros físico-químicos.....	68
II. 11. 1. 1. Determinación del grado de acidez.....	68
II. 11. 1. 2. Determinación del índice de peróxidos.....	69
II. 11. 1. 3. Absorción espectrofotométrica en la región ultravioleta.....	70
II. 11. 1. 4. Estabilidad oxidativa ‘Rancimat’.....	70
II. 11. 1. 5. Determinación espectrofotométrica del contenido en carotenos y Clorofilas.....	71
II. 11. 1. 6. Composición en ácidos grasos.....	72
II. 11. 1. 7. Determinación de la composición y del contenido en esteroles mediante cromatografía de gases con columna capilar.....	73
II. 11. 1. 8. Determinación del contenido en eritrodil y uvaol.....	76
II. 11. 1. 9. Determinación del contenido en ceras mediante cromatografía de gases con columna capilar.....	77
II. 11. 1. 10. Análisis de compuestos volátiles del aceite de oliva.....	78
II. 11. 1. 11. Determinación de Tocoferoles por HPLC.....	79
II. 11. 1. 12. Determinación de fenoles por extracción en fase sólida y cromatografía líquida de alta eficacia.....	81
II. 11. 2. Valoración sensorial.....	83

<u>II. 12. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS</u>	83
<u>III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	85
<u>III. 1. DETERMINACIÓN OBJETIVA DEL GRADO DE MADURACIÓN DE LAS ACEITUNAS</u>	85
<u>III. 2. EVOLUCIÓN DE LA CALIDAD, COMPOSICION FENOLICA Y PRESENCIA DEL ATRIBUTO AMARGO EN EL ACEITE DURANTE LA MADURACIÓN DE LA ACEITUNA. INFLUENCIA DE LA PLUVIOMETRÍA</u>	90
<u>III. 3. DETERMINACIÓN DEL MOMENTO DE ENTRADA DEL ATRIBUTO AMARGO EN EL ACEITE DE OLIVA</u>	101
<u>III. 4. IMPLICACIÓN DE UNA ACTIVIDAD ENZIMATICA EN LA ENTRADA DEL ATRIBUTO AMARGO EN EL ACEITE DE OLIVA</u>	102
<u>III. 5. TRATAMIENTOS FÍSICOS REALIZADOS A ESCALA DE LABORATORIO SOBRE LA ACEITUNA PARA LA DISMINUCIÓN DEL AMARGOR EN EL ACEITE VIRGEN</u>	103
<u>III. 5. 1. Tratamientos térmicos en cámara</u>	103
<u>III. 5. 1. 1. Conservación en frío</u>	103
<u>III. 5. 1. 2. Tratamientos de calor mediante transmisión por aire</u>	114
<u>III. 5. 1. 3. Tratamientos con atmósfera modificada</u>	119
<u>III. 5. 2. Tratamientos térmicos por inmersión</u>	125
<u>III. 5. 2. 1. Ensayos preliminares</u>	125
<u>III. 5. 2. 2. Condiciones idóneas de tratamiento de la aceituna ‘Picual’</u>	130
<u>III. 5. 2. 3. Tratamientos a escala de laboratorio de ajuste para la escala industrial</u>	131
<u>III. 5. 2. 4. Tratamientos a escala industrial</u>	140
<u>III. 5. 2. 4. 1. Campaña 2002-03</u>	140
<u>III. 5. 2. 4. 2. Campaña 2004-05</u>	147
<u>III. 5. 2. 4. 3. Campaña 2005-06</u>	153
<u>IV. CONCLUSIONES</u>	159
<u>V. BIBLIOGRAFÍA</u>	163

I. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

I. 1. ORIGEN Y DISTRIBUCIÓN DEL CULTIVO DEL OLIVO

La historia del olivo es la historia del Mediterráneo. Ha sido el cultivo común de toda su cuenca y sus frutos han recorrido todas sus orillas y todas sus rutas. A través de los tiempos, el olivo siempre ha estado vinculado con lo divino y lo sobrenatural, aunque en permanente contacto con el ser humano, para beneficiarle en todos los sentidos.

El olivo (*Olea europaea* L.), al parecer originario de Siria, es un árbol citado en numerosas ocasiones en la Biblia (la ramita de la paloma en el arca de Noé) y en el Corán, donde se le considera como un árbol celestial. Al estudiar el olivo encontramos poderosas razones que nos hacen pensar en las estrechas relaciones socioculturales existentes entre las tres grandes religiones monoteístas del planeta: cristianismo, islamismo y judaísmo. El origen de las mismas, no es fruto de la casualidad, tiene el mismo escenario geográfico: el extremo oriental de la cuenca mediterránea, donde podemos situar la zona originaria del olivo, en el sur del Cáucaso, la meseta de Irán, Siria y Palestina. No es de extrañar por tanto, las continuas referencias al olivo y al aceite de oliva que aparecen en sus textos sagrados, las cuales se cuentan por decenas. Para la civilización griega el olivo era relacionado con la vida, la paz, la victoria y la fertilidad, siendo junto a la higuera los dos árboles del Paraíso Terrenal de la mitología clásica. Fenicios y griegos contribuyeron a la introducción del olivo en la Península Ibérica, mientras que los romanos se encargaron de extender por la misma su cultivo y mejoraron las técnicas de producción de aceite (Schäfer-Schuchardt, 1996).

Posteriormente los árabes perfeccionaron las técnicas de obtención de aceite y lo consideraron como un cultivo y producto imprescindible para la vida social y económica de los habitantes de la península. Tan estrecha fue su vinculación con esta grasa que la palabra española "aceite" proviene del árabe "az-zait" que significa jugo de aceituna. En el mundo árabe se comercializaban tres diferentes tipos de aceites que nos recuerdan a los que usamos actualmente:

- El aceite de agua (obtenido tras dejar decantar el líquido obtenido después de lavar con agua caliente las aceitunas trituradas en el molino, sin ningún otro tratamiento).
- El aceite de almazara (obtenido tras el prensado de la pasta de aceituna molida).
- El aceite cocido (a partir del orujo de la primera presión que se lavaba con agua caliente y se volvía a prensar).

El olivo fue llevado al "Nuevo Mundo" por los españoles durante los siglos XVI y XVII. Ahora puede encontrarse en California y en distintas partes de Suramérica. Finalmente,

en el siglo pasado, este cultivo se ha extendido a Suráfrica, China y Australia, en donde ha conseguido una perfecta adaptación.

El olivo prospera esencialmente en la zona de clima mediterráneo, caracterizada por inviernos dulces, primaveras y otoños lluviosos, veranos secos y cálidos y una permanente luminosidad intensa. Es la especie autóctona más característica de la Cuenca Mediterránea. Tanto en el hemisferio Norte como en el Sur, su zona de distribución se sitúa entre los paralelos correspondientes a los 30 y 45 grados. Es cierto que el olivo crece en cualquier parte, pero su fructificación se ve afectada por el exceso o falta de temperatura durante la estación fría.

En el mundo se contabilizan alrededor de 9,5 millones de hectáreas de olivos (960 millones de pies de olivos plantados), encontrándose el 98 % de esta superficie en la Cuenca del Mediterráneo. En dicha Cuenca se concentra el 82 % del consumo mundial y el 93 % de la producción de aceite de oliva. España, Italia, Grecia y Túnez concentran la mayor parte de dicha producción, proveniente de 5,4 millones de hectáreas de huertos olivareros dedicados tanto a aceite como a oliva de mesa. Aunque España, Italia y Grecia son los principales productores y exportadores mundiales de aceite de oliva, afrontan actualmente serias dificultades, tanto para mantener, como para expandir competitivamente su olivicultura, debido a un alto costo de la mano de obra, las limitaciones de agua de riego y a un fuerte tradicionalismo empresarial, reacio a la introducción de innovaciones tecnológicas. En la **Tabla 1** se muestra de manera pormenorizada la distribución del número de olivos y la superficie empleada en este cultivo en los distintos países del mundo.

I. 2. EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

El aceite de oliva virgen es el zumo oleoso de la aceituna, que se obtiene por sistemas de elaboración exclusivamente físicos y procede de frutos frescos de buena calidad, sin defectos ni alteraciones y con la adecuada madurez. Posee excepcionales características de aspecto, fragancia y sabor, y es, prácticamente, el único entre los aceites que puede consumirse crudo, conservando íntegro su contenido en vitaminas, ácidos grasos esenciales y otros productos naturales de importancia dietética.

Tabla 1.- Distribución geográfica del olivo en el mundo. Fuente: COI, 2004.

País	Número de olivos (miles)	Superficie (ha)
Argelia	16.700	168.000
Angola	40	400
Libia	8.000	197.000
Marruecos	58.000	550.000
Egipto	4.500	47.000
Túnez	63.700	1.580.000
África del Sur	200	2.000
Argentina	6.000	45.000
Brasil	100	1.000
Chile	560	6.000
Estados Unidos	1.750	14.500
Méjico	1.000	12.500
Perú	560	5.605
Uruguay	316	1000
Afganistán	1.000	-
China	1.600	10.000
Chipre	2.200	9.500
Irak	750	10.000
Irán	380	5.355
Israel	2.200	20.000
Jordania	10.000	100.000
Líbano	8.000	50.000
Palestina	10.500	85.000
Siria	54.500	480.000
Turquía	68.000	595.000
España	308.700	2.424.000
Francia	2.500	39.500
Grecia	120.000	1.026.000
Italia	160.000	1.431.000
Portugal	35.000	529.000
Albania	5.500	45.000
Malta	23	200
Serbia y Montenegro	500	3.600
Croacia	2.600	19.000
Eslovenia	150	1.000
Australia	1.900	18.700
Nueva Zelanda	230	2.300
Total Mundial	957.559	9.534.160
Cuenca del Mediterráneo	942.343	9.415.555

I. 2. 1. Síntesis y acumulación del aceite durante el desarrollo y la maduración de la aceituna

Desde la fecundación hasta su madurez el fruto atraviesa una serie de etapas según una pauta precisa y predeterminada. El crecimiento de la aceituna, como el de cualquier otra drupa, se ajusta a una doble sigmoide que permite distinguir tres fases. Durante la primera fase contribuye al crecimiento tanto la división como la expansión celular. Esta fase concluye

aproximadamente con el final del endurecimiento del endocarpio, que sucede entre unas 7 y 9 semanas después de la floración (mes de julio) (Rallo-Cuevas, 2004). Durante la segunda fase, el crecimiento del hueso se hace más lento, el embrión y el endocarpio alcanzan su tamaño final, terminando el endurecimiento del hueso. La tercera fase está caracterizada por un crecimiento rápido del fruto debido al ensanchamiento de las células del mesocarpio, que determina el tamaño final del fruto. Es durante esta fase cuando comienza a producirse la biosíntesis del aceite y su acumulación en las células parénquimáticas de la pulpa (lipogénesis). La disponibilidad de agua en esta fase determina el tamaño final del fruto y su contenido en aceite. Tras la tercera fase, el crecimiento del fruto y la acumulación de aceite se reducen de forma notable llevándose a cabo los procesos de maduración (Beltrán et al., 2004). Es decir, que la cantidad de aceite en las aceitunas alcanza el techo al comienzo de su maduración (Rallo y Cuevas, 2004).

La formación de ácidos grasos sigue una ruta bioquímica que utiliza como sustratos o precursores acetil-CoA y malonil-CoA. La biosíntesis de los ácidos grasos se lleva a cabo en los plastidios, mediante una serie de reacciones de condensación de unidades de acetato, suministrados por el malonil-CoA, produciéndose una descarboxilación en cada proceso de condensación, hasta llegar a la formación del ácido palmítico que contiene 16 átomos de carbono, es lo que se denomina “síntesis de novo”, actuando como transportador de acilos el ACP (proteína transportadora de acilos). El palmitil-ACP es finalmente alargado, dando estearil-ACP y éste a su vez es desaturado, formando oleil-ACP. Todos estos ácidos grasos son liberados al citoplasma en forma de acil-CoAs, de donde son tomados por el retículo endoplasmático, en donde pueden sufrir nuevas desaturaciones, formando linoleico o linolénico, o bien esterificar los diferentes grupos hidroxilo del esqueleto de la glicerina, dando diferentes glicerolípidos. Es así como se forman los triacilgliceroles (TG), constituyentes mayoritarios del aceite (García et, 1988, Beltrán et al., 2004). Los TG se acumulan en la zona lipofílica de la doble membrana del retículo endoplasmático, provocando su separación (**Figura 1**). Con el acumulo de TG se produce el colapso de la media membrana y su separación del retículo endoplasmático, quedando formado un nuevo orgánulo, el oleosoma, rodeado sólo por una monocapa de fosfolípidos, que se va haciendo cada vez más dispersa conforme aumenta su tamaño por la continua acumulación de más TGs, hasta que prácticamente se difumina y desaparece. Se observan entonces pequeñas gotas de aceite no separadas del citoplasma por ningún tipo de membrana. Luego las gotas se van fusionando, hasta formar una sola que ocupa la mayor parte de la célula (Lavee y Wodner, 1991; Zarrouk et al., 1996; Alegre, 2001). Como ya se ha dicho, la biosíntesis del aceite contenido en la

aceituna se produce básicamente durante el crecimiento de la misma en los meses de verano y principios de otoño, pero, una vez que la aceituna ya ha alcanzado su tamaño definitivo y comienza su cambio de coloración, la acumulación de aceite es muy limitada, dado que la actividad de síntesis prácticamente ha desaparecido a mediados de Octubre (García y Mancha, 1992).

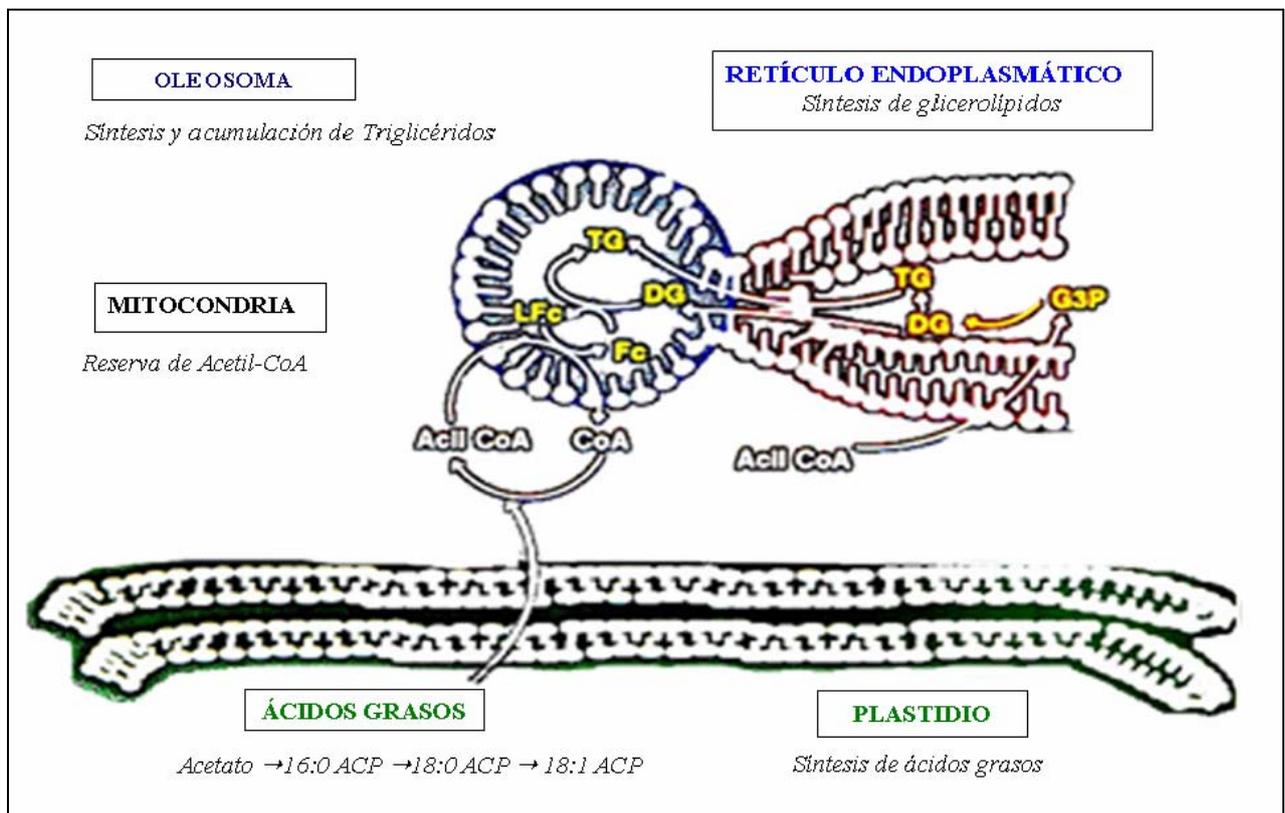


Figura 1.- Esquema de la biosíntesis lipídica en el interior de la célula vegetal.
Fuente: García, (1988).

I. 2. 2. Evaluación del grado de maduración de la aceituna de molino

Para la obtención de un aceite de oliva de calidad es imprescindible disponer de frutos con un grado de maduración óptima. Es preciso, pues, seleccionar el momento idóneo de cosecha. Algunos de los cambios que se producen durante el desarrollo del fruto se pueden utilizar como indicadores más o menos específicos de su grado de maduración. Así, puede considerarse la respiración del fruto (Maxie et al., 1960; Ranalli et al., 1997), el contenido en lípidos en la drupa (Catalano y Sciancalepore, 1965), la evolución de la composición en ácidos grasos (Leone y Vitagliano, 1975), la variación del contenido en ácidos orgánicos de hojas y frutos (Donaire et al., 1975), particularmente la relación málico/cítrico (Vlahov, 1976), la variación del contenido en hierro como metabolizante de las hormonas de abscisión

(Vioque y Albi, 1975), la evolución del contenido y composición de los polifenoles (Vázquez-Roncero et al., 1971) o el contenido en materia seca (Mickelbart y James, 2003). Sin embargo, la más empleada en la industria consiste en una evaluación visual de la variación del color externo e interno del fruto, estableciendo el índice de madurez (IM) como medida de la maduración (Uceda y Hermoso, 1998). La zona geográfica, las condiciones climáticas, la carga del árbol, las características de cada variedad y el manejo de cultivo afectan de forma variable a la velocidad de maduración de la aceituna.

El estudio realizado por Barranco et al. (1998) sobre las épocas de maduración de 130 variedades de olivo incluidas en la Colección Mundial de Cultivares de Olivo de Córdoba muestra que las fechas de final del enverado varían entre años, desde el 30 de octubre y el 25 de noviembre, para la mayor parte de las variedades de la colección. La duración de la maduración osciló entre 53 y 69 días según los años, considerando como período de maduración al transcurrido desde que comienza el cambio del color externo del fruto (envero) hasta que el color negro o violáceo, característico según el cultivar, se generaliza en la epidermis. Desde el punto de vista de la producción de aceite, este cambio de la coloración externa del fruto representa una etapa muy significativa en la maduración de la aceituna, pues marca el momento en que se detiene o reduce al mínimo el proceso de su síntesis (Lavee y Wodner, 1991; García y Mancha, 1992).

Hasta ahora los métodos ideados para la evaluación del grado de maduración de la aceituna o bien requieren su destrucción y un análisis en el laboratorio, o bien están sometidos a la subjetividad de una valoración visual de los cambios de color que experimenta su epidermis. No es fácil distinguir, por ejemplo, entre colores muy parecidos como el verde pálido y el verde amarillento o entre morado oscuro y el negro. Además, no sería muy acertado considerar de un mismo grado de maduración una aceituna verde de finales de Agosto con otra de finales de Octubre, aunque aparentemente bajo el ojo humano exhiban la misma pigmentación. Por otra parte variedades como ‘Blanqueta’ o ‘Verdial’ son difícilmente evaluables, siguiendo los criterios establecidos, pues la primera sufre una decoloración previa al envero y la segunda mantiene su pigmentación inicial hasta casi el final de su proceso madurativo. Para una más correcta y objetiva evaluación de este proceso, a fin de disponer de un mayor criterio en la selección del momento idóneo de cosecha, sería conveniente desarrollar métodos de cuantificación objetiva, que no impliquen el uso de análisis costosos o la forzosa cosecha del fruto.

En otros frutos, como las naranjas (Olmo et al., 2000), peras y nectarinas (Luchsinger y Walsh, 1998) y en tomates (Choi et al., 1995) se han desarrollado métodos objetivos de

estimación del grado de maduración, evaluando la textura (por un densímetro de mano) o el color (mediante colorimetría de reflexión).

La resistencia a la penetración es uno de los métodos más comúnmente utilizados para evaluar la maduración de los frutos, dado que durante la misma se produce indefectiblemente un ablandamiento de éstos, por la acción de enzimas como las celulasas o poligalacturonasas que debilitan las paredes celulósicas de las células vegetales y cuya actividad se desarrolla durante este proceso (Soda et al., 1987; Muramatsu et al., 1996). El uso del densímetro de mano permite evaluar la textura del fruto, sin requerir la perforación de la piel, por lo que puede ser determinada sin necesidad de ser siquiera cosechado. Este sistema ya ha sido empleado para evaluar el grado de deterioro de la aceituna de molino durante su almacenamiento refrigerado y su reducción coincide con el deterioro de la calidad del aceite posteriormente extraído de la misma (García et al., 1996a; 1996b).

Durante la maduración, los productos vegetales cambian de color por degradación de su clorofila y por el desarrollo, en su lugar, de carotenoides y/o polifenoles. La relación entre el color de estos productos y el nivel de maduración ha sido estudiada en diferentes frutos como tomates, peras o nectarinas. Jiménez-Cuesta et al. (1981) propusieron la fórmula $1000 a^*/(L^*b^*)$ como índice de color para visualizar objetivamente la evolución del desverdizado de los cítricos. En la misma línea, Mercado-Silva et al. (1998), utilizando los parámetros cromáticos L^* , a^* y b^* , consiguieron diferenciar las diferentes etapas de la maduración de la guava. En aceitunas también ha sido empleado el color para visualizar su desverdizado durante su conservación en frío. Así, García y Streif (1991) propusieron la fórmula cromática b^*-a^* para la aceituna ‘Gordal’ y posteriormente Castellano et al. (1993) la modificaron introduciendo también la variable correspondiente al brillo ($L^*(b^*-a^*)/100$) para monitorizar el cambio de color de la variedad ‘Picual’ durante su almacenamiento en frío.

Hasta el momento del desarrollo de esta Tesis no se habían hallado datos que indicaran que se hubiese comprobado previamente una posible relación entre estos métodos objetivos y la evolución del proceso madurativo de la aceituna de molino.

I. 2. 3. Elaboración del aceite de oliva virgen

La aceituna alcanza su madurez al empezar el otoño, pero no se comienza a cosechar para molino hasta finales de Noviembre, pudiéndose prolongar la campaña hasta el mes de Marzo para las variedades más tardías. Los métodos de cosecha deben evitar el deterioro del fruto, pues, siendo el aceite de oliva virgen un auténtico “zumo de fruta”, su calidad va a depender de la integridad fisiológica de la aceituna de donde se extrae. Posteriormente, las

aceitunas son trasladadas a la almazara o molino para su trituración y prensado. Las aceitunas que llegan a las almazaras llevan un apreciable porcentaje de materias extrañas, como tierra, piedras, hojas, maderas, hierbas, etc. Para poder obtener aceites de calidad y evitar la interferencia de estos productos en las características organolépticas y el desgaste de la maquinaria, es indispensable eliminar todos los cuerpos extraños con ventiladores y lavadoras. A continuación, para liberar la materia oleosa de los tejidos en donde se aloja, se muelen las aceitunas de manera uniforme. Para ello, se utilizan diversos procedimientos, el más clásico consiste en el empleo de molinos de rulos o “empiedros”, que van siendo remplazados por molinos metálicos, usualmente de martillos. En estos últimos el grado de molienda es regulable, seleccionando el diámetro de los orificios de las cribas. Debe ser más pequeño para aceitunas de principio de campaña y mayor conforme más avanzado sea el grado de maduración del fruto. El proceso continúa con un batido de la pasta formada para facilitar la posterior separación de las fases que constituyen la pasta. Las gotitas dispersas de aceite liberadas en la molienda coalescen durante este proceso, aumentando su tamaño. La realización de este cometido se acelera con la temperatura, por lo que las batidoras poseen un sistema de calefacción. Sin embargo, el aumento de temperatura conlleva el riesgo de deterioro oxidativo, con pérdida de calidad del aceite, por lo que no se recomienda el uso de una temperatura superior a los 35 °C. El exceso de la velocidad de batido induce la formación de emulsiones, que son luego imposibles de romper por métodos exclusivamente físicos, especialmente en las pastas difíciles, por lo que se recomiendan velocidades relativamente lentas (15-20 rpm). El tiempo de batido es otro factor determinante de la calidad futura del aceite, pues un exceso del mismo facilita la acción oxidativa del aire, el desarrollo de actividades enzimáticas que alteran al producto (lipasas, lipoxigenasas, polifenol oxidasas o glucosidasas, etc.) y la pérdida de componentes aromáticos. Se recomienda el empleo de 50 a 60 minutos, si la molienda se ha realizado con molino de martillos, y sólo de 20 a 30 minutos, si se ha empleado el “empiedro”. A continuación la pasta se prensa, en el sistema clásico, o se centrifuga en un decánter (centrífuga horizontal), en el sistema moderno, para separar la fase líquida de la sólida. El sistema moderno, a su vez, admite dos posibilidades: La separación en tres fases, correspondientes a dos fases líquidas, una oleosa y otra acuosa (alpechín), y una tercera fase sólida (orujo) y el fraccionamiento en sólo dos fases, una líquida oleosa y otra sólida más húmeda (alperujo), que contiene al mismo tiempo el orujo y el alpechín. La utilización del sistema de dos fases presenta entre otras ventajas la reducción de los vertidos contaminantes, por lo que es muy apreciado desde el punto de vista de la conservación del medio ambiente. Sin embargo, los aceites obtenidos con este sistema presentan una mayor

intensidad en el atributo amargo. Por tanto, la posibilidad de desarrollar un sistema que permita reducir la presencia de este atributo en el aceite sería especialmente interesante para las industrias que utilizan este método de extracción. Posteriormente, en el sistema clásico se procede a la decantación, para separar la fase oleosa del alpechín por su distinta densidad, mientras que en el moderno se usa una segunda centrifugación de la fase oleosa con centrífugas verticales, que separan con mayor eficacia el aceite del alpechín en el sistema de tres fases y del agua de lavado en el de dos. Se obtiene así, finalmente, un aceite de oliva virgen que puede ser almacenado para su posterior comercialización (Alba et al., 1998).

I. 2. 4. Denominaciones y clasificaciones de los aceites que se obtienen de la aceituna

A continuación se citan las diferentes denominaciones de los aceites que se pueden obtener de la aceituna, con la definición correspondiente a cada denominación (Reglamento CEE nº 2568/91, modificado por el CE 1989/2003).

I. El aceite de oliva es el aceite procedente únicamente del fruto del olivo (*Olea europaea* L.), con exclusión de los aceites obtenidos mediante disolventes o procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza. Se comercializará según las denominaciones y definiciones siguientes:

A. Aceites de Oliva Vírgenes: aceites obtenidos del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos o por otros procedimientos físicos en condiciones, especialmente térmicas, que no produzcan la alteración del aceite, que no hayan tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado. Se clasifican y denominan de la siguiente forma:

a) Aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo:

i) **aceite de oliva virgen extra:** aceite de oliva virgen cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,8 g por 100 g y cuyas demás características corresponden a las previstas para esta categoría,

ii) **aceite de oliva virgen:** aceite de oliva virgen cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 2,0 g por 100 g y cuyas demás características corresponden a las previstas para esta categoría,

iii) **aceite de oliva virgen corriente:** aceite de oliva virgen cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 3,3 g por 100 g y cuyas demás características corresponden a las previstas para esta categoría (1);

b) aceite de oliva virgen no apto para el consumo:

Aceite de oliva virgen lampante: aceite de oliva virgen cuya acidez libre expresada en ácido oleico es superior a 3,3 g por 100 g y/o cuyas características organolépticas y demás características corresponden a las previstas para esta categoría. Se destina al refinado con vistas al consumo humano o a usos técnicos;

B. Aceite de Oliva Refinado: aceite de oliva obtenido por refinación de aceites de oliva vírgenes. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,3 g por 100 g, y sus demás características corresponden a las previstas para esta categoría (2).

C. Aceite de Oliva: aceite constituido por una mezcla de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo en la forma en que se obtienen. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 1 g por 100 g, y sus demás características corresponden a las previstas para esta categoría (3).

II. El aceite de orujo de oliva es el aceite obtenido por tratamiento con disolventes u otros procedimientos físicos de los orujos de oliva, con exclusión de los aceites obtenidos mediante procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza. Engloba las siguientes denominaciones:

A. Aceite de orujo de oliva crudo: aceite de orujo de oliva cuyas características son las previstas para esta categoría. Se destina al refinado con vistas al consumo humano o a usos técnicos.

B. Aceite de orujo de oliva refinado: aceite obtenido por el refinado del aceite de orujo de oliva crudo. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,3 g por 100 g y sus demás características corresponden a las previstas para esta categoría (1).

C. Aceite de orujo de oliva: aceite constituido por una mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo en la forma en que se

obtienen. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 1 g por 100 g y sus demás características corresponden a las previstas para esta categoría. Esta mezcla no podrá en ningún caso denominarse «aceite de oliva» (2).

(1) Este producto sólo puede ser vendido directamente al consumidor si está permitido en el país de venta al por menor. De no estarlo, la denominación de este producto se ajustará a las disposiciones legales del país en cuestión.

(2) Este producto sólo puede ser vendido directamente al consumidor si está permitido en el país de venta al por menor.

(3) El país de venta al por menor puede exigir una denominación más precisa.

I. 2. 5. Composición química del aceite de oliva

La composición química del aceite de oliva permite conocer su valor potencial como nutriente y, en definitiva, es la responsable de todas las propiedades características que lo hacen más o menos apetecible al consumidor. Los componentes del aceite de oliva suelen dividirse en una fracción saponificable y en otra insaponificable. La primera, que constituye el 97-99 % del total del aceite (Montedoro y Garofalo, 1984), está integrada por una mezcla de diferentes glicerolípidos y ácidos grasos libres. La segunda la componen una serie de sustancias muy diversas no glicerídicas, denominadas componentes menores del aceite de oliva. Si bien la proporción de estos últimos elementos en el aceite es muy minoritaria (1-3 %), revisten una gran importancia, tanto desde el punto de vista nutricional, como en la estabilidad y la calidad sensorial del aceite. De hecho, debido a su alta especificidad, estos componentes secundarios se utilizan como criterio de autenticidad del aceite de oliva (**Tabla 2**).

I. 2. 5. 1. Fracción saponificable

Está formada por una mezcla de triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos y, en menor medida, fosfolípidos (los ésteres naturales de ácidos grasos y de un derivado fosfatado de la glicerina), las ceras y los ésteres de esteroides, siendo el primero de todos el componente fundamental del aceite, pudiendo representar el 90 % en peso de esta fracción (Cert, 1998).

Tabla 2- Límites establecidos para las distintas categorías de aceite de oliva según el Reglamento CE nº 1989/03. M = Máximo; m = mínimo.

Categoría	Acidez % oleico	I. Peróxidos meq/O ₂ /kg	Solventes Halogenados mg/kg	Ceras mg/kg	A. Grasos Saturados posic. 2 en triglic.%	Estigmas- tadieno mg/kg	Eritroidol + Uvaol %	Trilinoleín a %	Colesterol %	Brassi- Casterol %	Campesterol %	Estigmas- terol	β- Sitosterol %	Δ-Estig- masterol %
											< Camp.	m 93,0	M 0,5	
1. Virgen Extra	M 0,8	M 20	M 0,20	M 250	M 1,5	M 0,15	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,1	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5
2. Virgen	M 2,0	M 20	M 0,20	M 250	M 1,5	M 0,15	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,1	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5
3. Virgen corriente	M 3,3	M 20	M 0,20	M 250	M 1,5	M 0,15	M 4,5		M 0,5	M 0,1	M 4,0	< Camp.		
4. Virgen Lampante	m 3,3	---	M 0,20	M 350	M 1,5	M 0,50	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,1	M 4,0	---	m 93,0	M 0,5
5. Refinado	M 0,3	M 5	M 0,20	M 350	M 1,8	---	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,1	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5
6. Aceite de Oliva	M 1,0	M 15	M 0,20	M 350	M 1,8	---	M 4,5	M 0,5	M 0,5	M 0,1	M 4,0	< Camp.	m 93,0	M 0,5
7. Orujo Crudo	---	---	---	> 350	M 2,2	---	m 12	M 0,7	M 0,5	M 0,1	M 4,0	---	m 93,0	M 0,5
8. Orujo Refinado	M 0,3	M 5	M 0,20	> 350	M 2,2	---	m 12	M 0,6	M 0,5	M 0,1	M 4,0	<Camp.	m 93,0	M 0,5
9. Orujo de Oliva	M 1,0	M 15	M 0,20	>350	M 2,2	---	> 4,5	M 0,6	M 0,5	M 0,1	M 4,0	<Camp.	m 93,0	M 0,5
Categoría	Esteroles totales mg/kg	Contenido de ácidos grasos						Σ Isómeros transoleicos %	Σ Isómeros Translinoleicos y Translinolénicos (%)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	K270 después de pasar por alúmina +	ΔK	Panel Test
		Mirístico %	Linoleic %	Araquíd %	Eicosonoico %	Behénico %	Lignocérico %							
1. Virgen Extra	m 1000	M 0,05	M 1,0	M 0,6	M 0,4	M 0,2	M 0,2	M 0,05	M 0,05	M 2,50	M 0,22	M 0,10	M 0,01	m 6,5
2. Virgen	m 1000	M 0,05	M 1,0	M 0,6	M 0,4	M 0,2	M 0,2	M 0,05	M 0,05	M 2,60	M 0,25	M 0,10	M 0,01	m 5,5
3. Virgen corriente		M 0,05	M 1,0	M 0,6	M 0,4	M 0,2	M 0,2	M 0,05	M 0,05	M 2,60	M 0,25	M 0,10	M 0,01	m 3,5
4. Virgen Lampante	m 1000	M 0,05	M 1,0	M 0,6	M 0,4	M 0,2	M 0,2	M 0,10	M 0,10	M 3,70	---	M 0,11	---	< 3,5
5. Refinado	m 1000	M 0,05	M 1,0	M 0,6	M 0,4	M 0,2	M 0,2	M 0,20	M 0,30	M 3,40	M 1,10	---	M 0,16	---
6. Aceite de Oliva	m 1000	M 0,05	M 1,0	M 0,6	M 0,4	M 0,2	M 0,2	M 0,20	M 0,30	M 3,30	M 0,90	---	M 0,15	---
7. Orujo Crudo	m 2500	M 0,05	M 1,0	M 0,6	M 0,4	M 0,3	M 0,2	M 0,20	M 0,10	---	---	---	---	---
8. Orujo Refinado	m 1800	M 0,05	M 1,0	M 0,6	M 0,4	M 0,3	M 0,2	M 0,40 ¹	M 0,35	M 5,50	M 2,00	---	M 0,20	---
9. Orujo de Oliva	m 1600	M 0,05	M 1,0	M 0,6	M 0,4	M 0,3	M 0,2	M 0,40	M 0,35	M 5,30	M 1,70	---	M 0,18	---

Los triglicéridos son sustancias con un alto contenido energético, ya que aportan 9 kcal/g y básicamente desempeñan una función de almacenamiento o reservorio energético. Los triglicéridos que se hallan en mayor proporción en el aceite de oliva son aquéllos que contienen tres moléculas de oleico (40-60 %), dos de oleico y una de palmítico (12-20 %), de linoleico (12,0 %) o de esteárico (3-7 %) y, finalmente, el triglicérido formado por una molécula de palmítico, oleico y linoleico (5-7 %). En los lípidos de origen vegetal, como es el caso del aceite de oliva, los ácidos grasos saturados, como el palmítico o el esteárico, raramente ocupan la posición 2 del triglicérido, siendo esta característica una de las bases del reconocimiento de la presencia de aceites de origen animal, en donde esta especificidad no se da.

En el aceite de oliva hay cinco ácidos grasos mayoritarios (oleico, palmítico, palmitoleico, esteárico y linoleico) y otros presentes en cantidades más pequeñas (linolénico, mirístico, margárico, margaroleico, araquídico, behénico, lignocérico y gadoleico), que tienen establecido un límite máximo para detectar mezclas fraudulentas (Boskou, 1996) (**Tabla 3**).

Tabla 3.- Porcentaje de ácidos grasos en el aceite de oliva (porcentajes por cromatografía de gases).
Fuente: Comisión del Codex Alimentarius (1993)

Ácidos grasos	Acrónimo	Limites
Mirístico	C 14:0	0,0 – 0,1
Palmítico	C 16:0	7,5 – 20,0
Palmitoleico	C 16:1	0,3 – 3,5
Heptanodecanoico	C 17:0	0,0 – 0,5
Heptanodecenoico	C 17:1	0,0 – 0,6
Esteárico	C 18:0	0,5 – 5,0
Oleico	C 18:1	55,0 – 83,0
Linoleico	C 18:2	3,5 – 21,0
Linolénico	C 18:3	0,0 – 1,5
Araquidónico	C 20:0	0,0 – 0,8
Eicosanoico	C 20:1	No especificado
Behénico	C 22:0	0,0 – 0,2
Lignocérico	C 24:0	0,0 – 1,0

La composición de los ácidos grasos del aceite de oliva está influenciada por numerosos factores, entre los que destacan: latitud, clima (sequía), variedad, época de recolección, grado de madurez de las aceitunas, etc. (Tiscornia et al., 1982; García Olmedo et al., 1989). Debido a estas causas, los ácidos grasos mayoritarios pueden presentar variaciones en sus porcentajes según campañas y zonas de producción (Civantos et al., 1992). Podemos definir el aceite de oliva como aceite rico en ácidos monoinsaturados (oleico) y de bajo

contenido en poliinsaturados (linoleico y linolénico). Los porcentajes de oleico y de linoleico, y la relación entre ambos, son parámetros que pueden clasificar diferentes tipos de aceites de oliva. A mayor valor de la relación, mayor será su estabilidad (resistencia al enrancimiento). Los ácidos grasos se presentan en estado líquido a una temperatura que depende de la longitud y de la insaturación de la cadena de carbonos. A mayor longitud y menor insaturación, más elevado es su punto de fusión. Los dobles enlaces son puntos vulnerables de los aceites, por ser susceptibles al ataque del oxígeno del aire, ya sea a nivel celular o posteriormente una vez extraído.

I. 2. 5. 2. Fracción insaponificable

Resulta enormemente difícil determinar todos los componentes menores del aceite de oliva debido a su complejidad y a su baja concentración en el mismo. La fracción insaponificable del aceite se obtiene tras la saponificación con un hidróxido alcalino y la extracción con un disolvente. Lo conforman compuestos como los alcoholes de ceras, hidrocarburos, alcoholes alifáticos, esteroides, tocoferoles, carotenoides, clorofilas y compuestos fenólicos. Los procesos de refinado reducen considerablemente la cantidad de materia insaponificable, por lo que, si bien no afecta su contenido energético, sí altera notablemente su valor biológico y calidad nutritiva. La fracción insaponificable supone entre el 0,5 % y el 1,5 % del peso del aceite de oliva (**Tabla 4**).

I. 2. 5. 2. 1. Tocoferoles

Los tocoferoles son derivados isoprenoides que difieren entre sí por el número y posición de algunos grupos metilos. Tienen una presencia importante en el aceite de oliva. La forma α -tocoferol representa el 90-95% del total. Es la más activa biológicamente por su acción como antioxidante natural (vitamina E), representando una valiosa fuente nutritiva. El proceso de la refinación del aceite elimina en gran parte este tipo de sustancia, de ahí la importancia del consumo de aceite de oliva virgen (Cert, 1998).

I. 2. 5. 2. 2. Derivados fenólicos

Los derivados fenólicos son los componentes del insaponificable que más pueden influir en la calidad del aceite, pues su presencia será determinante, tanto para la estabilidad frente a la oxidación, como para las propiedades sensoriales que exhiba éste (Solinas et al., 1990; Cert et al., 1996).

Tabla 4.- Componentes de la fracción insaponificable del aceite de oliva. Fuente: Mataix y Martínez, 1988.

Compuestos	Cantidad o proporción	Función
Terpenos: Escualeno Carotenos	300-700 mg/ 100 g de aceite 0,5-10 mg/kg (como β -caroteno)	Provitamina A Coloración
Clorofilas: (Pigmentos)	0 a 9,7 ppm	Coloración Autoxidación
Tocoferoles: α -tocoferol β y σ -tocoferol δ -tocoferol	70 -300 mg/kg ≥ 93 % ≤ 10 % del total de tocoferoles $\leq 1,5$ %	Vitamina E Antioxidantes
Esteroles : Campesterol Estigmasterol β -Sitosterol	80 - 240 mg/kg 2,0 -3,0 1,0 -2,0 % (respecto a la fracción de esteroles) 95,0 - 97,0 %	Actividad Hipocolesterolemica
Compuestos Fenólicos	50 - 500 mg/kg (Expresado como ácido cafeico)	Antioxidantes propiedades organolépticas
Compuestos Aromáticos	Alcoholes, cetonas, ésteres, derivados furánicos, etc.	Aroma

Los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva son parte de la fracción polar que se obtiene normalmente por extracción del aceite con metanol/agua. Su papel ha sido extensamente investigado desde los años 60. Hasta ahora no se ha propuesto ningún método estándar u oficial para la determinación de los compuestos fenólicos del aceite de oliva, y los valores encontrados por diversos investigadores apenas pueden ser comparados en lo referente al contenido de polifenoles totales y a los porcentajes individuales. Actualmente el método más usual para la identificación de los compuestos fenólicos es la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección UV-Vis. Los análisis cromatograficos del aceite han mostrado la presencia de diversos ácidos fenólicos (cafeico, *p*-cumárico, vanílico), de flavonas (apigenina y luteolina), y principalmente de dos alcoholes fenólicos (tiroso y hidroxitiroso), que provienen de la hidrólisis de la oleuropeína, una molécula muy compleja extraordinariamente amarga (glucósido del éster heterosídico del ácido elenólico y el 3,4-dihidroxifeniletanol), pero que al ser soluble en agua, se pierde en la fase acuosa durante la extracción y apenas se halla presente en el aceite en su forma completa (Amiot et al, 1989). La acción estabilizadora de estas sustancias, en especial del hidroxitiroso (Ragazzi y

Veronese, 1973; Vázquez-Roncero et al., 1975), es debido a que actúan como inhibidores naturales de la oxidación. El hidroxitirosol está presente en grandes cantidades en los aceites estables y de buena calidad, desapareciendo en los viejos y mal conservados, pareciendo ser el principal responsable de la actividad antioxidante de los polifenoles del aceite, mientras que el tirosol está presente en ambos tipos de aceite (Vázquez-Roncero et al., 1975). Los derivados fenólicos mayoritarios en el aceite de oliva virgen son habitualmente los derivados secoiridoideos del tirosol e hidroxitirosol (Montedoro et al., 1993).

El aceite de oliva contiene compuestos fenólicos simples y complejos que incrementan su estabilidad oxidativa y mejoran considerablemente su flavor. En aceites de variedades italianas, Montedoro et al.; (1992b) revelaron un amplio rango en el contenido de compuestos fenólicos (expresados en ppm de ácido gálico), subdividiéndolos en tres grupos: aceites de contenido bajo (50-200 ppm), medio (200-500) y alto (500-1000). En aceites españoles también se ha observado una gran variabilidad en el contenido de polifenoles (50-500 ppm de ácido cafeico) (Vázquez-Roncero, 1978). Esta variabilidad depende de: la variedad, cultivo y grado de madurez de las aceitunas (mínimo cuando las aceitunas están muy maduras), del estado sanitario y conservación de las aceitunas (las aceitunas dañadas o conservadas mucho tiempo sufren fenómenos de oxidación y de hidrólisis formando derivados con mayor polaridad y solubilidad en agua) y del sistema de extracción del aceite (conforme aumenta el agua utilizada en la extracción disminuye su contenido) (Fedeli, 1993; Kiritsakis, 1991). En la **Tabla 5** se resumen los compuestos fenólicos más importantes identificados en el aceite de oliva virgen (Gariboldi et al., 1986; Maestro Durán y Padilla, 1990; Nergiz y Üñal 1991a; Montedoro et al., 1992a, 1993; Tsimidou et al.; 1992; Cortesi et al.; 1995a; Cortesi et al., 1995b; Angerosa et al., 1995).

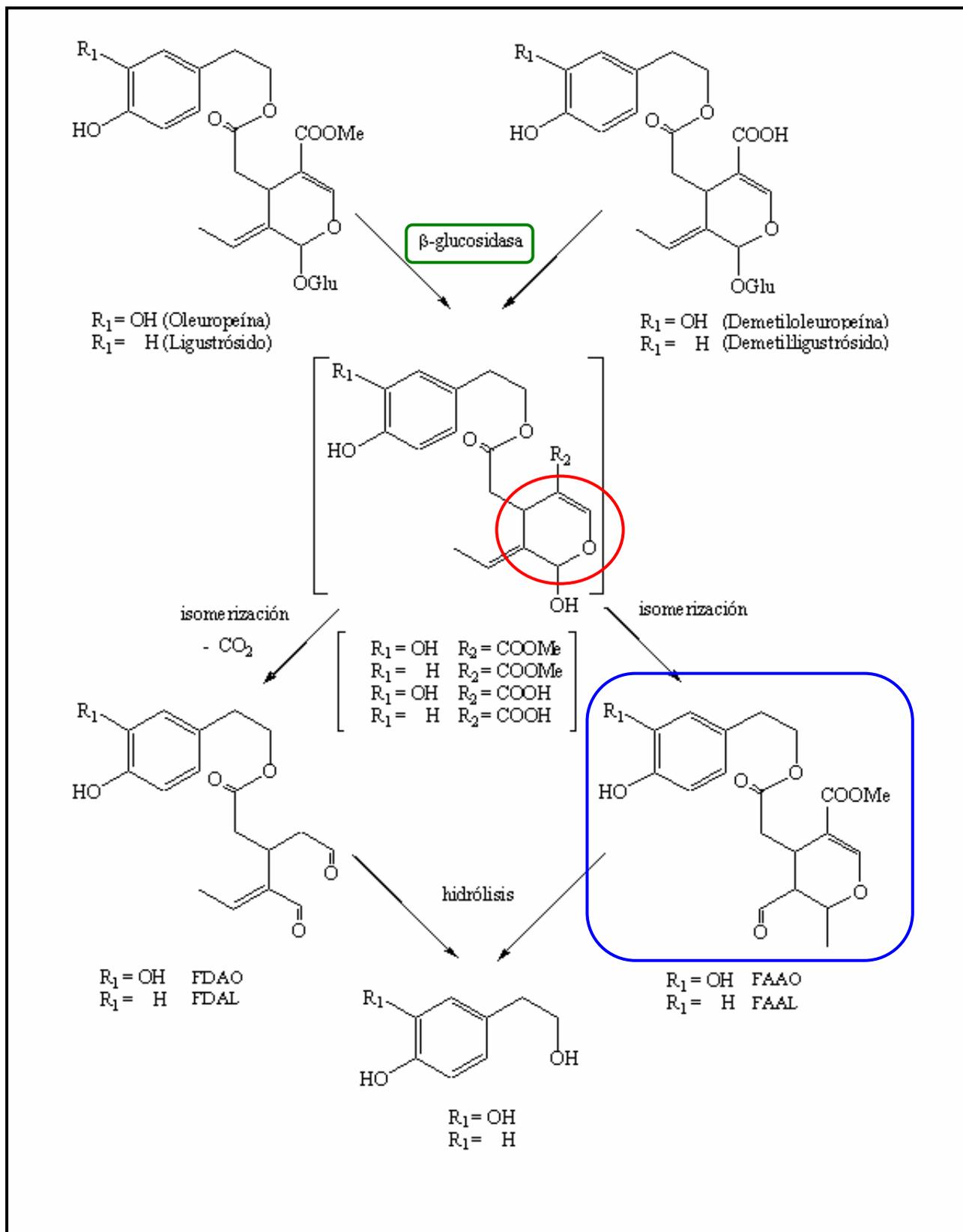
El conjunto formado por el tirosol, el hidroxitirosol y sus diferentes derivados constituye el grupo fenólico más abundante en el aceite de oliva (representa un 50 % de los polifenoles totales), ya detectados por Ragazzi y Veronese (1973). Fueron cuantificados por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama (Schultz y Herrman, 1980; Forcadell et al., 1987) y por HPLC con detector UV-Vis (Solinas y Cichelli, 1982; Amiot et al., 1986; Nergiz y Üñal, 1991b; Tsimidou et al., 1992; Montedoro et al., 1992; Akasbi et al., 1993). Se han identificado diferentes derivados de estos compuestos, un isómero de la aglucona de la oleuropeína y la forma dialdehídica del ácido elenólico ligada al tirosol y al 3,4-dihidroxifeniletanol (Montedoro et al., 1993). Los ácidos cinámicos y elenólicos en forma libre o esterificada también han sido incluidos como componentes de la fracción polar del aceite de oliva virgen.

Tabla 5.- *Compuestos fenólicos encontrados en el aceite de oliva virgen*

Tirosol	(a)	Acido protocatéuico	(a, b)
Hidroxitirosol	(a, b, c)	Ac. P-hidroxibenzoico	(a, b, c)
Aglucona de oleuropeína	(b, c)	Acido o-cumárico	(a)
Apigenina		Acido vanílico	(a)
Luteolina		Acido caféico	(a)
Quercetina		Acido hidroxicafeico	
Acido <i>p</i> -cumárico		Acido siríngico	
Acido gentísico		Acido sinápico	
Acido shiquímico		Acido quínico	
(a) Muy importante cualitativa y cuantitativamente			
(b) Efecto antioxidante			
(c) Efecto en las características organolépticas			

Algunos compuestos son destruidos o transformados durante el proceso de obtención del aceite de oliva. De acuerdo con Emmons et al. (1996), los ácidos benzoico y cinámico son producidos por la hidrólisis de los flavonoides. Las β -glucosidasas endógenas hidrolizan la oleuropeína (Owen et al.; 2000) separando la molécula de glucosa y dando lugar al aglucón (Montedoro et al., 1993), muy inestable, el cual mediante equilibrios tautoméricos cetónicos que implican la apertura del anillo heterocíclico (Angerosa et al., 1996, Uccella, 2001), originan un isómero con una estructura denominada forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína (FAAO) (Harborne, 1989) (**Esquema 1**). En un proceso similar, a partir de la demetiloleuropeína se obtiene otro aglucón, que se puede descarboxilar e isomerizar a la estructura dialdehídica, dando la forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína descarboximetilada (FDAO) (Fito et al., 2000; Brenes et al., 1999; Alcudia et al., 2003). Los compuestos homólogos derivados del tirosol, la forma aldehídica de la aglucona del ligustrósido (FAAL) (Vázquez-Roncero et al., 1974) y la forma dialdehídica de la aglucona del ligustrósido descarboximetilado (FDAL) (Mateos et al., 2003), se supone que derivan del ligustrósido (Castro et al., 2000) y del dimetilligustrósido (Codex Alimentarius, 2002) mediante mecanismos similares (Montedoro et al., 1993).

Entre los fenoles presentes en los aceites de oliva procedentes de aceitunas ‘Arbequina’, ‘Empeltre’ u ‘Hojiblanca’, destaca la presencia de un compuesto identificado como hidroxitirosol acetilado (Brenes et al., 1999). También se han identificado en el aceite de oliva dos compuestos de tipo lignano (1-acetoxipinoresinol y pinoresinol), que pueden llegar a representar hasta el 50 % de la fracción fenólica de algunos aceites españoles (Brenes et al., 2000b; Owen et al., 2000a).



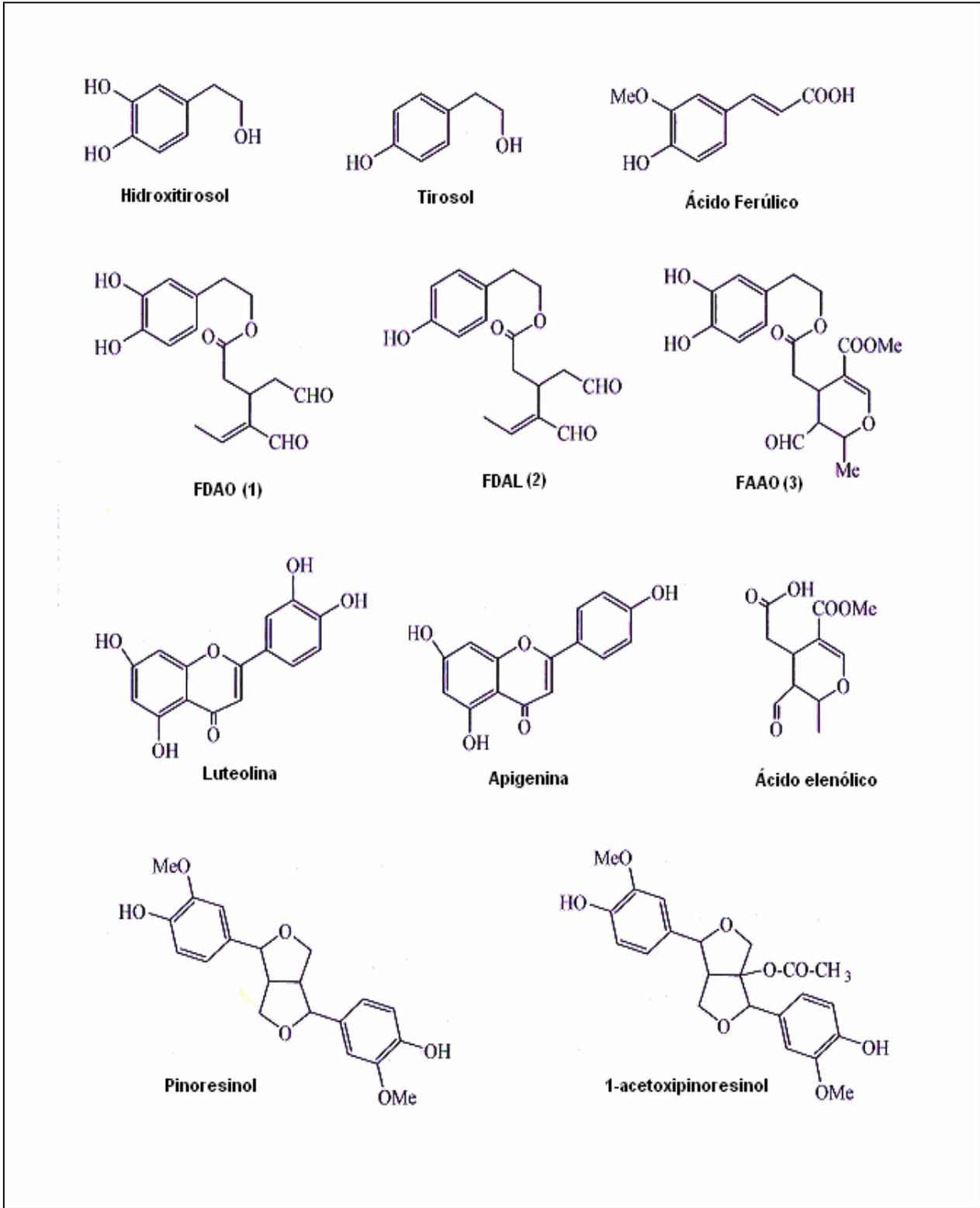
Esquema 1: Mecanismo propuesto para la formación de los derivados secoiridoideos del hidroxitirosol (FDAO y FAAO) y tirosol (FDAL y FAAL) detectados en el aceite de oliva.

Mateos et al. (2001) han puesto a punto un método que permite la extracción, fraccionamiento y cuantificación de los derivados fenólicos presentes en un aceite mediante el uso de extracción en fase sólida (SPE) con columnas tipo Diol y un posterior análisis del extracto por HPLC (**Tabla 6 y Cromatograma 1**).

Tabla 6.- *Compuestos fenólicos presentes en los aceites de oliva vírgenes (Mateos et al. 2001)*

Clave	
Nº Pico	Compuesto Fenólico
1a	Hidroxitirosol
2a	Tirosol
3 (IS ₁)	Ácido <i>p</i> -Hidroxifenilacético
4	Ácido Vanílico
7	Vanillina
8	Ácido <i>p</i> -Cumárico
11 (IS ₂)	Ácido <i>o</i> -Cumárico
13	Ácido Cinámico
14	Luteolina
15	Apigenina
16	Acetato de Hidroxitirosol
17	Ácido Elenólico
18	FDAOD: Forma Dialdehídica de la Aglucona de la Oleuropeína Descarboximetilada
19	FDAO: Forma Dialdehídica de la Aglucona de la Oleuropeína
20	FDAL: Forma Dialdehídica de la Aglucona del Ligustrósido
21	Pinoresinol
22	1-Acetoxi-Pinoresinol
23	FAAO: Forma Aldehídica de la Aglucona de la Oleuropeína
24	FAAL: Forma Aldehídica de la Aglucona del Ligustrósido

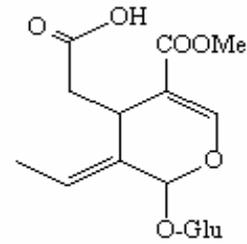
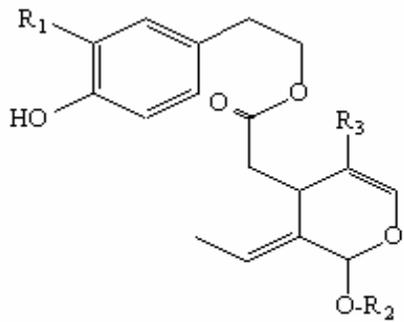
Otros compuestos fenólicos detectados de interés son los ácidos protocatéquico, vanílico, *p*-cumárico y sinápico, o las flavonas, apigenina y luteolina. Esta última es un potente secuestrante de radicales libres y se cree que posee propiedades anticarcinogénicas (Yang et al., 2001). Las fórmulas químicas de algunos de los compuestos fenólicos encontrados en el aceite de oliva.



FDAO (1): Forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína

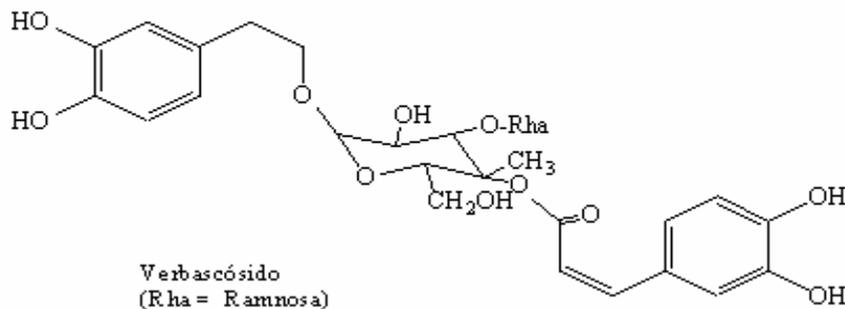
FDAL (2): Forma dialdehídica de la aglucona del ligustrósido

FAAO (3): Forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína

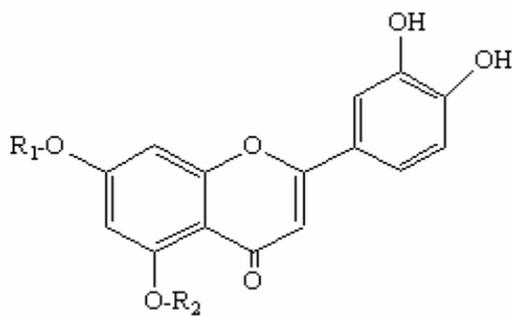


	R_1	R_2	R_3
Oleuropeína	OH	Glu	COOMe
Ligustrósido	H	Glu	COOMe
Demetiloleuropeína	OH	Glu	COOH

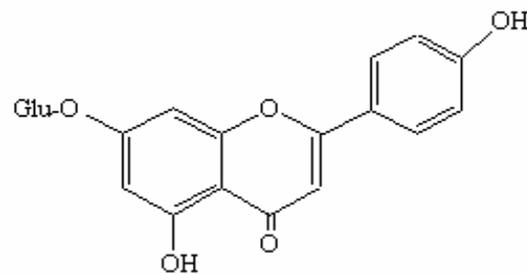
Glucósido del ácido elenólico



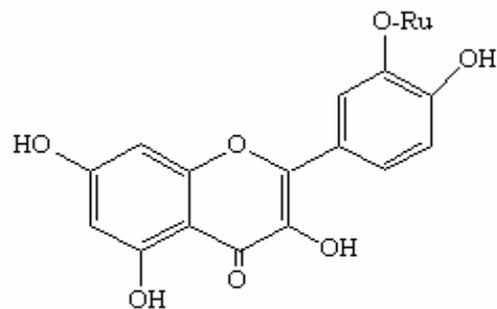
Verbascósido
($R_{ha} = \text{Rannosa}$)



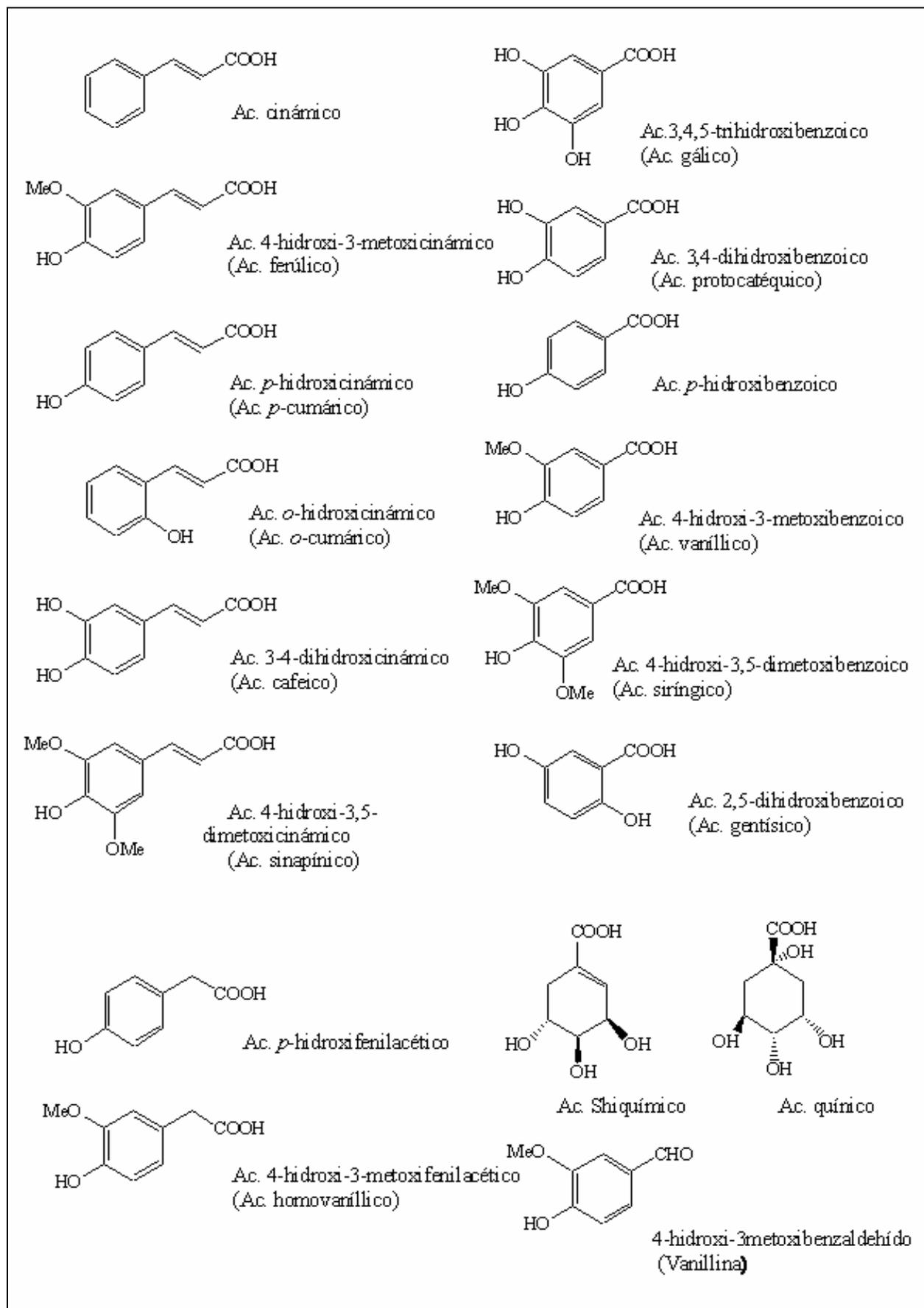
	R_1	R_2
Luteolín-7-glucósido	Glu	H
Luteolín-5-glucósido	H	Glu

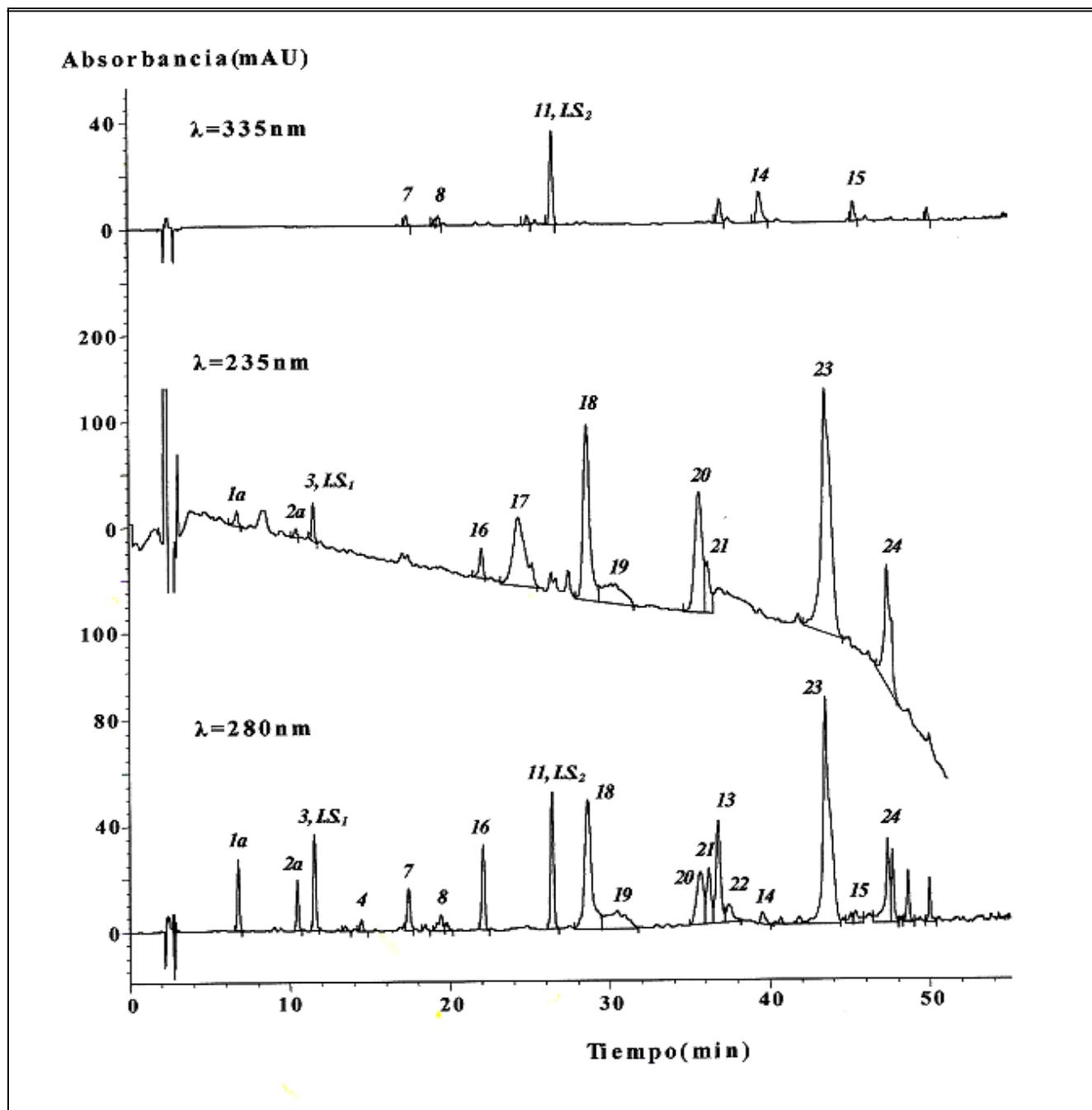


Apigenin-7-glucósido



Quercetina-3-rutinósido





Cromatograma 1.- Ejemplo de cromatograma de compuestos fenólicos aislados en aceite de oliva virgen de variedad "Picual" por extracción en fase sólida (EFS) y cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE). Longitud de onda $\lambda = 335, 235$ y 280 nm. (Ver Tabla 9) Fuente: Mateos et al., (2001)

I. 2. 5. 2. 3. Fitoesteroles

Otros componentes de la fracción insaponificable son los fitoesteroles, cuya concentración en el aceite de oliva oscila entre 80 y 265 mg/100g (Kiritsakis et al., 1987; Gutiérrez et al., 1999; Jiménez et al., 2001). El más abundante es el β -sitosterol, que

constituye el 90-95 % del total de los esteroides del aceite, y cuya presencia contribuye a disminuir la absorción de colesterol. En menor proporción se encuentran el campesterol (< 4 %) y el estigmasterol (3 %).

I. 2. 5. 2. 4. Hidrocarburos

Los hidrocarburos constituyen del 32 al 50 % de la fracción insaponificable (Jiménez et al., 2001). El principal es un poliinsaturado lineal, el escualeno ($C_{30}H_{50}$), y su presencia puede llegar a alcanzar el 40 % del peso total de hidrocarburos (Boskou, 1998), lo que se traduce en 125-750 mg por cada 100 g de aceite de oliva virgen (Smith, 2000), cantidad superior a la detectada en otros aceites vegetales (Mataix et al., 1988). Otro hidrocarburo importante de la fracción insaponificable es el β -caroteno, con actividad antioxidante y considerado como precursor de la vitamina A (retinol). Junto con la clorofila es el responsable de la coloración del aceite. La concentración de β -caroteno en el aceite de oliva es muy baja y oscila enormemente, entre 0,03 y 0,50 mg/100g (Jiménez et al., 2001; Kiritsakis et al., 1987). El contenido en β -caroteno del aceite de oliva depende de diversos factores, como las características del cultivo (ecológico, integrado o convencional), el manejo de la aceituna desde la recolección y los sistemas de extracción (Mataix et al., 1988).

I. 2. 5. 2. 5. Alcoholes terpénicos

Otros compuestos de interés son los alcoholes triterpénicos (uvaol y eritrodilol), que se utilizan para detectar mezclas fraudulentas, puesto que un exceso en su contenido indica la presencia de aceites extraídos mediante disolventes.

I. 2. 5. 2. 6. Pigmentos

Los pigmentos que pueden encontrarse en esta fracción son los clorofílicos (feofitina a, feofitina b, clorofila a, clorofila b y feoforbida a) y los carotenoides (β -caroteno, β -criptoxantina, luteína, anteraxantina, mutatoxantina, violaxantina, neoxantina, y xantofilas esterificadas). Siendo los mayoritarios la feofitina a, la luteína y el β -caroteno, ya mencionado en el apartado de hidrocarburos. Los carotenoides, al parecer, están implicados en la activación del sistema inmunológico (resfriados e infecciones), siendo su ingesta recomendable (Foote et al., 1970; Luxia et al., 1996). Los pigmentos clorofílicos se comportan como antioxidantes en ausencia de luz, pero como prooxidantes en su presencia (Gutiérrez-Rosales et al., 1992). Las clorofilas, cuya cantidad puede variar en función de

numerosos factores, ejercen una acción de excitación del metabolismo, de estímulo del crecimiento celular y de la hematopoyesis (Perrin, 1992). La proporción de carotenos y clorofilas define la tonalidad del aceite. Los aceites refinados carecen de ellos, pues se pierden durante el proceso de decoloración.

I. 2. 5. 2. 7. Volátiles

Los componentes volátiles son un conjunto de sustancias de muy diverso origen (hidrocarburos, alcoholes, terpenos, aldehídos, cetonas, ésteres, etc.) que tienen en común presentar una baja presión de vapor y un relativamente bajo peso molecular (Olías-Jiménez et al., 1980). Estos compuestos son los responsables del aroma característico del aceite de oliva virgen. El proceso de refinación también elimina estos compuestos, dando lugar a aceites prácticamente inodoros. Éste es uno de los motivos por los que se añade aceite de oliva virgen al aceite refinado, para destinarlo al consumo como “aceite de oliva” (Cert, 1998).

I. 2. 5. 2. 8. Otros componentes

También es común encontrar en el insaponificable fosfátidos procedentes de los restos de la saponificación de fosfolípidos, como la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, que se disuelven en el aceite tras la rotura de las membranas plasmáticas de las células del fruto en el proceso de molienda (COI, 1997).

Finalmente, el aceite de oliva puede contener metales pesados como el hierro o el cobre, que aunque normalmente son de origen natural pueden provenir de materiales externos. Estos elementos tienen carácter prooxidante por lo que su presencia es perjudicial para la calidad del aceite. Su concentración en el aceite está limitada, respectivamente, a 3 mg de hierro y 0,1 mg de cobre por kg de aceite.

I. 2. 6. Producción, consumo, exportación e importación

El aceite de oliva representa sólo el 3,3 % de la producción mundial del conjunto de aceites y grasas vegetales, en la cual los aceites más importantes son los de soja, girasol, palma, maíz y colza, aunque cada año aumenta su presencia en el mercado internacional (FAO, 1995). Sin embargo, si se considera la Comunidad Económica Europea exclusivamente, este porcentaje se eleva a un 43 %, pese a que la mayoría de los países integrantes de la misma no son productores. España e Italia producen en conjunto más de la mitad del aceite de oliva mundial, aunque las cifras varían según las cosechas. En Andalucía

el cultivo del olivo tiene una especial importancia, supone un 25 % de la superficie total cultivable.

La producción media del periodo 1998/99-2001/02 fue de 2.534.000 toneladas., dato elevado debido al peso de la extraordinaria cosecha de 2001/02. Para la campaña 2003/04, la producción mundial de aceite de oliva alcanzó unas 3.145.000 toneladas. (COI, 2006). Dicha cifra se considerara un récord histórico, pues supera en 628.000 toneladas a la media de las cuatro campañas anteriores y en 593.000 toneladas a la campaña precedente (**Tabla 7**).

Tabla 7.- Producción mundial de Aceite de oliva* (miles de Tm). Fuente: COI (Noviembre 2006)

	1998/9	1999/0	2000/1	2001/2	2002/3	2003/4	2004/5	2005/6 (Prov.)	2006/7 (Prov.)
Argelia	54,5	33,5	26,5	25,5	15,0	69,5	33,5	36,0	40,0
Argentina	6,5	11,0	4,0	10,0	11,0	13,5	18,0	24,0	14,0
Chipre	2,5	3,5	5,5	6,5	7,0	-	-	-	-
CE	1707,0	1878,5	1940,5	2463,5	1942,5	2448,0	2357,0	1946,0	2144,0
Croacia	5,0	9,0	5,5	5,0	7,0	3,0	5,0	5,0	5,5
Irán	2,5	2,5	3,0	2,5	1,5	2,5	4,0	4,5	6,0
Israel	4,5	2,5	7,0	3,5	9,0	3,0	9,0	3,0	8,5
Jordania	21,5	6,5	27,0	14,0	28,0	25,0	29,0	22,0	36,0
Líbano	7,0	5,0	6,0	5,0	6,0	7,5	6,0	5,5	5,5
Maruecos	65,0	40,0	35,0	60,0	45,0	100,0	50,0	75,0	80,0
Palestina	5,5	2,0	20,0	18,0	21,5	5,0	20,0	10,0	16,0
Siria	115,0	81,0	165,0	92,0	165,0	110,0	175,0	100,0	154,0
Túnez	215,0	210,0	130,0	35,0	72,0	280,0	130,0	220,0	130,0
Turquía	170,0	70,0	175,0	65,0	140,0	79,0	145,0	115,0	140,0
Australia	0,5	0,5	1,0	1,0	2,0	2,5	5,0	9,0	13,0
Egipto	0,5	2,5	0,5	1,5	5,0	2,0	2,5	2,5	3,0
EE.UU.	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0	1,0	1,5	1,5	1,0
Libia	8,0	7,0	4,0	7,0	6,5	12,5	12,5	9,0	11,0
Méjico	2,5	1,0	1,5	2,0	2,5	2,5	2,5	2,5	2,0
Yugos./Mont.	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Otros Productores	7,5	6,5	7,5	7,5	7,5	7,0	7,0	8,0	10,0
Total Mundial	2402,5	2374,5	2565,5	2825,5	2495,5	3174,0	3013,0	2599,0	2820,0

* Incluido Aceite de orujo de oliva. (Prov.): Provisional.

En cuanto al consumo, éste también se centra en la Cuenca Mediterránea (94,6 %). Destacan los consumos de tres países: Italia, España y Grecia con, en conjunto, un 70 % del total mundial. La Comunidad Europea y Estados Unidos consumen cerca del 77 % del total mundial, con participaciones respectivas del 69,8 % y el 7 %. Considerado de forma global, el consumo ha aumentado de manera más acelerada que la producción, lo que lleva hacia una progresiva reducción de los excedentes. Ello se debe principalmente a un aumento del auto

consumo de los países productores, pero también a una penetración, aunque lenta, en los mercados de los países sin tradición olivarera y económicamente fuertes como son Australia, Canadá, los países del centro y del norte de Europa, Estados Unidos o Japón. Este auge que experimenta el comercio del aceite de oliva en su competencia con otros aceites comestibles no es debido a su competitividad económica, ya que cualquier aceite de semilla tiene un coste de producción mucho más reducido, fundamentalmente al no requerir el elevado coste de la recogida manual. La competitividad del aceite de oliva viene dada por su calidad intrínseca, superior a cualquier otro aceite comestible. La propiedad fundamental que le confiere esta primacía es su carácter de zumo de fruta que no ha sufrido en su extracción tratamiento químico alguno, por lo que no debe llevar trazas de disolventes orgánicos ni necesita la presencia de aditivos, puesto que el aceite de oliva virgen posee antioxidantes naturales en su propia constitución (Boschelle et al., 1994). La obtención y el mantenimiento de la calidad debe ser prioritaria para los diversos sectores que comprende esta industria: producción, extracción y comercialización. El objetivo de calidad debe ir dirigido no solo a la exportación, sino preferentemente a los consumos internos de las zonas productoras, que serán siempre los grandes consumidores de aceite de oliva.

Las proyecciones futuras indican un aumento de la producción mundial que pasará de 2.516.000 toneladas para el período 2001/05 a 2.900.000 toneladas para el período 2016/20 en tanto que se espera que el consumo mundial alcance a absorberlas. Las reservas finales se van a mantener en niveles cercanos al millón de toneladas (**Tabla 8**).

En el mercado mundial se registró un fuerte aumento de las importaciones a partir de la campaña 2003/04, en la que se alcanzó un máximo histórico de 663.000 toneladas, manteniéndose desde entonces de manera sistemática en valores superiores a las 600.000 toneladas, mientras que en las campañas anteriores raramente se superaban las 500.000 toneladas (**Tabla 9**) (COI, 2006). Sin embargo, en el futuro situaciones como el aumento de los precios en los mercados de referencia europeos (Jaén, Bari, Heraclion y Mesina) o la revalorización del euro frente al dólar o el yen hacen que se puedan ver afectadas las importaciones a países como Japón, Brasil, Canadá o Estados Unidos.

La aceptación del aceite de oliva en los nuevos mercados a los que ha logrado acceder no se debe solamente a sus indudables propiedades nutritivas y de salud, ni, por su puesto, a su precio, que es elevado en comparación con cualquiera de sus competidores, sino principalmente a que constituye un ingrediente básico de la dieta mediterránea tradicional, considerada como la más sana y equilibrada, siendo cada vez más valorada fuera del ámbito exclusivo del mediterráneo. Esta imagen es producto de un trabajo de marketing, de

promoción y publicidad a través de campañas, tanto genéricas (del COI o de los principales países productores de la Unión Europea), como específicas para distintas marcas comerciales (desarrolladas por las propias empresas exportadoras y distribuidoras en destino). Más importante aún es el esfuerzo que se requiere para asegurar a los consumidores, tanto a los nuevos como a los tradicionales, la genuinidad del aceite de oliva que llega a los mercados.

Tabla 8.- Consumo mundial de Aceite de oliva* (miles de Tm). Fuente: COI (Noviembre 2006)

	1998/9	1999/0	2000/1	2001/2	2002/3	2003/4	2004/5	2005/6 (Prov.)	2006/7 (Prov.)
Argelia	44,0	42,0	26,0	25,0	21,0	60,0	38,0	41,5	38,0
Argentina	8,0	7,0	6,0	5,5	5,5	5,5	5,0	5,5	5,0
Chipre	2,5	4,0	5,0	5,5	6,0	-	-	-	-
CE	1709,0	1728,0	1835,0	1894,5	1918,5	1997,5	2079,0	1885,0	2110,0
Croacia	4,0	8,5	6,5	5,0	6,5	4,0	4,5	5,0	5,5
Irán	2,5	2,5	3,0	2,0	1,5	3,5	5,0	6,5	8,0
Israel	9,5	12,5	13,5	14,5	15,0	13,5	16,0	17,0	16,0
Jordania	19,0	9,0	17,0	20,0	25,0	24,0	25,0	19,0	19,0
Líbano	9,0	8,0	8,0	7,0	4,5	5,0	5,0	5,5	5,0
Maruecos	55,0	55,0	45,0	60,0	60,0	70,0	38,0	55,0	45,0
Palestina	4,0	4,0	8,0	10,0	12,0	12,0	10,0	10,0	10,5
Siria	88,0	90,0	110,0	86,0	128,5	150,0	135,0	94,0	100,0
Túnez	49,0	60,0	58,0	28,0	30,0	56,0	44,0	38,0	38,0
Turquía	85,0	60,0	72,5	55,0	50,0	46,0	60,0	50,0	60,0
Australia	24,0	25,5	31,0	27,5	31,5	34,5	32,5	34,5	35,0
Egipto	23,5	25,0	25,0	22,5	21,0	23,5	26,5	26,0	28,0
EE.UU.	1,0	1,5	1,0	1,5	3,5	2,0	2,5	2,5	3,0
Libia	151,0	169,5	194,5	188,5	184,0	216,5	215,5	215,0	226,0
Méjico	16,0	11,0	7,0	8,0	8,5	14,5	12,0	9,0	11,0
Australia	5,0	5,0	6,5	8,0	12,0	12,0	12,0	11,5	11,0
Yugos. /Mont.	1,0	1,0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Otros Productores	12,5	13,0	13,0	14,0	14,5	13,5	13,0	12,0	13,5
A. Saudita	5,5	4,5	4,0	5,0	7,0	7,5	5,5	4,5	5,0
Canadá	18,5	23,0	24,5	24,0	25,0	26,0	32,0	26,0	30,0
Japón	28,5	27,0	30,0	31,5	30,5	32,0	32,0	30,0	33,0
Rusia	2,0	3,0	4,0	4,0	6,0	7,0	9,0	6,0	9,0
Suiza	6,0	8,0	8,0	9,0	10,0	11,0	11,0	10,5	11,0
Taiwán	7,0	6,0	8,0	6,5	5,5	4,0	4,5	4,0	4,0
Otros no Productores	23,0	29,0	20,0	38,0	34,0	31,0	50,5	41,5	49,0
Total Mundial	2413,0	2442,5	2590,5	2606,5	2677,5	2882,5	2923,5	2665,5	2929,0

* Incluido Aceite de orujo de oliva. (Prov.) Provisional

Es preciso obtener un producto cada vez de mejor calidad, seguro para los consumidores y respetuoso con el medio ambiente, llegando así a mayor número de personas

que demandan productos alimenticios con esas características, estudiando sus gustos para así aportarles “aceites a la carta” con el fin de abarcar más mercado, sirviéndonos de la competitividad del aceite de oliva que viene dada por su calidad intrínseca, superior a cualquier otro aceite comestible por su carácter de zumo de fruta.

Tabla 9.- Importaciones mundial de Aceite de oliva* (miles de Tm). Fuente: COI (Noviembre 2006)

	1998/9	1999/0	2000/1	2001/2	2002/3	2003/4	2004/5	2005/6 (Prov.)	2006/7 (Prov.)
Argelia	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Argentina	3,5	2,0	5,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0
Chipre	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	-	-	-	-
CE	225,5	116,5	127,0	42,5	93,5	231,5	186,0	183,5	160,5
Croacia	0,5	1,0	2,0	1,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Irán	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,5	2,0	2,0
Israel	5,0	10,0	7,0	10,5	6,0	10,5	7,5	14,0	8,5
Jordania	0,0	1,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Líbano	3,5	3,0	2,0	2,0	0,0	0,0	0,5	0,0	0,5
Maruecos	0,5	4,0	4,5	5,0	10,5	1,5	1,5	0,0	0,0
Palestina	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Siria	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Túnez	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Turquía	1,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Australia	23,5	25,0	30,0	26,5	31,5	31,0	28,5	29,0	27,0
Brasil	23,5	25,0	25,0	22,5	21,0	23,5	26,5	26,0	28,0
Egipto	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
EE.UU.	155,0	175,0	200,0	193,0	191,5	226,0	221,0	224,0	240,5
Libia	10,0	1,0	3,0	1,0	2,0	2,0	0,0	0,0	0,0
Méjico	2,5	4,0	5,0	6,0	10,0	10,0	10,0	9,0	10,0
Yugos./Mont.	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Otros Productores	5,5	6,5	6,5	6,5	7,5	7,0	7,0	5,0	3,0
Arabia Saudita	5,5	4,5	4,0	5,0	7,0	7,5	5,5	4,5	5,0
Canadá	18,5	23,0	25,5	24,0	25,0	26,0	32,0	26,0	30,0
Japón	28,5	27,0	29,0	31,5	30,5	32,0	32,0	30,0	33,0
Rusia	2,0	3,0	4,0	4,0	6,0	7,0	9,0	6,0	9,0
Suiza	6,0	8,0	8,0	9,0	10,0	11,0	11,0	10,5	11,0
Taiwán	7,0	6,0	8,0	6,5	5,5	4,0	4,5	4,0	4,0
Otros no productores	23,0	29,0	20,0	38,0	34,0	31,0	50,5	41,5	49,0
Total Mundial	551,0	479,0	517,0	437,0	492,5	663,0	634,0	615,5	623,5

* Incluido Aceite de orujo de oliva, (Prov.) Provisional

I. 2. 7. Propiedades dietéticas del aceite de oliva

Falder-Rivero (2003) resumió las principales ventajas dietéticas que conlleva el consumo del aceite de oliva:

- * El aceite de oliva, tanto en crudo como usado en frituras, es el mejor tolerado y más adecuado para el consumo humano, debido al perfecto equilibrio entre sus ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados.
- * Su acción sobre estómago e intestinos es muy positiva, ya que protege las mucosas, disminuyendo el riesgo de úlceras gástricas o duodenales. Tomado en ayunas, resulta un suave laxante que corrige el estreñimiento crónico. Por otra parte, estimula la vesícula biliar e inhibe la secreción durante el vaciado, previniendo la formación de cálculos biliares.
- * El balance entre sus ácidos grasos esenciales es muy similar al de la leche materna. Su consumo regular en la etapa infantil evita problemas y retrasos en el crecimiento y posibles alteraciones cutáneas, hepáticas y del metabolismo. Paralelamente, es altamente recomendable en la dieta de los ancianos, puesto que favorece la asimilación de minerales y vitaminas, ayuda a fijar el calcio (reduciendo el riesgo de osteoporosis), es digestivo, y apetitoso.
- * El aceite de oliva tiene triglicéridos formados principalmente por ácido oleico. Las moléculas lipoproteicas de la sangre presentan dos modalidades: compactas, de alta densidad, llamadas HDL –high density lipoprotein–, que transportan el colesterol y lo retienen más eficazmente que las otras esponjadas (baja densidad), llamadas LDL –low density lipoprotein– que lo liberan más fácilmente en el torrente sanguíneo, depositándose en las arterias. La presencia de oleico favorece la formación de HDL. Este efecto ayuda a prevenir la arterioesclerosis, reduciendo sensiblemente el riesgo de trombosis arterial y de infarto.
- * El aceite virgen de oliva contiene vitamina E y otras sustancias antioxidantes (compuestos fenólicos), lo que de alguna forma retrasan el envejecimiento humano.
- * Favorece la acción de la insulina y alivia el problema de la diabetes.
- * Contiene provitamina A, liposoluble, contenida en los carotenos, antiinfecciosa y antixeroftálmica.
- * Comunican, especialmente los vírgenes, buenos sabores a ensaladas y salsas.
- * Resiste sin degradarse temperaturas de cerca de 300 °C, siendo ideal para frituras.
- * Favorece la calidad de las conservas de pescado en relación con otros aceites vegetales.

I. 2. 8. La pérdida de calidad, problemática fundamental

Como el factor fundamental en la expansión del consumo de aceite de oliva virgen es su calidad, la pérdida de ésta es el principal problema que se le plantea a la industria olivarera. Cerca del 80 % de los aceites producidos en la región mediterránea presentan características defectuosas que los hacen inadecuados para el consumo en la forma en que se obtienen, si no se someten previamente al proceso de refinación, con el consiguiente coste económico, la pérdida del carácter virgen (pues requiere un procesamiento químico) y la pérdida del valor nutricional y comercial original. El camino de la expansión del consumo y, por lo tanto, del mercado pasa por una mejora sustancial en la calidad de la producción obtenida, aunque ello represente un aumento del costo de producción, ya que el aceite de oliva siempre será más caro que el resto de aceites comestibles debido principalmente al elevado costo de su cosecha.

I. 2. 8. 1. Principales tipos de deterioro del aceite de oliva virgen.

En general los aceites de oliva vírgenes presentan dos clases principales de alteración: la alteración hidrolítica, como consecuencia de la rotura de los enlaces tipo éster de los glicéridos, y la oxidativa por causa de la oxidación de los ácidos grasos insaturados que constituyen dicho aceite. Tradicionalmente la alteración hidrolítica se cuantifica por la acidez titulable presente en el aceite, que es debida a la presencia de ácidos grasos libres. Según la legislación vigente el grado de alteración oxidativa se determina mediante diferentes índices analíticos. El índice de peróxidos da una idea de la fase de alteración inicial de los aceites por la formación de hidroperóxidos a partir de los ácidos grasos insaturados presentes. La absorbancia de los aceites a 232 nm permite evaluar la presencia de conjugación en ácidos grasos poliinsaturados, consecuencia de su oxidación. La absorbancia a 270 nm indica la concentración de compuestos carbonílicos, que se forman en las fases más avanzadas del proceso oxidativo de los ácidos grasos. Por último, la valoración sensorial realizada por un panel analítico de catadores cuantifica de manera global la calidad del aceite de acuerdo con los atributos sensoriales (**Tabla 2**).

I. 2. 8. 2. Mecanismos responsables de la pérdida de calidad de los aceites de oliva vírgenes

La alteración de la molécula de triglicérido original puede responder a mecanismos simplemente químicos debidos a las condiciones en que el aceite ha sido almacenado tras su extracción. La presencia de un exceso de humedad por una inadecuada separación del agua, que arrastra el material hidrosoluble presente en la aceituna, vulgarmente denominado

alpechín, puede inducir la hidrólisis química de los enlaces éster del triglicérido, provocando la liberación de ácidos grasos y la aparición de moléculas de mono- y di- glicéridos. Al mismo tiempo la presencia en el aceite de restos de alpechín confiere atributos sensoriales negativos al aceite, haciéndolo rechazable para el consumidor. El contacto del aceite con el oxígeno atmosférico, sobre todo en presencia de luz, induce su oxidación por un proceso químico autocatalítico que lleva a la formación de múltiples compuestos de alteración, que a la postre serán responsables del enranciamiento del producto. Sin embargo, la principal causa de la degradación de los aceites vírgenes ocurre antes de la extracción del aceite, en el propio fruto y como consecuencia de actividades enzimáticas, tanto internas de la propia aceituna, como externas de los agentes que la parasitan. Estas actividades pueden ser de los dos tipos ya citados: hidrolíticas u oxidativas.

El enzima máximo responsable de la rotura de los enlaces éster de la molécula de triglicérido y el causante, por tanto, del aumento de la acidez titulable de los aceites es la lipasa. Este nombre genérico incluye diversas enzimas con diferentes pesos moleculares, distintas especificidades sobre la posición de rotura en los tres enlaces éster de la molécula del triglicérido y diferentes sustratos alternativos, pero con un efecto común, la rotura del triglicérido y el aumento en el aceite de la concentración de compuestos de alteración hidrolítica. La acción de las lipasas facilita la actuación de otros enzimas en la degradación de los ácidos grasos, como es el mecanismo más corriente para la obtención de energía a partir de ácidos grasos libres, la β -oxidación, que corta la cadena hidrocarbonada del ácido graso sucesivamente en moléculas de acetato. Sin embargo, desde el punto de vista de la alteración del aceite, tiene más importancia la acción de la lipoxigenasa, enzima que forma hidroperóxidos directamente de triglicéridos, pero con mayor eficacia en ácidos grasos libres, mono y diglicéridos, es decir, en los productos primarios de la acción de la lipasa. Este enzima es el principal responsable de la oxidación inicial de los aceites y, en consecuencia, del aumento de su índice de peróxidos. La acción degradativa de la actividad lipoxigenasa es continuada por un grupo de enzimas de diferente índole (liasas, isomerasas, etc), que en conjunto serán las responsables de la rotura del hidroperóxido y de la formación de un amplio abanico de compuestos oxidados, que darán lugar al aumento de la absorbancia a 270 nm y al desarrollo de atributos sensoriales indeseables en el aceite virgen.

I. 2. 8. 3. Factores determinantes del deterioro del aceite de oliva virgen

El deterioro del fruto e, indirectamente, del aceite que contiene puede ser debido a factores internos o externos al mismo. El principal factor interno es la propia evolución del proceso madurativo del producto, que, inevitablemente, concluirá con su envejecimiento y muerte. Es por ello que el esclarecimiento de las bases que determinan este proceso sea el objetivo principal de la fisiología poscosecha. Por otra parte, la principal causa externa de deterioro de los productos agrícolas tras su recolección es debida a la acción de microorganismos patógenos, especialmente los hongos. La tecnología poscosecha estudia el desarrollo de técnicas encaminadas a evitar que el fruto se deteriore una vez cosechado y/o a que presente las condiciones comerciales idóneas en el momento de su consumo o transformación industrial, basándose para ello en el conocimiento aportado por los estudios fisiológicos previos en los que se ha evaluado la repercusión del método, tanto sobre el producto que se desea preservar, como sobre los posibles agentes causantes de su deterioro. Es preciso estudiar la evolución del aceite desde su síntesis hasta su extracción para analizar dónde radican los factores que determinan su deterioro.

I. 2. 8. 3. 1. Cambios en la composición y características del aceite durante la maduración

Conforme avanza el proceso madurativo, el contacto entre el aceite acumulado y el citoplasma celular cada vez es más estrecho y es más posible que las actividades enzimáticas localizadas en éste puedan afectarle. Este hecho está justificado fisiológicamente. La aceituna sintetiza aceite con el único propósito de utilizarlo de reclamo, para que los animales las ingieran y puedan propagar sus semillas, perfectamente diseñadas para circular por el aparato digestivo de las aves o mamíferos hasta quedar, convenientemente abonadas, en una zona nueva por colonizar. Evidentemente, la aceituna no “desea” ser recolectada antes del tiempo debido, es por ello que mientras su semilla no está suficientemente protegida no comienza la síntesis de aceite, su piel le permite estar camuflada entre el follaje del olivo y su mesocarpio está cargado con un compuesto altamente amargo, la oleuropeína, que puede disuadir de su consumo a cualquier animal. Sin embargo, cuando llega el momento programado, se invierten los términos. El fruto se hace patente en el árbol, desarrollando una nueva pigmentación que lo diferencia claramente de las hojas de su entorno; la oleuropeína va desapareciendo; el fruto se ablanda y desarrolla los aromas propios de la aceituna madura, para lo que utiliza como sustrato ácidos grasos, que son liberados de los triglicéridos por lipasas internas y

posteriormente metabolizados por enzimas de la ruta de la lipoxigenasa. Es decir, la aceituna degrada su propio aceite, aunque en muy escasa medida, transformándolo en compuestos aromáticos de reclamo. Esta degradación promovida de manera interna será tanto mayor cuanto más tiempo se le deje madurar (García et al., 1996c).

A lo largo del proceso de maduración del fruto se registran importantes cambios en la composición de ácidos grasos del aceite. El conjunto de ácidos grasos saturados desciende. El ácido oleico muestra una evolución variable, ya que puede permanecer constante o mostrar un ligero incremento en su contenido. En cuanto al ácido linoleico, aumenta su porcentaje a lo largo del proceso de maduración del fruto. En consecuencia, la relación entre ácidos monoinsaturados y poliinsaturados desciende durante la maduración (Beltrán et al., 2004). Varios estudios han mostrado la importante repercusión del grado de madurez del fruto sobre el contenido en compuestos fenólicos del aceite (Vázquez-Roncero et al., 1971; Cimato et al., 1990; Gutiérrez et al., 1999). Por otra parte, el contenido en fenoles del aceite también disminuye, al reducirse la presencia de oleuropeína en el fruto, disminuyendo el contenido de sus antioxidantes naturales y reduciéndose también su exceso de atributos como la astringencia, el amargor o el picante. En general, durante la maduración se produce un descenso en el contenido total e individual de los compuestos minoritarios del aceite. Así, además de los derivados fenólicos disminuyen también los tocoferoles y los esteroides.

El estudio de la influencia de la variedad y la fecha de recolección sobre el contenido en polifenoles y el amargor del aceite de oliva, llevado a cabo por Skevin et al. (2003) en tres variedades diferentes ('Bianchera', 'Busa' y 'Lección'), mostró que el contenido en fenoles estaba estrechamente relacionado con el grado de maduración de los frutos. A medida que aumentaba el grado de maduración descendía el contenido en polifenoles totales, en ortodifenoles y, paralelamente, también disminuyó la intensidad de amargor de los aceites obtenidos. Observaron que la rapidez de la maduración del fruto y el contenido en polifenoles en los aceites dependía sobre todo de la variabilidad de las condiciones climáticas.

Como la estabilidad oxidativa de los aceites depende de la composición de ácidos grasos, del contenido en polifenoles y del contenido en tocoferoles, ésta va descendiendo como consecuencia del aumento del linoleico en el aceite, del aumento de las actividades enzimáticas degradativas internas propias del fruto y del descenso del contenido en estos compuestos antioxidantes a lo largo de su proceso de maduración. Así mismo, las características sensoriales del aceite se ven también fuertemente influenciadas por el proceso madurativo, obteniéndose aceites cada vez más suaves, debido, además de a la progresiva

perdida en fenoles, a la disminución de los componentes volátiles característicos de los aceites de principio de campaña (Beltrán et al., 2004).

El color del aceite está relacionado con su contenido en pigmentos, que depende de numerosos factores, como la variedad de aceituna, las condiciones de extracción y su grado de maduración en el momento de la molienda. Dependiendo del contenido en clorofilas y carotenos de la aceituna, el color varía desde el verde intenso de los extraídos a principio de campaña al amarillo dorado que se obtiene al final de la misma. A las clorofilas se debe el color verde, mientras que los carotenos le confieren una tonalidad entre amarillo y rojizo. Con el proceso madurativo se reducen ambos pigmentos, pero en mayor medida las clorofilas, de ahí el típico color oro de los aceites procedentes de aceitunas maduras.

I. 2. 8. 3. 2. Efecto del riego sobre la calidad del aceite de oliva

Motilva et al. (1999), en ensayos de riego realizados con la variedad 'Arbequina', observaron que no había relación alguna entre el volumen de agua de riego aplicado y la velocidad con que aumentaba el grado de madurez en los frutos, mostrando éstos en las cuatro fechas de recolección estudiadas índices de madurez similares, independientemente del tratamiento de riego empleado. Del mismo modo, la aplicación de dosis crecientes de agua de riego no pareció tener repercusión sobre los parámetros de calidad que determinan la categoría comercial del aceite de oliva (acidez, índice de peróxidos, absorbancia en la región ultravioleta, etc.), o sobre los parámetros relacionados con el estado sanitario del fruto y con su manipulación antes y durante el proceso de extracción del aceite. Tampoco se afectaba el perfil de ácidos grasos en el aceite de oliva por los diferentes tratamientos de riego. Su composición se vio más afectada, en cambio, por otras condiciones climáticas (temperatura, incidencia de viento, etc). No obstante, pese a que no se observó ningún efecto en el color externo o interno del fruto, pues el proceso madurativo se evaluó subjetivamente por los cambios en este parámetro (índice de madurez), el aumento del régimen de riego incrementó el contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides del aceite. La tonalidad y el color de los aceites siguieron, en consecuencia, una misma evolución que los pigmentos. De hecho, se han observado correlaciones positivas entre las coordenadas cromáticas a^* y b^* de los aceites y su contenido en pigmentos clorofílicos y carotenoides. La luminosidad de los aceites (L^*) aumentó, así mismo, de una manera lineal con el agua de riego aplicada al cultivo.

En cambio, el contenido de α -tocoferol disminuyó de una manera significativa por el aumento de la cantidad de agua aplicada al olivo. También, se vieron afectados por el

tratamiento de riego el contenido de polifenoles, la estabilidad oxidativa y el índice de amargor de los aceites (K₂₂₅). La aplicación de dosis crecientes de agua de riego implicó la obtención de aceites con un menor contenido de polifenoles. Según estos autores, esta reducción podría ser consecuencia de una ralentización de su síntesis conforme progresa la maduración del fruto, que se induce tanto más, cuanto más se aumenta el aporte de agua al cultivo. Previamente, Pannelli et al. (1994) y Ranalli et al. (1997) ya habían observado que la presencia de lluvias durante el crecimiento y la maduración de las aceitunas coincidían con una disminución del contenido de compuestos fenólicos en los aceites obtenidos. La biosíntesis de estos compuestos en las plantas es sensible a las condiciones ambientales (Parr and Bolwell, 2000), por lo tanto el estado hídrico del cultivo podría afectar a la misma, a través de una regulación de la actividad del enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), clave en la ruta de la síntesis fenólica (Patumi et al., 1999). Un estrés hídrico implica una mayor actividad del enzima PAL y, por lo tanto, una mayor síntesis de polifenoles en el fruto, como una respuesta o adaptación frente a una situación límite (Dixon y Paiva, 1995; Parr y Bolwell, 2000). Por otra parte, la acción del molino en el proceso de extracción del aceite podría ser menos efectiva en la extracción de polifenoles en pastas con un mayor contenido de agua (Vierhuis et al., 2001), dando lugar a un mayor arrastre de los mismos con el alpechín.

Los compuestos fenólicos sencillos como el hidroxitirosol, tirosol, ácido vanílico y ácido *p*-cumárico, no se vieron afectados por el tratamiento de riego. El contenido de vainillina y de lignanos (mezcla de pinosinol y acetoxipinosinol) aumentaba con la dosis de riego, mientras que el resto de compuestos fenólicos de naturaleza compleja, llamados secoiridoideos, siguieron la tendencia inversa; su concentración disminuía al aumentar el agua aplicada a los olivos. Los derivados secoiridoideos FDAO, FDAL y FAAO fueron los que más aumentaron su concentración cuando disminuía el volumen de riego (Tovar et al., 2001). Los aceites procedentes de tratamientos menos regados presentaron elevadas intensidades de los atributos amargo y picante, por lo que, de acuerdo con este trabajo, estos atributos estarían más relacionados con los derivados secoiridoideos que con otros compuestos fenólicos. De la misma forma, los aceites extraídos de frutos con una menor irrigación presentaron una mayor resistencia a la oxidación, por lo que estos compuestos también parecen estar más implicados que otros derivados fenólicos en la acción antioxidante natural típica del aceite de oliva virgen (Motilva et al., 1999).

I. 2. 8. 3. 3. Influencia del sistema de cosecha en la calidad del aceite de oliva

Los sistemas de cosecha que, como el "vareo", implican una agresión sobre el fruto favorecen su posterior rápida putrefacción durante el tiempo previo a su procesamiento. También tiene un efecto muy nocivo para la calidad del aceite la mezcla de aceitunas recogidas del suelo con las cosechadas del árbol. Estos frutos, normalmente ya degradados o infectados, dan un aceite alterado que deprecia el conjunto y suelen ser los focos iniciales en la propagación de podredumbre durante el almacenamiento del fruto.

Económicamente hablando, la cosecha representa entre el 45 y el 65 % del coste total de producción en la industria olivarera y su método de realización condiciona la calidad y cantidad del aceite que se obtiene. La calidad del aceite, en cuanto a que será mejor o peor en función directa del deterioro que sufre el fruto, y la magnitud de su producción en las campañas siguientes, pues los daños sufridos por el árbol, debido a un inadecuado método de recolección, se manifestarán en una reducción de las cosechas futuras (Martín et al., 1994; Ferguson, 2006).

Actualmente se discute sobre la conveniencia de la recolección mecanizada con agitadores mecánicos. El principal problema de este sistema es su bajo rendimiento. Normalmente consigue la recolección de entre un 65 y un 80 % de la carga total del árbol, con lo que se producen dos efectos negativos simultáneamente: pérdida de producción en la presente campaña, por quedar fruto en el árbol, y pérdida de producción en la siguiente campaña, por el agotamiento que provoca en el árbol este hecho (Ferguson, 2006). Con la idea de reducir esta baja eficacia de cosecha se ha estudiado el empleo de agentes químicos que provoquen la abscisión del fruto. Se ha conseguido a escala de laboratorio establecer la concentración de etileno y el tiempo de exposición a este gas, necesarios para obtener una abscisión máxima del fruto (98 %) y mínima de la hoja (5 %) (Lang y Martín, 1989). Sin embargo, aún no se ha conseguido adecuar eficazmente estos tratamientos a mayor escala. El uso de compuestos liberadores de etileno como el Ethephon o el Etherel, incluso utilizados a dosis pequeñas, producen una excesiva abscisión de hoja (superior al 25 %) que resulta lesiva para el cultivo (Martín et al., 1994).

Atendiendo a la obtención de un aceite de alta calidad, el método idóneo será aquel que permita conservar en mayor medida la integridad del fruto. En este sentido, la recogida a mano, vulgarmente denominada "ordeño", es la que ofrece mayores garantías. Sin embargo, su elevado costo hace que los agricultores se muestren reacios a su empleo. Otro inconveniente de este sistema es su lentitud. La cosecha a mano puede hacer que sea

económicamente imposible recoger el fruto en su momento óptimo, por lo que produce de forma indirecta también una pérdida en la calidad del aceite, pues o bien se aumenta la proporción de fruto inmaduro, si la cosecha se adelanta, o lo que es peor, se aumenta la proporción de fruto sobre maduro, si la cosecha se retrasa. En el primer caso se obtendrá menos cantidad de un aceite más amargo, ya que los frutos verdes suelen dar pastas de difícil extracción, y en el segundo se obtendrá mayor cantidad de un aceite más suave, pero con peores parámetros físico-químicos de calidad al proceder de frutos más propensos a cualquier tipo de deterioro.

Probablemente el sistema más adecuado que se puede emplear consistiría en el uso consecutivo de ambas técnicas. Se iniciaría la cosecha con la recolección mecanizada, para llevar a cabo una más económica y rápida recogida de aceitunas en su grado óptimo de maduración y, posteriormente, se debería hacer un repaso a mano del fruto retenido en el árbol, para lo que se requiere un equipo de operarios reducido en comparación con el que se necesitaría para la cosecha íntegra a mano. Además, como el fruto retenido en el árbol es el más inmaduro, su recolección a mano admite una mayor demora en su recogida. De cualquier forma, cada caso particular necesitaría un estudio específico, ya que existen parámetros como la altura o la forma del árbol, la orografía del terreno, etc., que pueden ser determinantes en la selección del método idóneo de cosecha.

I. 2. 8. 3. 4. Influencia de las condiciones poscosecha en la calidad del aceite de oliva

El mayor grado de deterioro de la aceituna tiene lugar durante el tiempo que media entre la cosecha del fruto y su procesamiento. La enorme masa de aceitunas, que se cosecha anualmente para la producción de aceite, se obtiene cuando el fruto alcanza un mismo grado de madurez, que se juzga óptimo para la producción de aceite. La industria almazarera frecuentemente no puede procesar de inmediato todo el producto que le es suministrado. Hasta ahora, la conservación de estas aceitunas se ha venido realizando de manera muy inadecuada, mediante su mero amontonamiento en pilas de frutos denominado "trojes" (**Foto 1**). Este sistema constituye un excelente paradigma de cómo no se debe almacenar un fruto. El apelmazamiento provoca la destrucción física de las aceitunas, especialmente las localizadas en la zona inferior que soportan todo el peso del conjunto. Se produce así una liberación de material orgánico, que constituye un excelente caldo de cultivo para la proliferación de microorganismos patógenos.



Foto 1.- Troje de aceitunas. Fuente: J. Alba

Al mismo tiempo, este sistema de conservación origina una elevación notable de la temperatura del troje, por la propia respiración de los frutos, que, a su vez, acelera autocatalíticamente todo el proceso degradativo. En corto tiempo, menos de una semana, se produce una descomposición generalizada de las estructuras orgánicas de la aceituna y una alteración de sus componentes químicos (**Foto 2**). No es, pues, de extrañar, que el aceite obtenido a partir de estos frutos no sea apto para el consumo sin una refinación previa.



Foto 2.- Corte transversal de un troje de aceitunas.

I. 2. 8. 4. El adelanto de la campaña, sistema para minimizar el deterioro del aceite

Las características que definen la calidad del aceite extraído (acidez, índice de peróxidos, absorbancia en la región ultravioleta o análisis sensorial) dependen más de la calidad de la aceituna que de su grado de maduración, aunque conforme envejece la aceituna se va ablandando y haciéndose más propensa a todo tipo de deterioro (García et al., 1996c). Sin embargo, el momento de la recolección influye sensiblemente sobre los compuestos fenólicos y los compuestos volátiles, que dan al aceite su sabor y aroma característicos. El contenido en fenoles disminuye con la maduración del fruto, según se va alcanzando el color púrpura, al igual que los compuestos aromáticos relacionados con el olor a hierba. Los aceites extraídos de aceitunas recolectadas antes de alcanzar la madurez completa tienen características aromáticas más intensas (Beltrán et al., 2004). Caponio et al. (2001) observaron cómo la cantidad total de fenoles y la de fenoles hidrolizables descendía coincidiendo con el progreso del grado de maduración de ‘Coratina’, con la pérdida de la estabilidad oxidativa y con la pérdida de su intensidad de amargor, siendo el exceso de este atributo el único obstáculo para la obtención de aceites de mayor calidad con una recogida temprana. Estos aceites no son directamente consumibles, sin una previa mezcla o refinación, sobre todo para los consumidores no acostumbrados a este atributo. En cambio, si se extrae de aceitunas ya muy maduras, el aceite tiene un aroma menos amargo, perfectamente aceptable por el paladar de cualquier tipo de consumidor.

En la práctica, muchas veces no es posible recoger las aceitunas en el momento óptimo, ya que ello depende de factores tan aleatorios como la disponibilidad de mano de obra o de las condiciones climáticas. En estos casos, la recolección se debe realizar antes o después de este momento, lo que determina la obtención de aceites con características diversas e imprevisibles “a priori”. La obtención de aceite de calidad debe ser siempre un objetivo prioritario. Es necesario iniciar pronto la recolección, de modo que la mayor parte de la cosecha se pueda hacer en el momento más idóneo y en cualquier caso se evite un retraso excesivo, que implicaría un mayor riesgo de pérdida de calidad en el producto.

Por otra parte, el peso total de la aceituna es mayor en el envero que al final de maduración, ya que habitualmente disminuye el contenido de agua en el fruto, mientras que se mantiene el de aceite o incluso puede aumentar ligeramente. Por este motivo, el rendimiento en la obtención es mayor cuanto más madura es la aceituna, teniendo en cuenta, además, que la presencia de agua normalmente hace más difícil la extracción. Si a esto se une que se hace mucho más fácil el desprendimiento de la aceituna del árbol conforme madura, se comprende

que tradicionalmente se tienda más al retraso de la cosecha que a su adelantamiento, sacrificando una mejor calidad del aceite en aras de una mayor producción.

Históricamente la industria olivarera se ha visto siempre condicionada por dos problemas originados por las características intrínsecas del cultivo: La concentración de la cosecha en un periodo relativamente reducido de tiempo y la alternancia de producción, comúnmente denominada “vecería”. La evolución de la producción española durante las últimas cinco campañas (**Tabla 10**) pone de manifiesto la actualidad de ambos problemas. Más del 85 % de la producción total se concentra entre los meses de Diciembre y Febrero, provocando que se necesite una gran capacidad de molturación y el empleo de varios turnos diarios de trabajo en la almazara para procesar el fruto antes que este se deteriore. No existiendo habitualmente en las almazaras una infraestructura adecuada para la conservación del producto excedente, éste se acumula en los ya citados “trojes”. Por otra parte, se observa de forma nítida el efecto de la “vecería” del olivo. Las campañas de producción alta se alternan con campañas con un rendimiento sensiblemente menor. Este hecho supone, además de una pérdida de producto, una dificultad añadida a la hora de decidir la capacidad de molturación necesaria, pues si se ajusta a la requerida para las campañas de producción alta, la amortización de la maquinaria sólo se justificaría una de cada dos campañas, estando en la siguiente infrutilizada. Si, por el contrario, la capacidad de procesamiento se ajusta a una producción más baja, se corre el riesgo de sufrir la acumulación del fruto cosechado y no procesado en las campañas de producción alta, lo que determinará, como se puede suponer, una notable pérdida en la calidad del aceite extraído.

Tabla 10.- Producción Española de Aceite de oliva (miles de Tm) durante las últimas Cinco campañas. La alternación de la producción y su concentración en determinados meses fue evidente. (García y Yousfi, 2006)

Producción Española de Aceite de oliva (miles de Tm)							
Meses	2000/01	2001/02	2002/03	2003/04	2004/05	Total	%
Noviembre	40	93	55	89	70	347	6,1
Diciembre	200	388	282	430	317	1617	28,6
Enero	270	535	324	568	424	2121	37,5
Febrero	320	295	144	240	146	1145	20,2
Marzo	110	67	48	71	26	322	5,7
Abril	30	27	5	16	5	83	1,5
Mayo	5	8	3	3	3	22	0,4
Total	975	1413	861	1417	991	5657	100,0

El adelanto de la cosecha ayudaría a mitigar ambos problemas, pues, por una parte, al ampliar la campaña se reduciría la concentración del fruto cosechado en picos de producción, permitiendo la molturación de todo el fruto sin necesidad de aumentar la capacidad de procesamiento. Además, la recogida temprana facilitaría una mejor recuperación del olivo para la campaña próxima, permitiendo una reducción del efecto de la “vecería”. La alternancia anual en la producción de la aceituna mantiene una estrecha relación con la época de recolección, puesto que cuando el fruto permanece en el árbol mucho tiempo después de la maduración se produce la inhibición de la inducción floral. Se ha observado que si los frutos se recogen en el momento de envero, la cosecha del año siguiente suele ser mayor que la de los olivos que se han recogido con la maduración muy avanzada. Los árboles al ser descargados de forma más temprana tienen más tiempo para recuperarse y producir más el año siguiente. Se reduce así el problema de la alternancia característica del olivo (Civantos, 1996; Porras, 1997; Lavee, 2006). Este adelanto ofrecería otras importantes ventajas, pues, se reducirían las pérdidas de producción por caída espontánea del fruto, importante en variedades como ‘Arbequina’ en donde puede llegar al 70 % de la producción (Tous y Romero, 1993), las pérdidas por parasitación, robos o daños debidos a la meteorología, la necesidad de abonado o plaguicidas, la presencia de metales pesados en el aceite, pues éstos se van acumulando en el fruto conforme éste va madurando en el árbol y, al utilizarse frutos más duros, menos susceptibles a daños mecánicos o podredumbre, se obtendría un aceite de mayor calidad (García et al., 1996c; Trapero y Blanco, 1997).

La reducción del amargor y la mejora de rendimiento de extracción en el aceite virgen cobra especial relevancia para los excedentes de aceituna de mesa, cuya recolección tiene lugar entre los meses de Septiembre y Octubre, cuando el fruto ha alcanzado su tamaño completo y antes de que cambie de color. Se cosecha toda la producción, pues no tiene objeto hacer una costosa previa selección del fruto en el árbol. Sin embargo, sólo los frutos con color, forma y tamaño impecables saldrán al exigente mercado de mesa, en donde la apariencia del producto es el mejor reclamo para el consumidor. El resto, una cantidad muy variable para cada campaña, pero que suele alcanzar valores entre el 7 y el 10 % del total (Garrido, comunicación personal) tendrá como destino la producción de aceite en las almazaras. Teniendo en cuenta que en España se producen anualmente unas 300.000 Tm de aceitunas de mesa, de ellas alrededor de unas 30.000 se destinarán a la producción de aceite. Éste, a parte de extraerse con muy bajo rendimiento por las especiales características del fruto inmaduro, exhibirá un exceso de atributo amargo que lo invalida para su comercialización directa. No obstante, es especialmente valioso para realizar “coupages” con otros aceites

vírgenes más suaves o para el encabezamiento de refinados para formar el denominado “aceite de oliva”. La reducción del amargor permitiría la comercialización directa, sin necesidad de mezclas con otros aceites. Por otra parte, los aceites procedentes de aceitunas inmaduras exhibirían una cantidad superior de antioxidantes naturales. Extremadamente interesante para el sector sería comercializar este tipo de aceites procedentes de aceitunas inmaduras como una marca de excelencia diferenciada dentro de los aceites vírgenes, pues podría alcanzar una alta aceptación y un precio acorde con su superior calidad.

I. 3. EL PROBLEMA DEL AMARGOR EN EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

I. 3. 1. Importancia del amargor en el aceite de oliva

Aunque el amargor no es un atributo *a priori* indeseable en el aceite de oliva virgen y en un cierto grado forma parte inherente de sus características sensoriales definitorias, su exceso reduce su comerciabilidad, sobre todo ante potenciales consumidores no habituados a este tipo de aceite. Éste es el caso, por ejemplo, del mercado del centro y del norte de Europa, de Norteamérica o de Japón, en donde se utilizan para la condimentación aceites insípidos como los refinados de semillas o los de origen animal. Consumidores de este tipo requieren una previa "educación" del paladar, para que puedan gozar de la excelencia del aceite de oliva virgen, y ello se antoja imposible, si de principio se ofrece un producto con unos atributos sensoriales tan distantes de su hábito.

El problema del amargor excesivo incide directamente sobre la comercialización del aceite de oliva virgen procedente principalmente de Andalucía, pues, es un hecho conocido, el alto amargor que exhiben los aceites de la variedad ‘Picual’, aunque procedan de frutos muy maduros. Esta variedad es la más cultivada en España, ocupando unas 645.000 Ha (más del 30 % del total en España). Es propia sobre todo de Jaén (también se le denomina Martaña), pero se halla extendida por toda Andalucía (Barranco, 1997). La comarca de la Sierra del Segura es singularmente famosa por aceites procedentes de esta variedad de exquisita calidad, pero excesivo amargor. Fuera de Andalucía otras variedades que dan aceites de gran calidad pero que pueden presentar problemas de excesivo amargor son la ‘Verdial’ extremeña, la ‘Cornicabra’ castellana y la ‘Villalonga’ cultivada en la zona levantina.

I.3.2. Causas del amargor en el aceite de oliva virgen

Hasta el momento, la problemática del amargor sólo se ha abordado desde el punto de vista analítico en la búsqueda e identificación de los componentes responsables y la correlación de su presencia con las evaluaciones realizadas por los paneles analíticos de análisis sensorial. Numerosos estudios han relacionado este atributo con la presencia de polifenoles (Montedoro et al., 1978, Gutiérrez et al., 1989; García et al., 2001). Estos compuestos, que son sólo parcialmente solubles en lípidos, son conferidos al aceite virgen durante el proceso de extracción, a través de desconocidos procesos, en donde pueden intervenir por lo menos dos tipos de enzimas, tales como las glucosidasas y las esterases (Gutiérrez et al., 2003). Su intensidad es variable e influye en la aceptación del aceite por parte del consumidor. Sacchi et al. (1995 y 1996) observaron que el contenido fenólico, determinado bien por colorimetría o por HPLC con detector UV, estaba relacionado con la caracterización amargo-picante de los aceites evaluados por paneles de cata. Uceda y Hermoso (1997) han descrito la evolución del contenido total de polifenoles en el aceite de oliva virgen durante la maduración de la aceituna. Sin embargo, no han contemplado el efecto del contenido en polifenoles sobre la intensidad de amargor de los aceites.

I.3.3. Valoración físico-química y sensorial del amargor en el aceite de oliva virgen

Las propiedades organolépticas son los criterios más antiguos utilizados para determinar las características cualitativas de un aceite (Boskou, 1996), ya que para su evaluación no se requiere el empleo de una tecnología complicada, sino la simple valoración ofrecida por los sentidos humanos. Pese a su simplicidad no deja de tener una elevada importancia, puesto que a la postre va a ser la aceptación del consumidor en general, es decir la suma de múltiples análisis sensoriales, la que determinará en definitiva el éxito o fracaso en la comercialización de un producto. El análisis sensorial puede considerarse tan fiable o más que cualquier determinación físico-química si se lleva a cabo bajo el control requerido para un panel analítico de catadores, lo que incluye un entrenamiento concienzudo de sus miembros y el responder escuetamente a una evaluación muy concreta sobre la intensidad de un determinado atributo. De hecho, el COI incluye la valoración de calidad de un panel analítico de catadores como criterio para clasificar los aceites de oliva vírgenes (**Tabla 2**) (Van Bruggen et al., 1995). La valoración sensorial de la intensidad de amargor dentro del análisis descriptivo del aceite de oliva virgen se ha venido realizando mediante una escala estructurada de 0 a 5, donde 0 equivale a la ausencia del atributo y 5 define al aceite que

exhibe la intensidad de amargor máxima posible. Últimamente este sistema viene siendo reemplazado por la valoración en una escala no estructurada, que consiste en marcar la intensidad del amargor en el espacio de una recta de 10 cm, siendo su extremo izquierdo el indicativo de la ausencia del atributo y el derecho el de la presencia máxima posible del mismo. La intensidad se cuantifica por la distancia entre el extremo izquierdo de la recta y la marca realizada. Este último sistema permite obtener un mayor grado de continuidad en la variable y, por tanto, mejora la posibilidad de su estudio estadístico.

La determinación por absorbancia espectrofotométrica total en la región UV da una primera estimación sobre el amargor de un aceite. Gutiérrez et al. (1992) encontraron una correlación significativa entre la absorbancia a 225 nm de un extracto obtenido de los constituyentes amargos de aceites de oliva vírgenes y la valoración sensorial de dichos aceites realizada por un panel analítico de catadores. Ello les permitió establecer una fórmula que permite estimar la intensidad del atributo a partir de un análisis físico-químico. Sin embargo, a esta longitud de onda, absorben, además de los derivados secoiridoideos, otras sustancias del extracto fenólico que no contribuyen en el amargor, tales como el ácido elenólico, muy abundante, y otros compuestos minoritarios como Acetato de hidroxitirosol, Acetato de tirosol, hidroxitirosol, tirosol, ácido vanílico, vanillina, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, pinosinol, 1-acetoxipinosinol y apigenina (Mateos, 2002).

En los últimos años, se han realizado determinaciones más precisas usando HPLC-UV para identificar los compuestos responsables del amargor. Algunos autores sugirieron que los derivados del hidroxitirosol eran los principales responsables del amargor del aceite de oliva (Kiritsakis et al., 1998; Caponio et al., 2001; García et al., 2001). Mediante HPLC con detector de masas, Gutiérrez et al. (2003) concluyeron que las formas dialdehídica y aldehídica descarboximetilada de la aglucona de la oleuropeína (FDAO y FAAO, respectivamente) y la forma dialdehídica de la aglucona del ligustrósido descarboximetilada (FDAL) estaban estrechamente relacionadas con la evaluación sensorial del atributo amargo del aceite de oliva virgen. Previamente, algunos autores ya habían encontrado una correlación positiva entre el contenido de estas moléculas en el aceite y el índice de amargor (K_{225}) (Motilva et al., 1999; Tovar et al., 2001). Mateos et al. (2004) demostraron que la presencia del atributo amargo en el aceite de oliva se correlacionaba especialmente con la concentración de la forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína (FAAO). Aunque el resto de derivados secoiridoideos también mostraron correlación, en principio, con el grado de amargor, ello era debido a su coincidencia con contenidos apreciables de FAAO. Sin embargo, cuando el contenido de esta molécula era inferior a 0,03 mmol/kg el aceite no

presentaba amargor, pese a presentar contenidos apreciables del resto de estos derivados secoiridoideos. Como es raro encontrar aceites con estas características, porque el FAAO suele estar acompañado por los demás derivados, ha sido difícil discernir la contribución individual de estos compuestos a la presencia del amargor.

Andrewes et al. (2003) descubrieron que la sensación de picante está sobre todo relacionada con los derivados secoiridoideos del ligustrósido (FAAL y FDAL), que pueden aislarse de los aceites de oliva vírgenes. La fracción que contenía estos compuestos producía una fuerte sensación de picor en la parte posterior de la garganta. Por el contrario, la que contenía sus análogos derivados de la oleuropeína (FAAO y FDAO) en una concentración equivalente sólo provocaba una leve sensación de quemazón, que se percibe más bien en la lengua y estaría más relacionada con el amargor. Ninguna otra fracción fenólica de los aceites analizados produjo intensidades sensibles de quemazón en los catadores, por lo que fueron descartados como posibles responsables de los atributos sensoriales propios del aceite de oliva que resulten agresivos para el paladar humano.

Pese a los importantes avances registrados en este campo en los últimos tiempos, aún quedan multitud de puntos por aclarar. No se conoce aún la génesis del proceso del amargor en el aceite. No se sabe si el aceite conservado en el citoplasma de las células del mesocarpio del fruto va asociado ya al componente amargo, o si éste se halla en otro compartimiento celular y es posteriormente durante el triturado y batido cuando se unen. Tampoco se conoce si los compuestos derivados de la oleuropeína se forman durante el procesado de la fruta o si son preexistentes en el fruto. No se sabe, en fin, si el proceso es simplemente químico o está mediado por una actividad enzimática, aunque se sospecha que se debe a esto último, dado que una hidrólisis química requeriría un medio básico del que se carece (Cert, comunicación personal).

I. 3. 4. Técnicas poscosecha desarrolladas para modificar las características sensoriales de los frutos

El campo de la Fisiología y Tecnología de la Posrecolección incluye el estudio y desarrollo de todos los procesos que se aplican a los productos agrícolas desde el momento de su cosecha hasta su comercialización o procesado. En este sentido, la puesta a punto de un tratamiento sobre la aceituna que consiguiera una disminución en la intensidad de amargor del aceite, que posteriormente se extrajera de la misma, concierne de lleno a esta ciencia. Aunque para la industria del aceite de oliva un diseño de este tipo, que implica la modificación de una

característica sensorial propia de un producto para facilitar su comercialización, constituye una novedad, en otros productos se viene llevando a cabo de forma rutinaria.

Salvo el estudio realizado por Maestro-Durán et al. (1993) sobre la evolución del contenido en polifenoles de aceitunas conservadas bajo diferentes condiciones de atmósfera y temperatura, no se han encontrado referencias bibliográficas donde se relacione los tratamientos poscosecha sobre el fruto con la presencia de polifenoles en el aceite de oliva. A continuación se hará mención de los que se aplican habitualmente en la industria de forma habitual.

I. 3. 4. 1. Desverdizado de cítricos

Determinadas variedades cítricas, como las ‘Satsumas’ y las ‘Clementinas’ alcanzan la madurez interna, medida por el cociente entre el contenido en sólidos solubles (en °Brix) y la acidez (en % de cítrico) del jugo, antes de que tomen la coloración típica que caracteriza al fruto maduro. Debido a ello, el fruto no puede ser directamente comercializado porque recibiría el rechazo del consumidor. Previamente debe ser sometido a un proceso de desverdización, que consiste en una aceleración artificial del cambio de color de verde a anaranjado por la sustitución de la clorofila presente en las células de la epidermis, en los cítricos denominada flavedo, por carotenoides. La técnica consiste en someter la fruta a la acción del etileno en cámaras preparadas al efecto, bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y aireación. Las condiciones del tratamiento dependen de factores diversos como la variedad, el grado de maduración, el grado de turgencia y la intensidad de color que se desea obtener (Roger Amat, 1988).

Los cítricos, al igual que las aceitunas, están considerados como frutos no climatéricos, esto quiere decir, que no experimentan un aumento acusado de la tasa respiratoria en el momento en que se desarrolla de manera definitiva su maduración, y que ésta no se induce artificialmente por la presencia en la atmósfera, en donde está inmerso el fruto, de una concentración determinada de etileno. Ello no quiere decir que el etileno no les afecte, sino que lo hace de manera diferente. La administración de etileno a los frutos no climatéricos provoca en éstos una respuesta proporcional a la concentración artificialmente administrada, haciendo aumentar su respiración y acelerando diversos cambios propios de la maduración del fruto, pero no desencadenando el desarrollo completo del proceso madurativo. En las naranjas y aceitunas el etileno induce el cambio de color, pero no determina un aumento del cociente entre los sólidos solubles y la acidez en las primeras, ni

determina el ablandamiento propio de la maduración en las segundas (Wills et al., 1998). El efecto de esta fitohormona sobre la composición de compuestos responsables del amargor en la aceituna y en el aceite de oliva es de momento una incógnita que merece ser abordada.

I. 3. 4. 2. Eliminación de astringencia del caqui

La astringencia es un atributo sensorial común en los frutos verdes de muchas plantas, que normalmente desaparece cuando el fruto madura en el árbol y que se caracteriza por provocar en la boca un sabor áspero y desagradable que reduce la sensibilidad hacia otros sabores en las papilas gustativas. El caqui es especial en este sentido, ya que permanece extremadamente astringente aun cuando ha madurado. Después de la cosecha la astringencia sólo desaparece completamente cuando el fruto está sobre maduro y es ya muy blando (Gazit y Levy, 1963). Matsuo e Ito (1982) indicaron que la pérdida de la astringencia es debida a la precipitación de los taninos, causada por la reacción de éstos con el acetaldehído, producido durante el proceso de maduración.

Los frutos astringentes pueden ser sometidos a sobre-maduración artificial. Ésta, conocida como maduración forzada, exige una técnica similar a la desverdización de los cítricos, produciendo caquis perfectamente maduros y adaptados al gusto del consumidor. Combinando un contenido de 50 % de O₂, de 0-1 % de CO₂ y 2 % de etileno con una temperatura de 21 °C durante 24 a 36 horas, y después de 15 °C durante 6 horas, hasta alcanzar la total coloración, se insolubilizan los taninos y la astringencia desaparece como consecuencia de ello (Ragazzini, 1985). Sin embargo, el empleo de atmósferas enriquecidas con etileno provoca una aceleración excesiva del proceso madurativo, lo que determina una reducción significativa de la vida comercial del fruto. Algo similar sucede cuando se sumergen los caquis en una solución de ethephon con una concentración de 5000 ppm durante 2 minutos. En este caso, los frutos maduran en tres días, aumentando la coloración roja y los azúcares reductores, y disminuyendo, en cambio, su acidez (Srinivasan et al., 1974).

Un método muy comúnmente usado para eliminar la astringencia está basado en someter al fruto a la acción de una atmósfera enriquecida en dióxido de carbono (superior al 80 %) durante varios días. La duración depende de la variedad, temperatura de tratamiento y estado de maduración del fruto. Tras desaparecer la astringencia, los frutos permanecen firmes y mantienen su calidad (Gazit y Adato, 1972). Según algunos autores se consigue de forma positiva la eliminación de la astringencia de los frutos almacenándolos en cámaras estancas con CO₂ y O₂ en cantidades inferiores al 60 % y al 2 %, respectivamente, a 20 ó 30 °C durante un tiempo de 18 a 25 horas, seguidos de conservación en aire a 30 °C durante 3

días mediante un método denominado de corta duración y temperatura constante (CTSD) (Matsuo et al., 1976; Roy et al., 1995).

La eficacia del tratamiento para la eliminación de astringencia con atmósfera rica en CO₂ es mayor si a esta atmósfera se añaden vapores de etanol. Se ha visto que con este tratamiento los frutos pierden la astringencia en 3 horas a 35 y 42,5 °C, mientras que con sólo CO₂ se necesitan 10 horas a la misma temperatura. Esta aceleración del proceso se debe a que la adición de etanol favorece la producción de acetaldehído en el fruto. La acción combinada del CO₂ y del etanol provoca un aumento en la concentración interna de acetaldehído independientemente mediante dos rutas metabólicas diferentes (Shimomura et al., 1990).

Aunque, como antes se ha mencionado, la aplicación de una concentración elevada de dióxido de carbono se considera un tratamiento eficiente para la eliminación de la astringencia, se ha visto que, si éste se prolonga demasiado o se utiliza una temperatura excesiva puede originar en el fruto malos olores y/o sabores.

La inmersión de los frutos en agua para la eliminación de la astringencia se debe considerar como otro método de inducción de respiración anaeróbica en el tejido del fruto, para de este modo producir el acetaldehído, que inicia la insolubilización de los taninos (Matsuo e Itoo, 1982). El agua caliente acelera el proceso de eliminación de la astringencia, ya que intensifica la respiración de las células del fruto y, como consecuencia, el contenido en oxígeno del agua disminuye más rápidamente, creándose antes las condiciones anaeróbicas (Gazit y Levy, 1963). Se ha conseguido eliminar la astringencia en caquis por inmersión en agua a 40 °C durante 5 horas o a 60 °C durante 1 hora. Alargando el tratamiento a 60 °C más de 2 horas la astringencia reaparece. A temperaturas más altas (80 °C) el fruto permanece astringente, independientemente de la duración del tratamiento. Esto parece indicar que las enzimas encargadas de producir acetaldehído se inactivan a temperaturas superiores a 60 °C, siendo esta inactivación irreversible cuando la exposición alcanza una temperatura de 80 °C. Cuando los frutos se sumergen en agua a 60 °C la eliminación de la astringencia se acelera inicialmente debido a la activación de las enzimas responsables de este proceso, pero si el tratamiento se prolonga, dichas enzimas se desactivan, y la astringencia puede recuperarse por la resolubilización de los taninos que tiene lugar a temperaturas elevadas, como también puede ocurrir en los tratamientos de anaerobiosis en cámara. El caquí recuperará su astringencia en un cierto nivel, dependiendo del alcance de la resolubilización. Estas técnicas tienen en común el producir un estado asfijante o una situación de estrés que provoca la insolubilización de los taninos y permite el consumo de los frutos.

Se sabe que la variedad, el grado de maduración y el clima influyen en el nivel de astringencia que presenta un caqui. La actividad enzimática y la concentración de metabolitos intermediarios del fruto determinan la eficacia en la eliminación de su astringencia en un determinado momento, así como si el tratamiento dará o no lugar a lesiones fisiológicas que hagan inviable la comercialización del producto. Por ello, es preciso adecuar las técnicas de tratamiento para la eliminación de la astringencia del caqui de forma particularizada para cada variedad y zona de cultivo.

El problema de la astringencia guarda ciertas similitudes con el del amargor: Ambos atributos parecen estar causados por derivados fenólicos, en el desarrollo de ambos intervienen actividades enzimáticas y los dos se reducen conforme progresa el proceso de maduración del fruto. De hecho el atributo astringente suele acompañar al amargo en los aceites procedentes de frutos inmaduros. Por tanto, parece razonable que la aplicación de alguna de las técnicas que se han desarrollado para la eliminación de la astringencia pueda ser al mismo tiempo útil para la reducción del amargor.

I. 3. 4. 3. Tratamientos postcosecha en la aceituna de molino

Aunque la actuación de la Tecnología Postcosecha sobre el sector olivarero ha sido muy limitada hasta el momento y, principalmente, se ha circunscrito a ensayos de laboratorio, ya existen precedentes de la aplicación de tratamientos con el objeto de preservar la fisiología de la aceituna y así mejorar la calidad del aceite posteriormente extraído de la misma. Entre otros podemos citar los tratamientos detallados en los siguientes apartados.

I. 3. 4. 3. 1. Conservación refrigerada

La frigoconservación de la aceituna de molino es una solución alternativa al aumento de la capacidad de molturación, que sería la solución más fácil y directa, pero supone un fuerte aumento de inversión de capital, que sólo se verá amortizado si el aumento de producción estuviera asegurado. A parte de requerir equipos menos especializados, la frigoconservación es mucho más versátil. Puede ser utilizada para otros fines distintos a los de la elaiotecnia, como la conservación en frío de cualquier tipo de producto. Además, la frigoconservación es más asequible por arrendamiento que la capacidad de molturación.

Esta técnica se fundamenta en que toda reducción de temperatura se traduce en una reducción de la velocidad con que transcurre cualquier actividad metabólica, como puedan ser la respiración, la pérdida de textura, de color, etc. Las bajas temperaturas tienen la ventaja

adicional de disminuir el ritmo de crecimiento de los microorganismos patógenos y dificulta, en general, cualquier tipo de parasitación.

La calidad de un aceite es un fiel reflejo de la salud fisiológica del fruto de donde procede. En este sentido la temperatura de conservación es uno de los factores que van a condicionar en mayor medida su estado. El estudio de la evolución de la incidencia de las pérdidas poscosecha registradas en aceitunas de molino almacenadas a temperaturas crecientes de conservación mostró que a 5 °C se registraba menos de la mitad de podredumbre que la que se contabilizaba a 8 °C y unas ocho veces menos que a 12 °C. El incremento de la temperatura de conservación provocó una mayor pérdida de dureza y una menor retención del color inicial del fruto, produciéndose, por tanto, un envejecimiento del fruto más rápido a mayor temperatura (García et al., 1996a). Como consecuencia, el deterioro de la calidad del aceite extraído de estos frutos, evaluada por su acidez, índice de peróxidos, absorbancia ultravioleta, valoración sensorial y estabilidad frente a la oxidación, aumentó exponencialmente en consonancia con el aumento de la temperatura de conservación empleada.

Trabajos realizados previamente a escala de laboratorio (García y Streif, 1991; García et al., 1994a; García et al., 1996a) con las variedades ‘Picual’ y ‘Gordal’ y a escala industrial con ‘Blanqueta’ y ‘Villalonga’ (García et al., 1996b; Canet y García, 1999) demostraron que era posible mantener la calidad del aceite de oliva virgen dentro de la categoría extra después de conservar el fruto a 5 °C durante periodos incluso superiores a 15 días (**Foto 3**).

La mayor incidencia de podredumbre en el fruto normalmente se traduce en un rápido aumento en la acidez del aceite, debido a la acción de las lipasas liberadas por ciertos microorganismos. Por esta razón, la conservación del fruto a 5 °C retrasa el aumento de acidez del aceite hasta 45 días después del inicio de la conservación, manteniendo su valor inferior a 0,8%. La estabilidad ante la oxidación muestra un comportamiento similar, registrándose la mayor retención de este parámetro en las aceitunas conservadas a 5 °C. La conservación a 5 °C permite mantener la valoración global de la calidad sensorial inicial de los aceites durante 30 días después del almacenamiento del fruto (Gutiérrez et al., 1992; García et al., 1996a; García et al., 1996b). Sin embargo, no se han encontrado referencias bibliográficas sobre el efecto que este tipo de conservación refrigerada del fruto ejerce sobre la presencia del atributo amargo en los aceites que se extraerán posteriormente. Como la aceituna continúa madurando, aunque más lentamente, durante su almacenamiento en frío es de suponer que el amargor vaya disminuyendo a medida que progrese el tiempo de conservación. Sería de gran interés aclarar este punto.

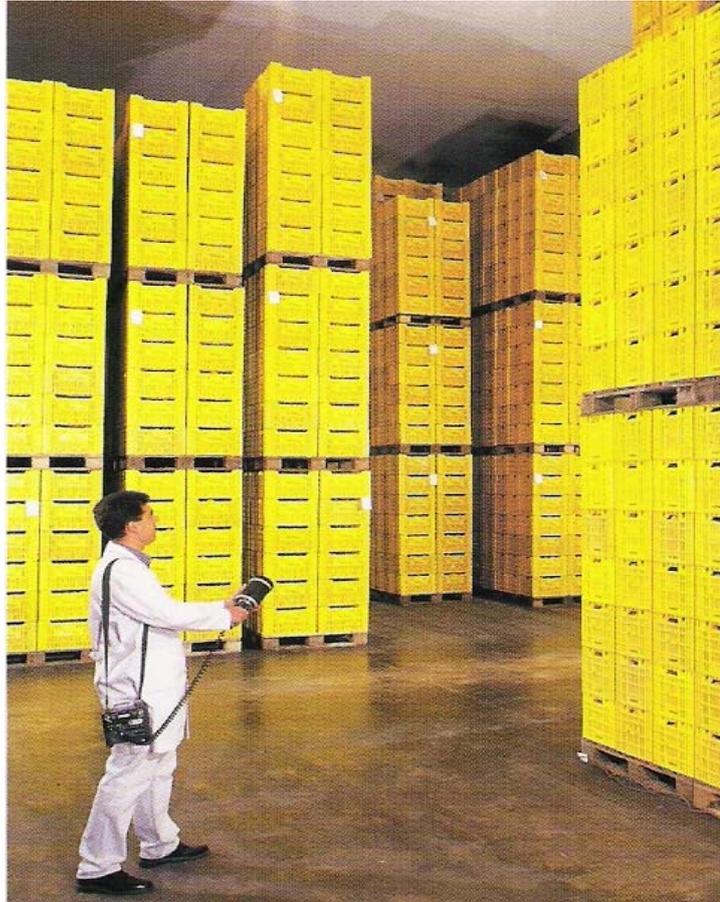


Foto 3.- Almacenamiento refrigerado a escala industrial

I. 3. 4. 3. 2. La modificación atmosférica

La modificación atmosférica es el empleo de una atmósfera diferente a la del aire para la conservación de un producto. Normalmente consiste en aumentar las concentraciones de CO_2 y/o disminuir las de O_2 . Si una vez producida la modificación no se regula la misma, se habla de atmósfera modificada propiamente dicha. Si por el contrario esta modificación se mantiene y controla activamente se habla de atmósfera controlada. Estas técnicas se utilizan normalmente como complemento de la refrigeración, ya que a temperatura ambiente el desarrollo normal de la respiración del producto almacenado provocaría un consumo excesivo de oxígeno, así como una producción elevada de CO_2 , que induciría indeseables procesos fermentativos. Básicamente, la modificación atmosférica dificulta la respiración del producto y además no sólo inhibe la síntesis de etileno sino la acción de esta fitohormona, especialmente en los frutos climatéricos. Por otra parte también afecta al desarrollo de los parásitos, pues dificulta su desarrollo, especialmente a los de naturaleza aerobia, como los hongos patógenos, principales responsables de las pérdidas poscosecha.

La atmósfera controlada ha sido ensayada en aceitunas de mesa en California y Grecia, mostrando diferentes respuestas según la variedad utilizada. Así, las aceitunas ‘Mission’ con grado de maduración verde-maduro (color externo verde con el tamaño definitivo) mantuvieron su estado inicial de maduración y una buena calidad sensorial después de 10 semanas de conservación bajo atmósfera de O₂ de 2 a 5 % y de CO₂ de 2,5 a 10,5 % a una temperatura de 5 °C. Sin embargo, el uso de atmósfera controlada provocó un aumento de la sensibilidad al daño por frío de las aceitunas de la variedad ‘Manzanillo’, tras un periodo de almacenamiento de 6 semanas a temperaturas de 10 °C bajo atmósferas enriquecidas con una concentración del 5 % en CO₂. La incidencia de este problema se incrementaba si además la concentración en O₂ era reducida por debajo del 2 % durante este periodo de conservación (Woskow y Maxie, 1965; Kader et al., 1989). Nanos et al. (2002), más recientemente, también obtuvieron una respuesta diferente al uso de la atmósfera modificada según la variedad empleada. Mientras que la aceituna ‘Conservolea’ podía ser almacenada perfectamente bajo atmósfera controlada (2 % de O₂ y 5 % de CO₂) durante 22 días a 7,5 °C, los frutos de la variedad ‘Chondrolia’ se mostraron extraordinariamente sensibles a los daños por frío cuando se conservaban en estas condiciones de atmósfera controlada y a esta relativamente alta temperatura de refrigeración.

El almacenamiento de la aceituna de molino bajo condiciones de atmósfera controlada también ha sido ensayado. García et Streif (1991) comprobaron el efecto de esta técnica aplicada durante la conservación en frío de aceitunas ‘Gordal’ sobre la calidad del aceite posteriormente extraído. Tanto la reducción del O₂ como el aumento de CO₂ indujeron una fuerte incidencia de daños por frío en los frutos conservados a 5 °C, que se pudrieron rápidamente. Esta alteración provocó un deterioro en los parámetros físico-químicos y sensoriales establecidos para evaluar la calidad de los aceites obtenidos. Posteriormente, se obtuvo un efecto parecido empleando la variedad ‘Picual’ (Gutierrez et al., 1992; Pérez-camino et al., 1992; Castellano et al., 1993; García, 1993a; García, 1993b). En consecuencia, el uso de atmósferas controladas parece no aportar ninguna ventaja suplementaria a la simple refrigeración en atmósfera de aire para la conservación de este tipo de aceitunas.

I. 4. OBJETIVOS

Un sistema que permitiera al mismo tiempo aumentar el rendimiento en la extracción y reducir la presencia del atributo amargo en el aceite haría factible ampliar el periodo de cosecha de la aceituna de molino de cualquier variedad hacia etapas más tempranas de su

maduración y facilitaría la comercialización de este producto. Este sistema debería repercutir de manera positiva en muy diferentes aspectos importantes para la industria olivarera y su desarrollo, siendo éste el objetivo fundamental de esta Tesis. El desarrollo de este tratamiento ha requerido un previo conocimiento exhaustivo del proceso de la génesis del amargor en el aceite oliva. Se desconocía si el atributo amargo estaba presente, ya inmerso en el aceite dentro del citoplasma celular en el mesocarpio de la aceituna o, si por el contrario, éste se confiere al aceite durante la molturación del fruto en el proceso de extracción del mismo. Aclarar este punto ha sido necesario para establecer una estrategia adecuada para conseguir el objetivo propuesto. En el caso de que el atributo amargo hubiera estado presente ya en el aceite antes de su extracción, el único sistema posible de actuación sería el inducir un adelanto en la maduración del fruto, para así provocar de forma artificial la reducción de amargor que ocurre de forma natural, cuando el fruto alcanza la madurez, pues sería imposible separar del aceite los compuestos responsables de este atributo por medios puramente físicos sin deteriorar la calidad de éste. Si por el contrario la entrada de los componentes responsables del amargor se produjera durante el procesado del fruto, sería factible estudiar otros sistemas de más fácil aplicación. En el supuesto de que la génesis del amargor requiriera una actividad enzimática, entonces bastaría con inactivar o reducir su actividad para regular la presencia de estos compuestos en el aceite y, en consecuencia, controlar su intensidad de amargor; siendo factible en este caso la aplicación de medios puramente físicos.

Por otra parte, ha sido fundamental conocer la evolución de la composición fenólica y la intensidad del amargor de los aceites vírgenes a lo largo de la maduración del fruto, con el fin de establecer los momentos más adecuados para la realización de los tratamientos. Además, se ha tenido en cuenta el efecto que el volumen de precipitación ejerce sobre este proceso (Yousfi et al., 2006). Ello ha implicado, paralelamente, desarrollar sistemas de medida más objetivos que los empleados hasta ahora para evaluar el grado de maduración de los frutos, para establecer de una manera más precisa y reproducible las condiciones fisiológicas que presentaba el fruto utilizado en los tratamientos (García y Yousfi, 2005). Una vez que se ha dispuesto de esta base, se ha podido acometer el desarrollo de tratamientos físicos que no afectan el concepto establecido por la normativa para la obtención de un aceite de oliva virgen, permitiendo conseguir el objetivo propuesto: regular la presencia del atributo amargo en este excelso producto sin alterar los parámetros que evalúan su calidad (García et al., 2001; García et al., 2005; García y Yousfi, 2006).

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II. 1. MATERIAL BIOLÓGICO

El desarrollo de esta Tesis ha requerido la utilización de diferentes variedades de aceituna (*Olea europaea* L., cv. ‘Arbequina’, ‘Hojiblanca’, ‘Lechín’, ‘Manzanilla’, ‘Pico Limón’, ‘Picual’ y ‘Verdial’) procedentes de varias zonas de Andalucía (Cabra, Écija, Dos Hermanas, Osuna, Puente Genil, Sevilla y Villarrasa). Para aprovechar en la medida de lo posible la campaña olivarera, al principio de la misma (Septiembre –Octubre) se empleó ‘Manzanilla’, una variedad propia de verdeo. Posteriormente, durante el periodo de Noviembre a Diciembre se utilizaba principalmente la aceituna ‘Picual’ y, finalmente, se concluía la campaña con ‘Verdial’, que es la aceituna de maduración más tardía. Las aceitunas fueron cosechadas a mano, envasadas en cajas de plástico perforadas de unos 22 kg. de capacidad y transportadas el mismo día de su cosecha hasta el Instituto de la Grasa. Allí, rutinariamente, eran almacenadas a temperatura ambiente durante una noche, comenzándose el ensayo al día siguiente.

II. 2. DETERMINACIÓN DEL GRADO DE MADURACIÓN DE LAS ACEITUNAS

II. 2. 1. Determinación objetiva del color del fruto

El color del fruto puede determinarse objetivamente con un colorímetro portátil (CR-200, Minolta, Japón) usando el espacio de color de Hunter definido por los parámetros de color L^* , a^* y b^* , en donde L^* indica la luminosidad, a^* el cambio de verde a rojo y b^* el paso de amarillo a azul. Para describir objetivamente el color de las aceitunas empleadas en todos los ensayos realizados en esta Tesis, se usaron 100 aceitunas sanas, tomadas aleatoriamente de cada muestra, a las que, en un punto cualquiera de su zona ecuatorial, se analizó su color de epidermis con el colorímetro. Para cuantificar los valores de este parámetro se utilizó la fórmula: $IC = L^*(b^* - a^*)/100$, cuyo descenso expresa el cambio de color de verde a púrpura oscuro que sufre la aceituna durante su maduración (Castellano et al., 1993).

II. 2. 2. Dureza del fruto

El reblandecimiento progresivo, que presenta un fruto conforme madura, se puede utilizar para estimar de manera objetiva su grado de maduración. Al mismo tiempo, en el caso de la aceituna, esta pérdida de textura también da una idea de la viabilidad que va a presentar

después de su cosecha, siendo un buen indicio de su resistencia al deterioro y de la calidad que posteriormente presentará el aceite que se obtendrá de la misma (García y Streif, 1991; Castellano et al., 1993). Rutinariamente, en todos los ensayos llevados a cabo, la dureza del fruto se determinó, empleando las mismas 100 aceitunas utilizadas para la evaluación del color, también en un punto al azar de su zona ecuatorial. Para ello se utilizó un densímetro de mano Zwick 3300 con un disco de penetración de 5 mm de diámetro. Las medidas se expresan en Newton/cm².

II. 2. 3. Índice de Madurez

El método más comúnmente utilizado para evaluar el grado de maduración de la aceituna es el denominado “Índice de Madurez”, desarrollado en la Estación Experimental Venta del Llano de Mengíbar. Se basa en la valoración subjetiva del color de la epidermis y el mesocarpio de las drupas, que tiene lugar durante el desarrollo de su maduración. Primeramente, durante su formación hasta que alcanza su tamaño definitivo y en la primera fase de su maduración (estadio verde-maduro) la epidermis de la aceituna se mantiene de un color verde intenso. Luego este color verde palidece, para posteriormente iniciarse un enrojecimiento en el ápice del fruto (estadio de aceituna pintona), que va extendiéndose hacia el extremo opuesto, en el pedúnculo, hasta que el color verde es completamente sustituido por una tonalidad rojiza (estadio de envero). Después, la piel se va oscureciendo, empezando de nuevo por su ápice, y comienza a colorearse de una tonalidad prácticamente negra. En este momento el mesocarpio, inicialmente blanco, va adquiriendo una tonalidad violácea desde el exterior hasta llegar al hueso, momento en que el proceso madurativo puede considerarse finalizado (Uceda y Frías, 1975). El procedimiento consiste en clasificar 100 frutos tomados aleatoriamente de cada muestra en ocho categorías según su color de piel y pulpa (se usaron los mismos que se emplearon para medir, previamente, el color y la dureza). Cada clase se representa con un valor creciente de 0 a 7 conforme aumenta el grado de maduración del fruto:

* Clase 0: Piel verde intenso
* Clase 1: Piel verde amarillento
* Clase 2: Piel verde con manchas rojizas en menos de la mitad del fruto. Inicio de envero
* Clase 3: Piel rojiza o morada en más de la mitad del fruto. Final de envero
* Clase 4: Piel negra y pulpa blanca

* **Clase 5:** Piel negra y pulpa morada sin llegar a la mitad de la pulpa

* **Clase 6:** Piel negra y pulpa morada sin llegar al hueso

* **Clase 7:** Piel negra y pulpa morada totalmente hasta el hueso

Una vez clasificados los frutos, el valor del Índice de Madurez se calcula dividiendo por el número total de frutos clasificados, es decir, 100, el sumatorio de los productos del número de aceitunas de cada clase por el valor representativo de cada clase.

De acuerdo con la fórmula:

$$\text{IM} = \frac{a0 + b1 + c2 + d3 + e4 + f5 + g6 + h7}{100}$$

Donde a, b, c, d, e, f, g, h, representan el número de frutos de las clases 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente.

II. 3. EXTRACCIÓN FÍSICA DEL ACEITE DE OLIVA

II. 3. 1. Extracción a escala de laboratorio y cálculo del rendimiento graso ('Abencor')

Este método, puesto a punto por Martínez et al. (1975), se utiliza para estimar el rendimiento graso de la aceituna en la producción de aceite virgen en la almazara mediante la simulación a escala de laboratorio del proceso industrial. El analizador 'Abencor' consta esencialmente de tres elementos fundamentales:

*Un molino de martillos, de acero inoxidable, dotado de cribas intercambiables.

*Una termobatidora múltiple, con ocho paletas que baten la pasta de aceituna triturada.

*Una centrifugadora de tipo cesta, en acero inoxidable, con un bol que gira a 3500 r.p.m.

El procedimiento consiste en moler las muestras de aceituna en el molino recogiendo la masa en una bandeja donde se homogenizaba convenientemente. A continuación se pesaban 700- 800 g de pasta que se introducían en jarros con capacidad de 1 L, que se sometían a un batido termostatzado a baño maría durante 20 minutos, regulando el termostato para que la temperatura de la pasta no supere los 28 °C. Posteriormente se añadían unos 100 mL. de agua hirviendo y se continuaba batiendo otros 10 minutos más. Acabado el batido, se vertía la totalidad de la pasta del jarro en la centrífuga, accionándola durante 1 minuto y se recogía el mosto oleoso por la parte inferior en una probeta graduada. Con 100 mL de agua

hirviendo se enjuagaba después el recipiente del batido y se volvía a centrifugar otro minuto más. El lavado resultante se recogía en la misma probeta anterior. Después de un reposo de 10 a 20 minutos se obtiene una separación de la fase oleosa (aceite) de la fase acuosa (alpechín). Se procede entonces a cuantificar en la escala de graduación de la probeta el volumen de aceite en mililitros.

Cálculo de rendimiento:

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{V \times d}{P} \times 100$$

Siendo:

P: Peso en gramos de la pasta de aceituna en la batidora

d: Densidad del aceite considerando una temperatura de 20 °C (0.915 g mL⁻¹)

V: Volumen de Aceite cuantificado en la probeta

Finalmente, el aceite obtenido se decantaba con cuidado de la probeta, se filtraba con papel jarabe y se guardaba en oscuridad a -20 °C tras hacerle pasar una corriente de nitrógeno hasta su posterior análisis.

II. 3. 2. Extracción a escala industrial

La extracción a escala industrial se llevó a cabo en la Almazara experimental del Instituto de la Grasa (**Foto 4**). La línea de extracción utilizada para los ensayos está equipada con un sistema continuo de extracción de dos fases (Pieralisi España, S.L., Zaragoza, España), controlado automáticamente (sistema API). El proceso comenzaba con la trituración de muestras de al menos 500 kg de aceituna en un molino de martillo (15 C. V.) a velocidad de 3000 rpm. La pasta resultante era batida, a continuación, durante 90 minutos (30 °C) a velocidad de 8 rpm con la adición de 1 % de microtalco. Posteriormente, se enviaba la pasta a una centrifuga horizontal ('decánter') de dos fases, con una velocidad diferencial de 7 r.p.m y un caudal de alimentación de 500 kg/h. Finalmente, la fase oleosa extraída era pasada a una centrífuga vertical (1000-1200 A) que trabajaba con una relación agua/ aceite de 1/1 a una velocidad de 6500 rpm, obteniéndose un aceite limpio que era almacenado a 5 °C en envases opacos de plástico de 25 L de capacidad. Para el posterior análisis se tomaron directamente de la salida de la centrifuga vertical tres muestras de 1,5 L en botellas de PVC, al inicio, en el intermedio y al final del proceso de extracción. Estas muestras se conservaron a -20 °C y atmósfera de nitrógeno hasta su utilización.



Foto 4.- Almazara experimental del Instituto de la Grasa

II. 4. DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD

La cantidad de agua contenida en el fruto se expresa como humedad (% de agua referido al peso total del fruto). En cada ensayo se tomó por cada replicado una muestra de pasta triturada de 20 g, pesada con precisión del mg. Las muestras fueron recogidas en cápsulas de acero, previamente taradas, y desecadas en estufa a 105 °C hasta que alcanzaron un peso constante. Obteniéndose los valores de peso seco, que por diferencia frente al peso húmedo inicial, permitía calcular el valor de la humedad de los frutos referida en porcentaje.

La humedad de la pasta de aceituna se calculó de la forma siguiente:

$$H (\%) = \frac{Ph - Ps}{Pm - Pv} \times 100$$

Siendo:

- H: Humedad de la pasta (%)
- Ph: Peso inicial de la cápsula con la muestra (g)
- Ps: Peso final de la cápsula con la muestra desecada (g)
- Pm: Peso de la muestra (g)
- Pv: Peso de la cápsula vacía

II. 5. EXTRACCIONES QUÍMICAS

II. 5. 1. Extracción química del contenido total de grasa (Método Soxhlet)

Para determinar el contenido graso total de los frutos de cada muestra se realizó la extracción mediante el método denominado Soxhlet, recogido en la norma UNE 55.030, cuyo fundamento de extracción consiste en poner en contacto una masa desecada de aceituna con un disolvente orgánico, en el que se disuelve la grasa. La pasta seca, utilizada previamente para la determinación de la humedad, era molida, cuidadosamente recogida e introducida en cartuchos de papel de filtro, que se introducían en el seno del extractor. Éste se une a un matraz previamente pesado y se le añade hexano por la parte superior, hasta que sifone y caiga en el matraz. Se vuelve a añadir hexano hasta que aproximadamente ocupe la mitad del compartimento extractor. Se acopla el refrigerante a la parte superior del extractor, sujetando el conjunto de forma que descansa sobre un foco de calor. Se da paso al agua del refrigerante y se enciende el foco de calor, con lo que se activa la evaporación del disolvente que, una vez enfriado por el refrigerante, vuelve a caer en el compartimento extractor. Cuando éste se llena, el sifón de que dispone hace descargar su contenido de nuevo en el matraz. El proceso se va repitiendo durante ocho horas hasta el agotamiento del contenido graso de la muestra inicial y su acumulación en el matraz. Se procede entonces a retirar el sistema extractor y se evapora el disolvente en un rotavapor. Cuando se considera terminada la evaporación del disolvente se introduce el matraz conteniendo la grasa de la muestra en una estufa a 105 °C, hasta que ésta presente un peso constante. El contenido graso total se obtiene aplicando la fórmula siguiente:

$$\% A_H = \% \text{ Aceite en base al peso húmedo} = \frac{P1 - P2}{P} \times 100$$

Siendo:

P = Peso pasta sin desecar

P1 = Peso del matraz con aceite

P2 = Peso del matraz vacío

$$\% A_S = \% \text{ Aceite en base al peso seco} = \% A_H \times \frac{100}{100 - \% \text{ humedad}}$$

II. 5. 2. Extracción con adición de disolvente previo al triturado

Se ha usado este método de extracción para determinar si los componentes responsables del amargor se hallan presentes en el aceite antes del proceso de extracción física o si por el contrario se incorporan al mismo durante este proceso. Se emplearon dos tipos de disolvente, el hexano y la mezcla hexano/isopropanol (3/2, v/v).

II. 5. 2.1. Extracción con hexano

Se toman por replicado 200 g de aceitunas de la variedad 'Picual', previamente mantenidas a 4 °C en una cámara refrigerada durante 12 h, se deshuesan, se cortan en rodajas finas que se van echando en un vaso de trituración Omnimixer, refrigerado con hielo para mantener inhibida cualquier posible actividad enzimática, y se colma con hexano. La pulpa se tritura durante 30 segundos. El triturado se filtra, recuperándose el líquido resultante filtrado. El sólido se lava consecutivamente dos veces con 50 mL de hexano y se filtra incorporándose el material filtrado al obtenido previamente. El líquido resultante se deja decantar, eliminándose la fase inferior acuosa. La superior se filtra con papel jarabe y se hace evaporar con un rotavapor hasta la eliminación total del disolvente. El aceite resultante se analizó sensorialmente después de la extracción. La experiencia se hizo por triplicado.

II. 5. 2. 2. Extracción con la mezcla hexano: isopropanol (3/2, v/v)

Se utiliza comúnmente en bioquímica de lípidos para la extracción total de los compuestos lipídicos presentes en un tejido (Hara y Radin, 1978). Se usó en paralelo a la extracción con hexano, para tener seguro que la ausencia de componentes amargos en el aceite extraído no fuera debida a la falta de polaridad del disolvente, que se aumenta con la presencia de isopropanol. Este método repite el proceso anteriormente descrito con la variante del empleo de centrifugación durante 10 minutos a 1.000 g en lugar del uso de embudo de decantación para la separación de las fases.

II. 6. DESARROLLO DE MÉTODOS OBJETIVOS PARA LA EVALUACIÓN DEL GRADO DE MADUREZ DE LA ACEITUNA

Veinticinco frutos procedentes de cada uno de 12 olivos de las variedades ‘Arbequina’ y ‘Picual’, cultivados bajo idénticas condiciones de suelo, irrigación y condiciones de iluminación en una finca situada en las Plantas Experimentales del Instituto de la Grasa de Sevilla, fueron cosechadas quincenalmente a partir de la primera semana de Octubre de la campaña 1997/98, cuando comenzaron a exhibir su tamaño definitivo, conservando aun el color verde original de su epidermis (grado de maduración verde-maduro en cualquier tipo de fruto). En cada toma de muestra se procedió a medir el color, la dureza y el IM de cada uno de estos frutos. Se estudio la posible existencia de correlaciones entre estos tres parámetros con el avance del tiempo de maduración, así como entre los dos primeros y el tercero, para establecer, si es posible una estimación fiable del grado de maduración por métodos, que no requieran una interpretación subjetiva de los cambios de color de la aceituna durante su proceso madurativo.

II. 7. EVOLUCIÓN DE LA CALIDAD, COMPOSICIÓN FENÓLICA Y PRESENCIA DEL ATRIBUTO AMARGO EN EL ACEITE DURANTE LA MADURACIÓN DE LA ACEITUNA. INFLUENCIA DE LA PLUVIOMETRÍA

Se comparó la evolución de la calidad y de la composición en compuestos fenólicos relacionados con el amargor del aceite de oliva durante la maduración de la aceituna de las campañas 1998/99 y 2002/03, que registraron una misma temperatura media, pero muy distinto nivel de pluviometría, pues la segunda campaña recibió prácticamente un volumen doble de lluvia que la primera (**Tabla 11**). Esta circunstancia extraordinaria hizo posible que pudiera estudiarse en conjunto, tanto el efecto de la maduración, como el del aporte de agua sobre las características del aceite extraído. Con este propósito, aceitunas de las variedades ‘Arbequina’ y ‘Picual’ procedentes de olivos cultivados en las Plantas Experimentales del Instituto de la Grasa, fueron cosechadas semanalmente desde finales de Septiembre o principios de Octubre (IM medio entre ‘0,3’ y ‘1,6’) hasta finales de Enero (IM medio entre ‘4,0’ y ‘5,5’). En cada toma de muestra se cosecharon por triplicado 4 kg de aceitunas, a las que les fue determinado además del IM, el color de epidermis y la dureza de su pulpa. Posteriormente, se procesaron por el método “Abencor”. El aceite obtenido de cada triplicado de muestra fue analizado en los parámetros físico-químicos que determinan su calidad

(acidez, índice de peróxidos, absorbancia ultravioleta, análisis sensorial), su estabilidad oxidativa y sus contenidos en polifenoles y pigmentos (Yousfi et al., 2006).

Tabla 11.- *Temperaturas (° C) y precipitaciones (L/m²) mensuales durante el crecimiento y la maduración de la aceituna en las campañas 1998/99 y 2002/03. (Yousfi et al., 2006).*

	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Sept.	Oct.	Nov.	Dic.	Enero	Media	Total
	Temperaturas medias (° C)											
1998/99	14,1	18,4	24,6	28,2	28,1	23,8	18,6	14,8	10,8	10,6	19,2	
2002/03	16,8	19,3	23,0	25,4	24,3	21,9	20,1	15,8	13,8	11,7	19,2	
	Precipitaciones (L/m²)											
1998/99	30,5	132,0	11,0	0,0	0,0	48,0	0,0	18,0	36,0	13,0		288,5
2002/03	61,3	0,0	0,0	0,0	0,0	106,3	51,2	144,5	138,4	50,5		552,2

II. 8. DETERMINACIÓN DEL MOMENTO DE ENTRADA DEL ATRIBUTO AMARGO EN EL ACEITE DE OLIVA

Para aclarar si los componentes responsables del atributo amargo se hallan presentes en el aceite cuando aun está contenido en los cuerpos grasos del citoplasma de la célula del mesocarpio, antes del procesado del fruto o, si por el contrario, estos compuestos se asocian al aceite durante el proceso de molturación del fruto y el subsecuente batido de la pasta resultante, se procedió a la extracción del aceite de aceitunas ‘Picual’ procedentes de la Plantas Experimentales del Instituto de la Grasa con un Índice de Madurez medio de ‘1’ en paralelo, utilizando una extracción física por el método “Abencor” y dos extracciones químicas, sólo con hexano o bien con la mezcla de hexano-isopropanol. Los aceites extraídos fueron analizados por un panel de catadores para evaluar sensorialmente su intensidad de amargor.

II. 9. DETERMINACIÓN DE SI LA ENTRADA DEL ATRIBUTO AMARGO AL ACEITE DE OLIVA ESTÁ RELACIONADA CON UNA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

Para saber si el proceso de entrada del amargor en el aceite se debe a una simple puesta en contacto de éste con los componentes amargos durante la molturación y el batido de la aceituna, o si requiere, además, el concurso de una actividad enzimática, se estudió si la temperatura a la que está sometido el fruto previamente al proceso de extracción afectaba a la

intensidad de amargor del aceite. El ensayo se realizó comparando la intensidad de amargor, medida sensorialmente, de las aceitunas ‘Picual’ no tratadas o previamente expuestas a un tratamiento de 80 °C durante 12 horas y de los aceites que se obtuvieron de ambas.

II. 10. TRATAMIENTOS FÍSICOS REALIZADOS SOBRE LA ACEITUNA PARA LA DISMINUCIÓN DEL AMARGOR EN EL ACEITE VIRGEN

II. 10. 1 Tratamientos térmicos

II. 10. 1. 1. Tratamiento en cámaras termostatzadas

II. 10. 1. 1. 1. Refrigeración a 5 °C

Aunque ya se ha demostrado que la conservación a 5 °C de la aceituna por un periodo de 30 días permitía obtener un aceite con un nivel de calidad similar al extraído inicialmente (Gutiérrez et al., 1992; García et al., 1996a; García et al., 1996b), nada se ha publicado aun sobre el efecto que este tipo de tratamiento poscosecha ejerce sobre la presencia del atributo amargo en los aceites. En esta Tesis se ha abordado también esta estrategia sólo a escala de laboratorio, utilizando las variedades ‘Manzanilla’, ‘Picual’ y ‘Verdial’. Para ello, se conservaron a 5 °C un total de 100 kg de aceituna de cada variedad, distribuidos en 8 cajas perforadas de plástico con capacidad de 12 kg por un periodo de hasta 8 semanas. Semanalmente se sacaba una de las cajas, se repartía su contenido en 3 muestras de 4 kg, que eran después procesadas separadamente para la extracción física del aceite. Previamente a la conservación, se procesó igualmente una muestra similar, que sirvió de control (tiempo 0 de conservación). Tras evaluar el rendimiento graso, el aceite obtenido se conservó en atmósfera de N₂ a -20 °C hasta su posterior análisis.

II. 10. 1. 1. 2. Calentamiento en atmósfera de aire

Con el objeto de verificar si un periodo de calentamiento suave previo al procesamiento del fruto conseguía reducir la intensidad del amargor del aceite virgen obtenido del mismo, sin alterar su calidad, se calentaron por triplicado muestras de 5 kg de aceitunas sanas con un Índice de Madurez medio de ‘1’, valores medios de IC de 31,70 y 25,80 y de dureza de 47,70 y 44,70 N/cm², respectivamente para las variedades ‘Manzanilla’ y ‘Verdial’ en cámaras termostatzadas a temperaturas de 30, 40, 45 y 50 °C durante 24 horas (‘Manzanilla’) y durante tiempos de 0, 24, 48 y 72 horas a 40 °C (‘Verdial’). Posteriormente, fue extraído físicamente el aceite de las muestras y conservado en frío con atmósfera de

nitrógeno hasta que se pudieron analizar, tanto sus parámetros físico-químicos y sensoriales de calidad, como su contenido en pigmentos y polifenoles.

II. 10. 1. 1. 3. Calentamiento en atmósfera modificada

También fue estudiado el efecto de la modificación de la atmósfera de conservación del fruto, combinado con el tratamiento térmico sobre la calidad de sus aceites. En este ensayo se empleó la variedad 'Lechín'. Las muestras de 2 kg de aceituna seleccionada con un índice de maduración medio de '1,5' se dispusieron en envases de cristal con capacidad para 3,8 litros y adaptados para el cierre hermético. Las muestras se dispusieron de tres formas distintas: Con el envase abierto, manteniendo una atmósfera normal de aire; con el envase cerrado para inducir la formación de una atmósfera modificada pasiva, con altos niveles de CO₂ y bajos en O₂, provocada por la propia respiración del fruto y, finalmente, con el envase cerrado y la adición de 30 ppm de etileno. Las muestras, por triplicado, se mantuvieron durante 72 horas a 20 o 40 °C, excepto la muestra inicial que fue procesada inmediatamente sin ningún tipo de tratamiento. Antes de abrir los recipientes, se midió la concentración gaseosa presente en la atmósfera de los mismos. La concentración de CO₂ y O₂ fue determinada por cromatografía gaseosa, inyectando una muestra de 150 µL de la atmósfera contenida en el envase en un cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 (Hewlett-Packard, Santa Clara, USA), equipado con un detector de conductividad y una columna de tamiz molecular (80-100 mallas) Carbosieve S2 (Supelco Inc., Bellefonte, USA) de 3 m de longitud y 3 mm de diámetro interno. El inyector y el detector se mantuvieron a 250 °C y la temperatura del horno fue de 33 y 225 °C para el O₂ y el CO₂ respectivamente (Pérez et al., 1997). La concentración de etileno se determinó usando el mismo aparato y el mismo volumen de muestra, pero empleando una columna de alúmina F1 activada con 1m de longitud y 3 mm de diámetro. El inyector y el detector se mantienen a 150 °C y el horno a 100 °C. Tras los tratamientos, se procedió a la extracción física del aceite de las muestras. El aceite obtenido se guardó en atmósfera de nitrógeno a -20 °C hasta su posterior análisis.

II. 10. 1. 2. Inmersión en agua caliente

La inmersión en agua caliente permite una más rápida y efectiva transmisión del calor a la muestra, permitiendo la reducción del tiempo de ensayo. El desarrollo de este tipo de tratamiento se llevo a cabo en tres fases. En primer lugar se estudio si el tratamiento de inmersión, aplicado al fruto, era capaz o no de controlar el amargor del aceite. Para ello, se realizaron ensayos preliminares en que se emplearon dos variedades de las que se disponía:

‘Pico Limón’ y ‘Picual’ (IM ‘2,0’). Una vez comprobada la viabilidad del tratamiento, y que éste no afectaba significativamente a la calidad comercial del aceite, se seleccionaron el tiempo de tratamiento y el rango idóneo de temperaturas, con los que conseguir una reducción efectiva de la intensidad del amargor. Para ello se realizaron otros ensayos a tiempos y temperaturas crecientes, empleando sólo la variedad ‘Picual’ con IM de ‘1,0’. En una segunda fase, además de a la variedad ‘Picual’, se hizo extensivo el estudio a las variedades ‘Manzanilla’ y ‘Verdial’ (IM ‘1,0’), contando ya con la base aportada por el estudio realizado anteriormente, que permitió fijar el tiempo de 3 minutos como el más conveniente para la realización de los tratamientos, mientras que la temperatura de ensayo se restringió a un abanico, todavía amplio, entre 55 y 75 °C. En estos ensayos se hizo especial hincapié en la repercusión de los tratamientos aplicados sobre la calidad de los aceites obtenidos, incluyendo el efecto del mismo sobre su composición fenólica. Finalmente, a la vista de los resultados obtenidos, se abordó una tercera fase que consistió en la realización de ensayos a escala industrial en la Almazara Experimental del Instituto de la Grasa, para estudiar la adaptabilidad del tratamiento a las líneas de procesado actualmente utilizadas por la industria.

II. 10.1. 2. 1. Tratamientos a escala de laboratorio

II. 10. 1. 2. 1. 1. Ensayos preliminares

Muestras de 2 kg de aceitunas sanas de la variedad ‘Picual’ con un Índice de Madurez medio de ‘1’, se colocaron en 75 bolsas de tipo malla. Tres de ellas constituyeron el testigo o tiempo 0 de tratamiento. Las restantes, distribuidas en 4 grupos de 18 bolsas, se sumergieron en baños de agua a 45, 50, 55 o 60 °C, respectivamente. Después, se fueron sacando de cada baño las bolsas en grupos de tres a tiempos de 3, 5, 10, 20, 30 y 60 minutos, siendo a continuación procesadas independientemente utilizando la extractora ‘Abencor’. Los aceites producidos se conservaron en atmósfera de N₂ a -20 °C hasta su posterior análisis.

II. 10. 1. 2. 1. 2. Identificación de la temperatura idónea de tratamiento

De un total de 100 kg de aceitunas sanas de las variedades ‘Manzanilla’, ‘Picual’ y ‘Verdial’ con un Índice de Madurez medio de ‘1’ fueron tomadas aleatoriamente 18 muestras de 3,5 kg de frutos por cada variedad, que fueron introducidos en bolsas de tipo malla similares a las usadas en el ensayo anterior. Las muestras fueron también aleatoriamente distribuidas en 6 grupos de triplicados. Cinco de estos grupos fueron sumergidos durante 3

minutos respectivamente en baños de agua a temperaturas que oscilaron, según la variedad empleada, entre 60 y 72 °C. Posteriormente, el aceite contenido en las muestras era inmediatamente extraído y, tras la medida del rendimiento, almacenado en frío (-20 °C) en atmósfera de N₂ hasta su análisis. El sexto triplicado fue procesado directamente sin ningún tipo de tratamiento, constituyéndose en el control del ensayo.

II. 10. 1. 2. 2. Tratamientos térmicos a escala industrial

En los ensayos industriales se emplearon aceitunas con un IM entre ‘0,5’ y ‘3,5’ de las variedades: ‘Manzanilla’ (procedentes de Villarrasa y Dos Hermanas), ‘Picual’ (Cabra) y ‘Verdial’ (Villarrasa). La unidad de muestra fue de 500 kg, la cantidad mínima de molienda precisa para el correcto funcionamiento de la extractora industrial de dos fases de la Almazara Experimental del Instituto de la Grasa. Para la realización de estos tratamientos se utilizó una escaudadora industrial (Desarrollos Tecnológicos Bando, Dos Hermanas, Sevilla) del Instituto de la Grasa, utilizada habitualmente para la pasteurización de aceitunas de mesa. El aparato de acero inoxidable, consta de un tambor rotatorio dotado en su interior de un tornillo sinfin, que arrastra a los frutos, manteniéndolos sumergidos en un baño termostatzado de agua (**Foto 5**). La velocidad del tratamiento se regulaba, de manera que el tiempo total de paso de los frutos por el baño fuera de 3 minutos, mediante un reductor de velocidad mecánico. La temperatura del agua se ajustaba mediante la inyección del vapor procedente de una caldera con una válvula regulable.



Foto 5- *Pasteurizadora de aceitunas de mesa utilizada para el tratamiento térmico a escala Industrial*

La capacidad de producción se ajustó en función de la entrada del fruto en la máquina a razón de 500 kg/h. La aceituna tratada se recogía en cajas de plástico de 25 kg de capacidad y se procesaba inmediatamente en la Almazara, o bien era guardada a temperatura ambiente

durante 24 horas antes de su procesamiento. En cada ensayo se realizó un control, procesando una cantidad similar de aceitunas, sin que se les aplicara ningún tipo de tratamiento previo.

II. 11. ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE CALIDAD DEL ACEITE

II. 11. 1. Parámetros físico-químicos

II. 11. 1. 1. Determinación del grado de acidez

La presencia de acidez libre en un aceite es una excelente medida de su grado de deterioro hidrolítico. Representa el porcentaje de ácidos grasos libres que contiene un aceite o grasa expresándose como ácido oleico. Se debe a la rotura de los enlaces de tipo éster entre la glicerina y los ácidos grasos que componen las moléculas básicas del aceite, los triglicéridos. Esta rotura puede estar motivada por dos causas no necesariamente excluyentes: Una hidrólisis química favorecida por un exceso de humedad en el aceite y/o a un origen enzimático debido a la actividad del enzima lipasa, ya sea de la propia aceituna o, más probablemente, de microorganismos parásitos que hubieran infectado al fruto de forma previa a su molturación. Una elevada acidez indica que un aceite está alterado a consecuencia de errores en una o más fases en su proceso de elaboración y manipulación comercial, aunque principalmente da a entender que el fruto de procedencia sufrió un serio deterioro por podredumbre (Gutiérrez et al., 1992).

Para la realización de este método se pesan en un matraz Erlenmeyer de 250 mL unos 10 gramos de aceite por replicado con precisión de 0,01 g. Se añaden 50 mL de una mezcla de alcohol: éter etílico (1:1, v/v), previamente neutralizada con sosa. Se agita hasta la disolución completa de la grasa. Se le añaden unas gotas de fenolftaleína al 1 % y se valora con la disolución de hidróxido potásico de 0,1 N. Hasta que una sola gota produzca un viraje débil del indicador (la coloración rosa de la fenolftaleína debe permanecer al menos durante 10 segundos). (Reglamento CEE/2568/91, Anexo 2)

La acidez, expresada en porcentaje de ácido oleico se calcula por la fórmula:

$$\text{Acidez (\% ácido oleico)} = \frac{V \times N \times P_m}{10 \times P}$$

Siendo:

V: Volumen consumido, en mL, de hidróxido potásico (KOH)

N: Normalidad del hidróxido potásico (KOH)

P: Peso en gramos del aceite

P_m: Peso molecular del ácido Oleico (282 g/mol)

II. 11. 1. 2. Determinación del índice de peróxidos

Los peróxidos son los primeros productos que se forman en el proceso de oxidación de los aceites, por lo cual su cuantificación determina el grado de su oxidación primaria. Tiene importancia su determinación en cuanto que el valor máximo de contenido que deben presentar los aceites de oliva vírgenes está normalizado (< 20 para el extra), pero realmente la información que ofrece es muy limitada. Un valor bajo en la presencia de estos compuestos no implica necesariamente que el aceite no presente un nivel elevado de oxidación, debido a que los peróxidos se han podido descomponer en otras moléculas.

El procedimiento consiste, para cada replicado, en pesar un matraz de 250 ml de cierre esmerilado con su tapón previamente limpio y seco, al que se le añaden de 1,8 a 2.2 gramos de aceite lo más rápido posible. Se disuelven en 25 mL de una mezcla exenta de oxígeno de cloroformo: ácido acético (10:15, v/v). A continuación se le añade 1 mL de solución saturada de yoduro potásico. Se cierra rápidamente el matraz, se agita durante 1 minuto y se mantiene en reposo en la oscuridad durante 5 minutos a una temperatura comprendida entre 15 y 25 °C. Transcurrido este tiempo se añaden 75 mL de agua destilada y se valora (agitando al mismo tiempo vigorosamente) el yodo liberado con una solución de tiosulfato sódico 0,002 N, para aceites con índices inferiores o iguales a 20, y de 0,01 N para aceites con índices más elevados, utilizando la solución de almidón como indicador. El viraje se reconoce cuando cambie el color de violeta a blanco sucio. Simultáneamente, como control, se realiza un ensayo en blanco, sin muestra de aceite. Si la valoración de éste requiere más de 0,05 mL de tiosulfato sódico 0,01 N, se debe repetir el ensayo sustituyendo los reactivos. (Reglamento CEE/2568/91, Anexo 2)

El índice de peróxidos (IP), expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por kg. de aceite y se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$\text{I.P (meqO /kg)} = \frac{\text{V} \times \text{N} \times 1000}{\text{P}}$$

Siendo:

I.P: Índice de peróxidos (meqO /kg de aceite)

V: Volumen en mL de tiosulfato sódico gastado en el ensayo.

N: Normalidad exacta de la solución de tiosulfato sódico empleada

P: Peso en gramos de aceite

II. 11. 1. 3. Absorción espectrofotométrica en la región ultravioleta

La absorbancia espectrofotométrica en la región ultravioleta puede proporcionar indicaciones sobre la calidad de una materia grasa, su estado de conservación y las modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos. Las absorciones en las longitudes de onda de 232 y 270 nm se deben a la presencia de sistemas diénicos y triénicos conjugados y compuestos de tipo carbonilo (aldehídos y cetonas), respectivamente. Es decir, compuestos que se desarrollan tanto en las fases iniciales como en las finales del proceso de oxidación. En consecuencia, estos índices dan una mejor idea que el IP del deterioro oxidativo que presenta un aceite. El procedimiento consiste en pesar de cada replicado de aceite 20-30 mg (para el K_{232}) y 200-300 mg (para el K_{270}) en matraces aforados de 10 mL que se completan con ciclohexano y se homogeneizan. La solución resultante debe estar perfectamente clara (si presentara opalescencia o turbidez, se debería filtrar con papel de filtro). Después de hacer una lectura en blanco con ciclohexano, se llena una cubeta de cuarzo para espectrofotometría ultravioleta con la solución obtenida y se mide la absorbancia a las longitudes de onda de 232 y 270 nm, respectivamente. Los valores de extinción obtenidos deben estar comprendidos en el intervalo entre 0,1 y 0,8; en caso contrario es necesario repetir la medida utilizando soluciones más concentradas o más diluidas según el caso (Frías et al., 1991).

Los valores de estas absorciones se expresan como coeficientes de extinción específica a 232 y 270 nm (K_{232} y K_{270}), que se calculan como sigue:

$$K_{\lambda} = \frac{\text{Absorbancia } (\lambda)}{P} \times 100$$

Siendo:

(λ): La longitud de onda utilizada (232 ó 270),

P: el peso, en miligramos de la muestra.

II. 11. 1. 4. Estabilidad oxidativa ‘Rancimat’

La estabilidad oxidativa de un aceite de oliva virgen es un parámetro de calidad no contemplado en la normativa que regula las categorías de calidad de los aceites vírgenes, pero que va cobrando creciente importancia sobre todo para los aceites de fritura. Se define como el tiempo necesario para que un aceite comience a presentar síntomas de enranciamiento (Läubli y Bruttel, 1986). Desde el punto de vista del consumidor es la valoración físico-química de comprensión más fácil. Es más evidente para cualquier ciudadano en general, no

necesariamente versado en el mundo del aceite, que una mayor estabilidad supone un mayor tiempo de utilización del producto. En este trabajo se ha empleado el método 'Rancimat', según describieron Gutiérrez et al. (1989). Este método ofrece una serie de ventajas: su automatismo, que hace mínima la necesidad de atención durante el curso de la determinación, el poder realizar simultáneamente seis determinaciones, el menor consumo de reactivos y el apreciable ahorro de tiempo.

Consiste en someter una muestra de $3,0 \pm 0,01$ g de aceite en el tubo de reacción del aparato Rancimat 679 (Metrohm Herisan, Suiza) a una oxidación forzada mediante una corriente de aire seco situada entre 15 y 20 L/h y a una temperatura definida de 100 °C. Cada muestra se pesa en el tubo de reacción, el cual se coloca en el bloque de calentamiento. Se conectan al surtidor de aire y a las vasijas de medida que contiene 75 cc de agua desionizada y donde van introducidos los electrodos. En esta vasija, con el tiempo, se desprenden productos volátiles del aceite, que son retenidos por el agua destilada y cuya acumulación se registra automáticamente, por la medida de la conductividad del agua. Se obtiene así una curva en donde se visualiza como va transcurriendo la oxidación del aceite. Con el tiempo la curva presentará una variación brusca de pendiente, cuando el periodo inductivo pase a la fase de oxidación rápida. El tiempo en horas transcurrido desde el inicio del proceso hasta el punto de mayor curvatura de esta curva experimental (fin del proceso inductivo) es considerado el valor de estabilidad ante la oxidación del aceite que se analiza.

II. 11. 1. 5. Determinación espectrofotométrica del contenido en carotenos y clorofilas

El contenido en pigmentos como base determinante de la coloración de los aceites se ha propuesto para su utilización como criterio para evaluar la calidad de los mismos, especialmente para la detección de mezclas con aceites de semillas o con aceites de oliva refinados parcialmente (Mínguez-Mosquera et al., 1990).

El procedimiento que se empleó fue el siguiente: En un matraz aforado de 25 mL con cierre esmerilado, se pesaban aproximadamente 7,5 g de muestra, con la precisión del miligramo; se disolvían en ciclohexano hasta el enrase, se agita muy bien para que la mezcla esté bien homogenizada. Esta disolución se introduce en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso, transparente en la región del espectro visible. Se efectúa, previamente, un blanco con ciclohexano puro, y se realiza la medida a la longitud de onda deseada. Las lecturas de extinción deberán estar comprendidas entre las 0,2 y 0,8 unidades de absorbancia a 472 nm, y a 670 nm para los carotenos y las clorofilas, respectivamente. Se utilizó un espectrofotómetro

Beckman DU 640. Los resultados se expresan en mg/kg de aceite. Para el cálculo de la cantidad de clorofila presente en la muestra se utiliza la siguiente fórmula:

$$C = \frac{A_{670} \times V_f}{E_{1\%} \times P} \times 1000$$

Siendo:

- C: Concentración de clorofilas (mg/kg)
- A₆₇₀: Lectura de la absorbancia a la longitud de onda de 670 nm
- V_f: Volumen final de ciclohexano
- E_{1%}: Coeficiente de extinción específica de clorofila igual a 613
- P: Peso de la muestra (g)

Para el cálculo del contenido en carotenos:

$$C = \frac{A_{472} \times V_f}{E_{1\%} \times P} \times 1000$$

Siendo:

- C: Concentración de carotenos (mg/kg)
- A₄₇₂: Lectura de la absorbancia a la longitud de onda de 472 nm
- V_f: Volumen final de ciclohexano
- E_{1%}: Coeficiente de extinción específica de β-caroteno igual a 2000
- P: Peso de la muestra (g)

II. 11. 1. 6. Composición en ácidos grasos

Los aceites vegetales y grasas animales presentan una composición acídica específica, que permite determinar mediante su análisis el origen de la muestra. En el aceite de oliva ésta composición es variable y depende de diversos factores como la variedad, medio de cultivo, maduración el fruto, etc. (Pérez et al., 1999). Las determinaciones analíticas se efectúan mediante cromatografía de gases después de obtener los ésteres metílicos. Estos se obtienen por transesterificación en metanol con potasa metanólica en frío (Cert et al., 1996b). El cromatógrafo utilizado fue un Hewlett Packard 5890 Serie II, equipado con columna capilar de sílice fundida Omegawax Tm 320, de 30 m de longitud, 0,32 μm de diámetro interno y película de 0,25 μm de espesor, y detector de ionización de llama (FID). Para su determinación se pesa 0,1g de aceite, se disuelve en 3 mL de heptano y se añade 0,5 mL de potasa metanólica 2N. A continuación se agita y se deja aproximadamente 30 minutos. Se recoge el sobrenadante y se inyecta 1 μL en el cromatógrafo de gases, obteniéndose los porcentajes de los distintos ácidos grasos.

Los análisis se llevaron a cabo con una rampa de temperatura que comenzó con 165 °C durante 4 minutos, un incremento de 2 °C por minuto hasta alcanzar los 200 °C, y un mantenimiento de esta temperatura durante 15 minutos. La temperatura del inyector fue de 200 °C, y la del detector de 250 °C, con un flujo de gas auxiliar (N₂) de 30 mL/min, flujo de split de 70 mL/min y una relación de split de 1/40.

El porcentaje de cada ácido graso se determina según:

$$\% \text{ Ácido graso } x = \frac{(A_x \times 100)}{\sum A}$$

Donde:

A_x. Área del pico del ácido graso x.

∑A. Suma de las áreas de todos los ácidos grasos.

II. 11. 1. 7. Determinación de la composición y del contenido en esteroides mediante cromatografía de gases con columna capilar

El presente método describe el procedimiento para la determinación del contenido en esteroides individuales y totales de las materias grasas (Reglamento CEE/2568/91, Anexo V).

Procedimiento

Preparación de la Fracción insaponificable:

Antes de pesar el aceite en un matraz de 250 mL se añade 1 mL de solución de patrones (eneicosanol (C₂₁OH) y α-colestanol en cloroformo). Se evapora el disolvente en el que van los patrones y se pesan 5 g de aceite con exactitud de mg. Se le añaden a continuación 50 mL de solución alcohólica 2N de KOH (13 g + 20 mL de agua + 80 mL de alcohol) y se tiene a ebullición 1 hora. Más tarde, se le añade agua destilada. Se transfiere todo a un embudo de decantación de 500 mL. Las extracciones se realizan con éter etílico (3 veces × 80 mL), los extractos se combinan en otro embudo de decantación. Se lava varias veces con agua hasta pH neutro. La solución de éter se pasa por un filtro que contiene sulfato sódico anhidro. A continuación se elimina el disolvente en una rotavapor y se pesa.

Expresión de los resultados:

$$\% \text{ Insaponificable} = \frac{\text{(gramos obtenidos)}}{\text{(gramos de aceite pesado)}} \times 100$$

Para la determinación cuantitativa de los componentes del insaponificable del aceite es necesario, una vez obtenido éste, proceder a eliminar las interferencias, desarrollando mediante cromatografía en placa fina (CCF).

Fraccionamiento del insaponificable: Desarrollo en CCF

La CCF se realizó sobre placas de vidrio recubiertas de sílica gel 60, de 2,25 mm de espesor (Merck), desarrollando dos veces con una mezcla hexano-éter (65/35).

Preparación de placas para el aislamiento del insaponificable

Las placas de sílice deben recubrirse previamente con una solución de potasa en etanol, para que retenga en su origen la parte de ácidos grasos libres y jabones que no han sido eliminados y así evitar su interferencia en la separación de los esteroides.

Procedimiento

Se pesan 2,8 g de potasa a los que se les añaden 250 mL de alcohol etílico. Esta solución se pone en una bandeja en la que se sumerge la placa cromatográfica (20×20) durante 1 minuto. A continuación se seca al aire durante, al menos, 1 hora y seguidamente se activa en una estufa durante 1 hora a 105 °C.

Desarrollo cromatográfico de la fracción insaponificable

El insaponificable obtenido, una vez pesado, se redisuelve en 1,5 mL de cloroformo y se siembra en la placa. Ésta se desarrolla en una cubeta cromatográfica con hexano: éter (65:35, v/v); con dos desarrollos, el primero hasta la mitad de la placa y el segundo completo. Una vez terminado el segundo, se seca al aire y se revela pulverizando con la solución 2,7-diclorofluoresceína (**Figura 2**).

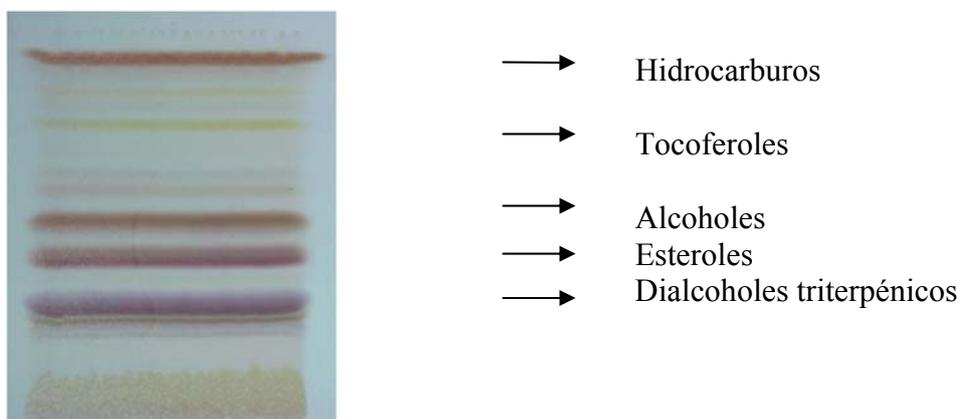


Figura 2.- Cromatografía en placa fina de la fracción insaponificable de un aceite

Una vez realizado el desarrollo de la placa, se aíslan las bandas correspondientes a los compuestos o grupos de compuestos a determinar, se derivatizan (silanzando) y se inyectan en el cromatógrafo de gases con el método correspondiente a cada uno de ellos.

Aislamiento y derivatización de:

1. Alcoholes + metilesteroles.
2. Esteroles + eritrodiol y Uvaol.

Las bandas correspondientes a estas dos fracciones se raspan y se ponen en un filtro. Se lava 1° con 10 mL de cloroformo caliente; 2° se lava dos veces con 10 mL de éter etílico. Se lleva a sequedad mediante rotavapor. A continuación se añaden 200 μ L de reactivo silanzante (Trimetilcloroxilano/hexametil-disilazano en piridina) y se inyectan en el cromatógrafo de gases con las condiciones de alcoholes o esteroles.

Identificación de los picos

Para la identificación de los diferentes picos se utilizan los tiempos de retención de los esteroles analizados en las mismas condiciones. La elución de los esteroles se efectúa en el orden siguiente: colesterol, brassicasterol, 24-metilencolesterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, Δ -7campesterol, Δ -5,23-estigmastadienol, clerosterol, β -sitosterol, sitostanol, Δ -5-avenasterol, Δ -5,24- estigmastadienol, Δ -7-estigmastenol, Δ -7-avenasterol.

Condiciones cromatográficas para la determinación de alcoholes:

Columna: SPB5

Temperatura de horno: 215-290 °C a 2 °C/min

Tiempo a la Temperatura inicial: 5 min

Tiempo a la Temperatura final: 8 min

Inyector: 300 °C

Detector: 300 °C

Tiempo de análisis: 50 min

Condiciones cromatográficas para determinación de esteroles:

Columna: SPB5

Temperatura horno: 265 °C

Inyector: 300 °C

Detector: 300 °C

Tiempo de análisis: 30 min

Determinación cuantitativa

Calcular las áreas de los picos del α -colestanol y de los esteroides utilizando el integrador. El coeficiente de respuesta (CPG) para el α -colestanol debe considerarse como 1. Se registra el contenido de cada uno de los esteroides en mg/kg de materia grasa y, su suma como "esteroides totales".

Fórmula para calcular el contenido de cada uno de los esteroides, expresado en mg/kg de materia grasa:

$$\text{Esterol } x = \frac{Ax.ms}{As.m} \times 100$$

Siendo:

Ax: área del pico del esteroil x, en milímetros cuadrados,

As: área del pico del α -colestanol, en milímetros cuadrados.

ms: peso de α -colestanol añadido, en miligramos,

m: peso de la muestra tomada para la determinación en gramos.

El porcentaje de cada uno de los esteroides simples es la razón entre el área del pico correspondiente y la suma de las áreas de los picos de los esteroides.

$$\% \text{ Esterol } x = \frac{Ax}{\sum A} \times 100$$

Siendo:

Ax: Área del pico de x,

$\sum A$: Suma de las áreas de todos los picos.

II. 11. 1. 8. Determinación del contenido en eritrodil y uvaol

La determinación del eritrodil y uvaol se realizó siguiendo el ANEXO VI del Reglamento 2568/91 de la CEE (1991), mediante cromatografía gaseosa capilar. El eritrodil, entendido corrientemente como conjunto de los dioles eritrodil y uvaol, es un componente del insaponificable, característico de algunos tipos de materias grasas.

Procedimiento

Se realiza tal como se indica en el Anexo empleado en la determinación de los esteroides. Una vez inyectada la muestra, dejar que se desarrolle el proceso hasta que se produzca la elución de los esteroides presentes, el eritrodiol y el uvaol. Se identifican los picos y se calculan sus áreas de la misma forma que para los esteroides

Expresión de los resultados

$$\text{Eritrodiol, \%} = \frac{A_1 + A_2}{A_1 + A_2 + \Sigma A_{\text{esteroides}}} \times 100$$

Siendo:

A_1 : Área del pico del eritrodiol,

A_2 : Área del pico del uvaol,

$\Sigma A_{\text{esteroides}}$: Suma de las áreas de los esteroides presentes.

Se cuantifica el eritrodiol y el uvaol como porcentaje referido a la totalidad de los esteroides.

II. 11. 1. 9. Determinación del contenido en ceras mediante cromatografía de gases con columna capilar

El presente método, descrito en la normativa del Reglamento europeo (UE, 2568/91. Anexo IV) permite la determinación del contenido en ceras de los aceites de oliva. Las ceras son ésteres de ácidos grasos con alcoholes grasos o diterpénicos con un número de carbonos comprendidos entre 36 y 46. Este método se aconseja como un medio apto para diferenciar el aceite de oliva de presión del obtenido a partir del orujo de oliva (aceite de orujo). Para su análisis se realiza un fraccionamiento del aceite mediante cromatografía con columna de gel de sílice hidratado, al que se habrá añadido una solución de laurilaraquidato como patrón interno.

Procedimiento:

Pesar con exactitud en el matraz de 25 mL 0,5 g de aceite, añadir 1 mL de solución de araquidato de laurilo, al 0,1 % (m/V) en hexano (patrón interno). Se agita para disolver y se vierte cuantitativamente el contenido en la columna; la elución se realiza con la mezcla hexano:éter (98,5:1,5, v/v) a un ritmo de aproximadamente 2 mL por minuto. Se utiliza el indicador Sudán I al 1% en hexano para impedir la incorporación de triglicéridos (León y

Cert, 1994), y a continuación se evapora el eluido en rotavapor; por ultimo se disuelve en 5 mL de heptano del que se inyecta 1 µL en el cromatógrafo gaseoso.

El cromatógrafo utilizado en los trabajos experimentales fue un Hewlett Packard 5890 Serie II, equipado con columna capilar de relleno fase SPB™-5 de 15 m de longitud, 0,32 mm de diámetro interno y película de 0,25 µm de espesor, y detector de ionización de llama (FID).

Los análisis se llevaron a cabo mediante inyección “on column” con una rampa de temperatura que comenzó a 70 °C, un incremento de 45 °C por minuto hasta alcanzar los 180 °C, e incremento de 5 °C por minuto hasta alcanzar los 310 °C, temperatura que mantiene durante 15 minutos. La temperatura del inyector fue de 63 °C, y la del detector de 350 °C, con un flujo de gas auxiliar (N₂) de 30 mL/min.

La identificación de cada uno de los picos ha de efectuarse en función de los tiempos de retención y por comparación con mezclas de ceras analizadas en las mismas condiciones, de las que se conoce sus tiempos de retención. Determinar con ayuda del integrador las áreas de los picos del patrón interno y de los ésteres alifáticos de C40 a C46.

El contenido de cada uno de los ésteres, expresado en mg/kg de materia grasa, se calcula como sigue:

$$\text{Éster (mg/kg)} = \frac{\text{Ax} \cdot \text{ms} \cdot 1000}{\text{As} \cdot \text{m}}$$

Siendo:

Ax = Área del pico de cada uno de los ésteres, en milímetros cuadrados;

As = Área del pico del laurilaraquidato (patrón interno), en milímetros cuadrados;

ms = Peso del patrón interno, en miligramos;

m = Peso de la muestra, en gramos.

II. 11. 1. 10. Análisis de compuestos volátiles del aceite de oliva

La extracción de los compuestos volátiles responsables del aroma del aceite se llevó a cabo por duplicado mediante la utilización de la técnica de microextracción en fase sólida del espacio de cabeza (HS-SPME). Las muestras a analizar consistían en 0,5 g de aceite sellados en vial de 10 mL. Una vez conseguido el equilibrio del espacio de cabeza a 40 °C durante 10 minutos en placa calefactora, los compuestos volátiles se adsorbían con un fibra SPME del tipo DVB/Carboxen/PDMS (50/30µm) durante 50 minutos a la misma temperatura.

El análisis se llevó a cabo mediante HRGC por desorción directa de la fibra SPME en el inyector a 250 °C en un equipo Hewlett-Packard 5890 equipado con columna DB-Wax 20M (30 m x 0,25 mm) y detector de ionización de llama operando a 250 °C. Como gas portador se empleó nitrógeno y la temperatura de análisis consistió en isoterma a 40 °C durante 6 minutos, iniciando entonces una rampa de temperatura de 6 °C/min hasta 120 °C. Los compuestos volátiles que forman parte del aroma del aceite de oliva virgen fueron cuantificados a partir de curvas de calibrado calculadas para cada compuesto en aceite de girasol alto oleico redesodorizado. La identificación de los compuestos volátiles fue realizada mediante HRGC-MS en un cromatógrafo Fisons-8000 equipado con columnas del mismo tipo a la utilizada para los análisis y dos longitudes distintas (30 y 60 m), utilizando la librería Wiley/NBS y los tiempos de retención obtenidos con patrones puros.

II. 11. 1. 11. Determinación de Tocoferoles por HPLC

La determinación de los tocoferoles se realiza siguiendo la norma IUPAC 1992 (Método 2.432), cuyo objetivo es la determinación de tocoferoles y tocotrienoles en aceites vegetales y grasas. El aceite se disuelve en hexano y la disolución se introduce directamente en la columna de cromatografía para la separación individual de los tocoferoles. La detección se realiza mediante fluorescencia, aprovechando las propiedades fluorescentes que tienen estos compuestos, siendo diferentes al resto de otros componentes del aceite, ya que tienen una longitud de onda específica de emisión y de excitación (330 y 290 nm, respectivamente). Para su cuantificación se utilizan rectas de calibrado con cantidades conocidas de patrones puros.

Procedimiento:

En un matraz aforado de 10 mL se pesan aproximadamente 0,1 g de muestra, con la exactitud del miligramo, se disuelve en hexano y se enrasa. Finalmente, se inyectan 20 µL de esta disolución en el cromatógrafo líquido.

Condiciones cromatográficas:

Columna: Sílice (25 cm x 4mm d.i.) rellena de micro partículas con 5 µm de tamaño medio (Lichrospher 100, Lichrocart ®).

Bomba: Perkin-Elmer (Serie 400)

Fase móvil: Hexano/Isopropanol (99:1, v/v)

Detector: Fluorescencia (Shimadzu RF-535): λ_{exc} = 290 nm, λ_{em} = 330 nm

Inyección: Válvula Reodhyne (loop 20 µL)

Flujo: 1 mL/min

Tiempo de análisis: 15 min

Calibración: Se pesan, con exactitud del miligramo, 10 mg de tocoferol en un matraz aforado de 100 mL y se enrasa con hexano. Un volumen de 10 mL de esta disolución se llevan a sequedad y se redisuelven en 10 mL de metanol. Se introduce esta disolución en una cubeta de espectrofotometría y se determina la absorbancia a 292 nm. La concentración exacta de la disolución de tocoferol así preparada se determina mediante la siguiente fórmula:

$$C = \frac{A_{292}}{0,0076}$$

Donde:

C: Concentración de tocoferol (µg/mL)

A₂₉₂: Absorbancia a 292 nm

A continuación se procede a realizar diferentes disoluciones a partir de esta disolución madre y a inyectarlas en el cromatógrafo líquido y se determinan las correspondientes áreas. Introduciendo las áreas de las muestras en la ecuación siguiente se calcula la cantidad de tocoferol en la muestra de aceite, expresada en mg/kg.

$$C_X = \frac{C_P \cdot A_X \cdot P_P}{A_P \cdot P_X}$$

Donde:

C_X: Concentración α-tocoferol en la muestra (mg/kg)

C_P: Concentración Patrón (mg/kg)

A_X: Área de muestra

A_P: Área del patrón

P_P: Peso de aceite patrón (mg)

P_X: Peso de aceite de la muestra (mg)

II. 11. 1. 12. Determinación de fenoles por extracción en fase sólida y cromatografía líquida de alta eficacia

Para la extracción, separación y cuantificación de los derivados fenólicos componentes del aceite de oliva se utilizó el método de extracción en fase sólida (EFS) y cromatografía líquida (CLAE) propuesto por Mateos et al. (2001).

Procedimiento:

a) Preparación de los patrones internos

Se han utilizado como patrones internos para la cuantificación de las muestras una solución que contiene los ácidos *p*-hidroxifenilacético, en una concentración del orden de 10^{-2} mg/mL, y *o*-cumárico del orden de 10^{-3} mg/mL en metanol.

b) Aislamiento de la fracción fenólica

Para la separación de los fenoles del aceite de oliva se han empleado unas columnas de EFS con fase diol (Superclean, Normal Phase SPE tipo LC-Diol de 500 mg y 3 mL) que retienen los compuestos polares principalmente y más específicamente aquéllos que presentan grupos hidroxilo (**Figura 3**). Consiste en pesar 2,5 g de aceite con la exactitud del miligramo en un matraz cónico y se añaden 0,5 mL de la disolución que contiene los patrones citados anteriormente. A continuación se evapora el disolvente en un rotavapor a 40 °C bajo vacío y el residuo oleoso se disuelve en 6 mL de hexano. Seguidamente, se activan y se solvatan las columnas de extracción haciéndole pasar sin interrupción primero 6 mL de metanol y 6 mL de hexano, sin dejar secar en ningún momento. A continuación se adiciona la disolución oleosa sobre la columna, pasando el disolvente y quedando el aceite y los patrones retenidos en la fase sólida. Se lava la columna con dos porciones de 3 mL de hexano, limpiándola, así, de aquellos componentes más apolares, que hayan quedado retenidos en la misma, tales como TGs, ceras, tocoferoles e hidrocarburos. Después se pasan 4 mL de una mezcla de hexano/acetato de etilo (90:10, v/v) a través de la columna, eluyendo los compuestos más polares tales como TGs oxidados, esteroides y diglicéridos. No se recoge ninguno de estos eluidos. Se lava de nuevo el matraz inicial con 10 mL de metanol, que se hacen pasar por la columna, debiéndose recoger ahora el eluido resultante en otro matraz cónico. Se evapora el disolvente hasta sequedad en un rotavapor a temperatura ambiente y bajo vacío. El residuo resultante se extrae con 0,5 mL de metanol/agua (1:1, v/v) en un tubo de donde se tomará la

muestra para el fraccionamiento de los compuestos por CLAE. Se agita y deja en reposo durante 4 horas a temperatura ambiente.

c) Análisis por CLAE con detector UV-vis de tipo “Diodo en fila” (Diode array)

Transcurrido este tiempo se filtra la muestra y se toman 20 µL de la disolución incolora resultante que se inyectan en el inyector dotado de una válvula Rheodyne en un cromatógrafo Hewlett-Packard de la serie 1100 equipado con una columna Lichrospher 100RP-18 (4,0 mm de diámetro interno × 250 mm de longitud y 5 µm de diámetro de partícula) y con un detector de diodos en fila Ultravioleta / Visible. La elución se llevó a cabo a 30 °C con una velocidad de flujo de 1,0 mL/min usando como fase móvil una mezcla de agua: ácido acético (97:3, v/v) (solvente A) combinada con otra de metanol: acetonitrilo (1:1, v/v) (solvente B). El gradiente de solventes cambió desde 95 % (A) – 5 % (B) a 70 % (A) - 30 % (B) en 25 min, 60 % (A) – 40 % (B) en 10 min, 52 % (A) – 48 % (B) en 5 min, 30 % (A) – 70 % (B) en 5 min hasta el final. La cuantificación del ácido cinámico y los fenoles (excepto el ácido ferúlico) se ha realizado con la longitud de onda de 280 nm utilizando el ácido *p*-hidroxifenilacético como patrón interno. Las flavonas y el ácido ferúlico se han cuantificado con la longitud de onda de 335 nm (se obtienen cromatogramas con menos interferencias que a 280 nm y se comete menos error en la lectura de las áreas de los picos correspondientes), siendo el ácido *o*-cumárico el patrón interno utilizado. El factor de respuesta de los compuestos fenólicos se calcula a partir de los análisis de disoluciones preparadas, definido como:

$$F_R = \frac{P_X A_{PI}}{P_{PI} A_X}$$

Donde:

- F_R : Factor de respuesta respecto al patrón interno utilizado
- P_X : Peso de sustancia problema (mg)
- P_{PI} : Peso del patrón interno (mg)
- A_X : Área del pico cromatográfico de la sustancia problema
- A_{PI} : Área del pico cromatográfico del patrón interno

Para la cuantificación de los fenoles se utiliza la siguiente fórmula:

$$C_X = \frac{F_R P_{IS} A_X 1000}{A_{IS} P_a}$$

Donde:

C_X : Concentración de la sustancia problema (mg/kg)

P_{IS} : Peso del patrón interno añadido (mg)

A_X : Área del pico cromatográfico de la sustancia problema

A_{IS} : Área del pico cromatográfico del patrón interno (PI)

F_R : Factor de respuesta de la sustancia problema

P_a : Peso del aceite (g)

Aplicando esta fórmula, el resultado de cada fenol se expresa en mg/kg. Para la cantidad de los polifenoles totales, es más conveniente expresar los resultados en mmoles/kg dividiendo la concentración de cada compuesto por su peso molecular.

II. 11. 2. Valoración sensorial

El análisis sensorial fue realizado por un panel formado por de 3 a 8 catadores seleccionados y entrenados en la evaluación de calidad de aceites de oliva vírgenes, pertenecientes al panel analítico del Instituto de la Grasa. La valoración de la intensidad del amargor se realizó mediante una escala de intensidades estructurada de 6 puntos (de "0", ausencia absoluta del atributo en la muestra, a "5", máxima intensidad de amargor). Además, los catadores evaluaron la calidad absoluta del aceite de oliva virgen, usando una escala estructurada de 9 puntos (de "1", calidad pésima, a "9", calidad óptima). Los valores presentados de intensidad de amargor y valoración global en cada muestra se corresponden con la media de las valoraciones de los panelistas.

II. 12. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

Para saber si los tratamientos empleados inducían un efecto significativo en la variación de los parámetros estudiados se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos por randomización completa de datos. Cuando este análisis mostraba la existencia de un efecto significativo ($p \leq 0,05$) se comparaban las medias obtenidas para cada tratamiento mediante el cálculo de la diferencia mínima significativa, asimismo, con un nivel de significación del 5 %, aplicando el test de múltiple rango de Duncan. Tanto los tratamientos estadísticos citados como los estudios de correlación y de regresión múltiple, llevados a cabo en el desarrollo de sistemas objetivos para evaluar el grado de maduración del fruto, se realizaron automáticamente mediante el programa de estadística "Costat 5.01" (CoHort Software, Berkeley, USA).

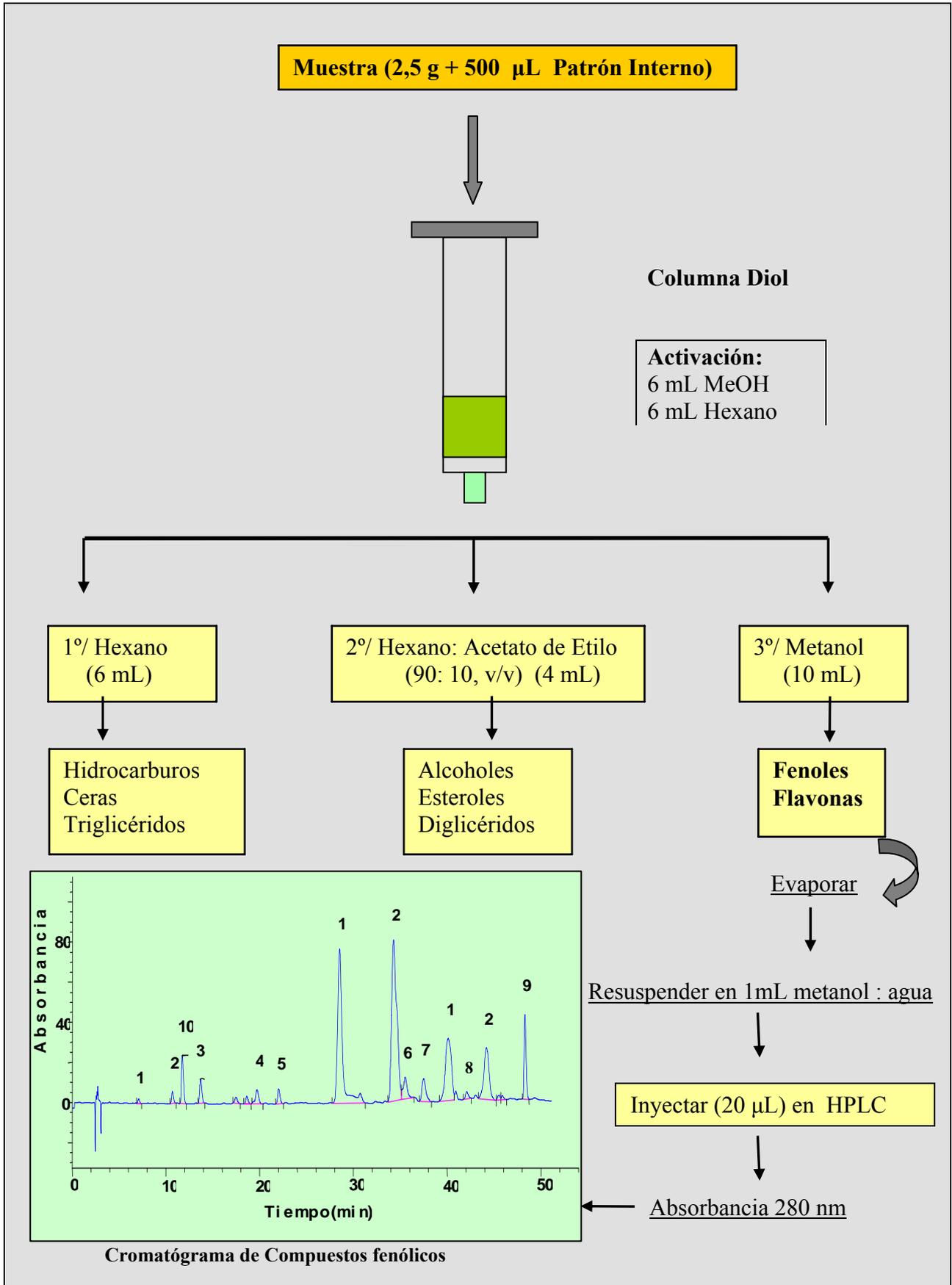


Figura 3.- Esquema del método de fraccionamiento de los derivados fenólicos

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

III. 1. DETERMINACIÓN OBJETIVA DEL GRADO DE MADURACIÓN DE LAS ACEITUNAS

La maduración de la aceituna se determina por el cambio de color que experimenta su epidermis y pulpa de acuerdo con una escala que, aunque está diseñada para ser lo más objetiva posible, depende finalmente de la decisión subjetiva del analista (Uceda y Frías, 1975). Por ejemplo, la distinción entre el color verde y el verde amarillo es muy difícil, así como la que hay entre el final del envero y el inicio del morado-negro o, a partir del ennegrecimiento de la epidermis, cuando se requiere cortar la aceituna para evaluar el color de la pulpa. Por otra parte, la etapa de inicio de envero incluye un amplio abanico de maduración, desde que el fruto está levemente teñido por antocianinas hasta que conserva sólo un resto de epidermis exhibiendo clorofilas y carotenos. Sin embargo, el índice de madurez (IM) evalúa todo este periodo con un mismo valor (“2”). En otros frutos, aprovechando los cambios fisiológicos que experimentan naturalmente durante su maduración, se han diseñado diferentes sistemas para evaluar el grado de avance de este proceso de manera objetiva. Así, en manzanas y peras se valora por el contenido en almidón, por la resistencia de su pulpa al penetrómetro o por el cambio de color medido objetivamente con un colorímetro (García y Streif, 1993). En el presente trabajo se ha considerado interesante comprobar si estos métodos podrían ser aplicables a la aceituna como una alternativa más precisa y objetiva al método tradicional. El color de la epidermis de la aceituna, medida por la fórmula cromática propuesta por Castellano et al. (1993), varió conforme avanzaba el tiempo de maduración siguiendo curvas sigmoidales del tipo Boltzman, tanto en los frutos de ‘Arbequina’ como en los de la variedad ‘Picual’ (**Figura 4**). Sin embargo, al principio del proceso madurativo la evolución de este parámetro siguió diferente perfil en ambas variedades. Las aceitunas ‘Arbequina’ exhibieron un rápido descenso de este índice de color, mientras que los frutos de la variedad ‘Picual’ mostraron una reducción más lenta del mismo. El índice de color monitorizó perfectamente las primeras etapas de la maduración de la aceituna, mientras el color de su epidermis iba perdiendo su tono verde inicial. Después de 55 días, desde que se consideró el inicio de la maduración del fruto, este índice fue adquiriendo un valor asintótico similar para ambas variedades, coincidiendo con el ennegrecimiento definitivo de la epidermis. En consecuencia, a partir de este punto esta fórmula cromática dejó de ser útil para estimar el grado de maduración.

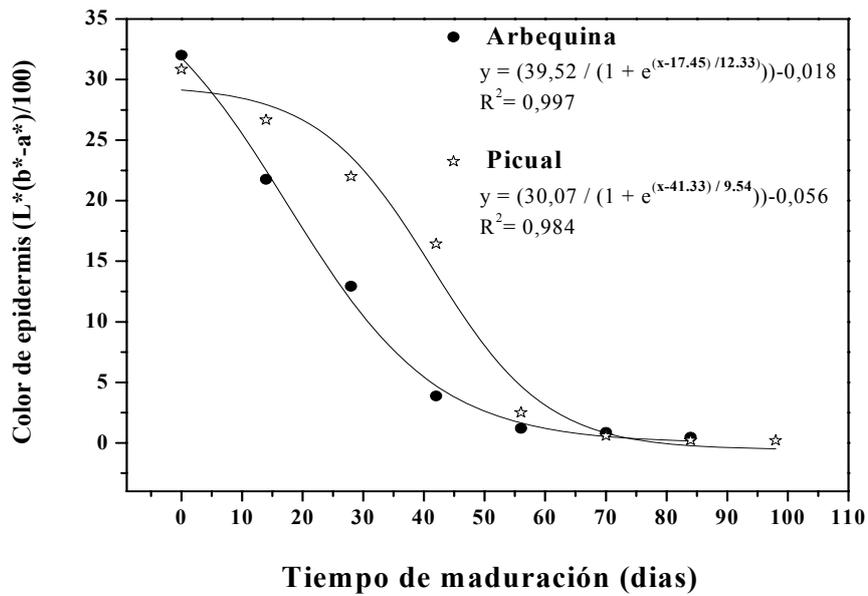


Figura 4.- Relación entre el tiempo de maduración y el color de la epidermis de dos variedades de aceituna. Las medidas comenzaron el 5 de Octubre (tiempo 0). Cada punto es la media de 300 replicados.

La dureza de las aceitunas se fue reduciendo de forma lineal hasta perder casi un 50 % de su valor inicial durante el periodo de maduración estudiado (**Figura 5**).

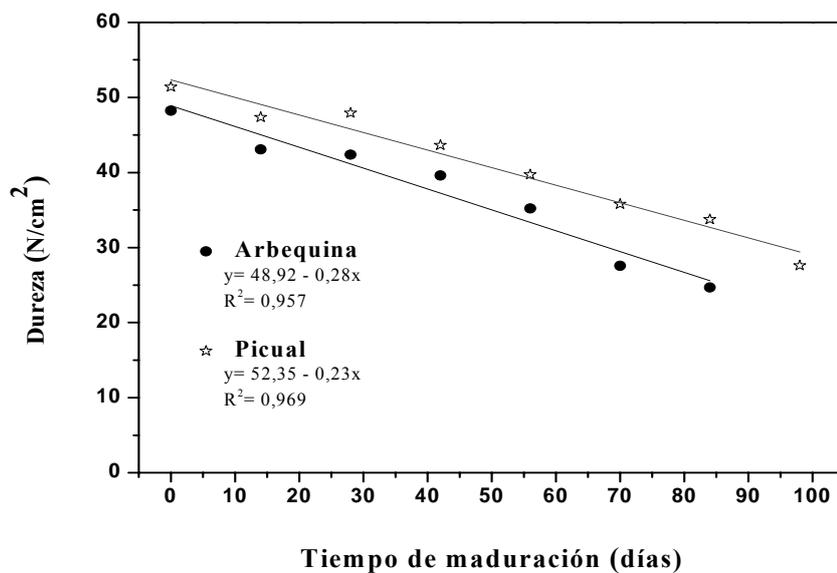


Figura 5.- Relación entre el tiempo de maduración y la dureza de dos variedades de aceituna. Las medidas comenzaron el 5 de Octubre (tiempo 0). Cada punto es la media de 300 replicados.

Los frutos de ‘Arbequina’ presentaron sistemáticamente una textura ligeramente inferior que los de la variedad ‘Picual’ desde el inicio hasta el final de su maduración, resultando que el ablandamiento de la aceituna ‘Picual’ se producía con un retraso de unos 10 días con respecto al de la variedad ‘Arbequina’. Tanto la evolución del color, como la de la dureza indicaron que el proceso madurativo se iniciaba antes en ‘Arbequina’. La medida de la dureza de los frutos permitió una buena estimación del nivel de maduración, ya que mostró cambios uniformes a lo largo de todas las fases de la maduración en las dos variedades estudiadas.

El índice de madurez mostró un incremento lineal de su valor durante la maduración de los frutos de ambas variedades (**Figura 6**), de manera análoga, pero inversa, a la evolución de su textura. Si se expresaran los valores de dureza como porcentajes de pérdida con respecto al valor inicial también se obtendría un índice de maduración, que como el IM, aumenta conforme transcurre este proceso. Además, con este formato se podría utilizar cualquier instrumento, unidad de medida o escala para la medida de este parámetro, pues los resultados se expresarían en porcentaje, independientemente de la técnica utilizada. Como en los casos del color o la dureza, la evolución del IM puso de manifiesto cómo las aceitunas ‘Arbequina’ maduraban antes que las de la variedad ‘Picual’, pero siguiendo una pendiente muy similar (0,056 y 0,050, respectivamente).

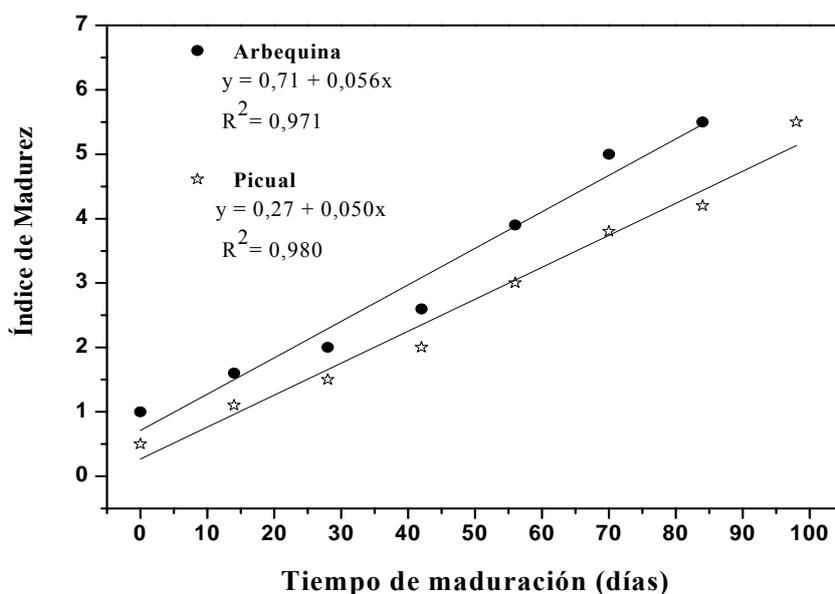


Figura 6.- Relación entre el tiempo de maduración y el Índice de Madurez de dos variedades de aceituna. Las medidas comenzaron el 5 de Octubre (tiempo 0). Cada punto es la media de tres replicados.

Si se estudia la evolución del color y la dureza frente al progreso del Índice de Madurez en las aceitunas de las variedades analizadas se puede observar la existencia de una estrecha relación entre estos parámetros (**Figuras 7 y 8**). Como ocurriera frente al progreso de la edad del fruto, las medidas del color de epidermis siguieron curvas sigmoideas conforme avanzaban los IM en las dos variedades estudiadas. La relación entre estos dos parámetros resultó ser más estrecha (valores superiores de R^2), que cuando se analizó la relación del color con el tiempo de maduración. Ello podría explicarse por el hecho de que, en definitiva, ambos parámetros están basados en el color de la epidermis, valorada objetiva o subjetivamente. En estas gráficas se pone claramente de manifiesto cómo este índice de color discrimina mejor que el IM el grado de maduración de la aceituna en las primeras fases de la misma, hasta que el fruto adquiere el color propio del envero (valor “3” del IM). En esta etapa cualquier aumento del mencionado índice se traduce en un descenso mucho más acusado de la fórmula cromática. Este sistema corrige el defecto del IM en valorar de manera estructurada y discontinua, usando 4 puntos (valores desde “0” hasta “3”) las etapas iniciales de la maduración de la aceituna, considerando de la misma forma el valor “0”, cuyo tiempo de permanencia en la epidermis del fruto es muy limitado, desde que éste adquiere su tamaño definitivo, y el valor “2” que se prolonga normalmente mucho más tiempo. Por otra parte, la difícil discriminación entre los índices “0” y “1” se realiza perfectamente por este sistema y el valor único de “2” se traduce en un amplio abanico de valores. Sin embargo, a partir del envero los valores cromáticos tienden a un valor asintótico y pierden cualquier utilidad para evaluar el progreso de la maduración. En consecuencia, la medida objetiva del color por esta fórmula cromática permitiría evaluar con mayor precisión que el IM o la dureza la edad del fruto, mientras éste no cambia por completo su color de epidermis. Ello implica que este sistema sería especialmente útil para discriminar etapas tempranas en la maduración de este fruto, permitiendo, por ejemplo, determinar con un mejor criterio el momento idóneo de cosecha de las aceitunas verdes de mesa o de las de molino, si se desea un adelantamiento de la campaña de producción de aceite con una recolección anterior o muy cercana al tiempo de envero.

Las medidas de la dureza del fruto de las dos variedades estudiadas decrecieron de forma lineal con el incremento del IM, y, como el color, de manera igualmente más estrecha (valores superiores de R^2) que frente al tiempo de permanencia en el árbol. Este sistema de medida resultó ser un estimador del grado de maduración comparable al IM, ya que las aceitunas se ablandaron uniformemente a lo largo de todas las etapas de su maduración. Por tanto, la evaluación de la dureza de las aceitunas podría utilizarse como una variable continua,

no estructurada, para determinar de una manera objetiva la edad de éste. Además, no requiere ni la cosecha ni la destrucción del fruto. Especialmente, el método es útil cuando se requiere una maduración posterior al envero. Por otra parte, la evaluación de la dureza permitiría una estimación directa de la viabilidad poscosecha de la aceituna, pues su resistencia a los daños mecánicos y a la podredumbre está fuertemente ligada al mejor mantenimiento de los valores iniciales de este parámetro. El aumento significativo de la incidencia de podredumbre durante el tiempo que media entre la cosecha y el procesado de la aceituna coincide siempre con una disminución significativa de la textura del fruto (Castellano et al., 1993; García et al., 1996a).

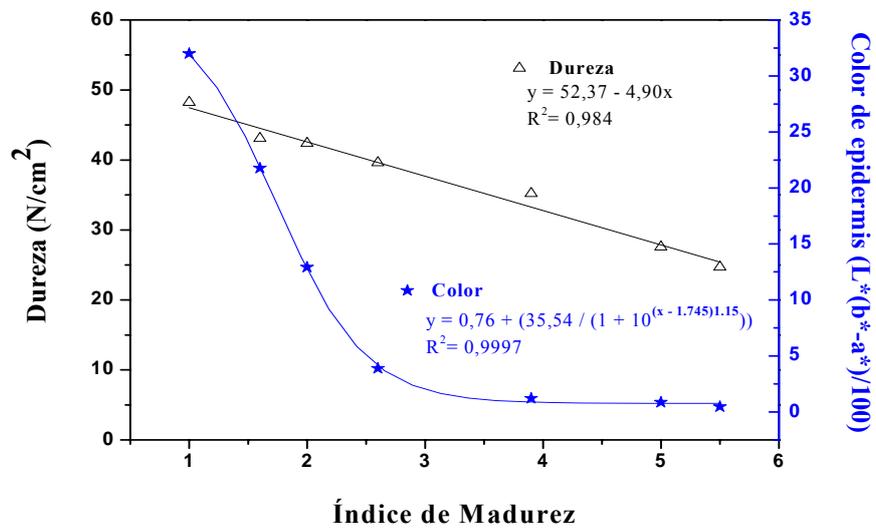


Figura 7.- Relación entre el Índice de Madurez y el color y la dureza de las aceitunas de la variedad 'Arbequina'. Cada punto es la media de 300 replicados

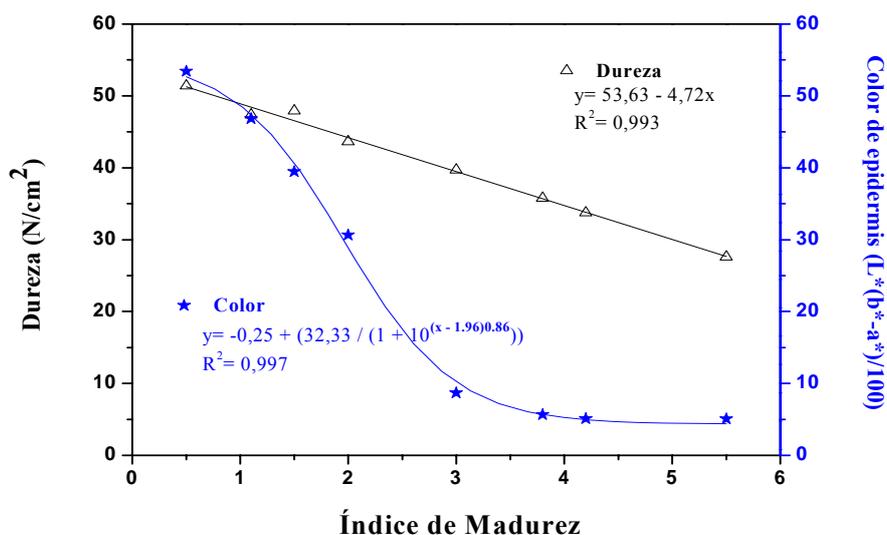


Figura 8.- Relación entre el Índice de Madurez y el color y la dureza de las aceitunas de la variedad 'Picual'. Cada punto es la media de 300 replicados

Para una mejor caracterización de las muestras empleadas en los diferentes ensayos, se indicará en cada uno de ellos tanto sus valores iniciales de IM como de color o dureza.

III. 2. EVOLUCIÓN DE LA CALIDAD, COMPOSICIÓN FENÓLICA Y PRESENCIA DEL ATRIBUTO AMARGO EN EL ACEITE DURANTE LA MADURACIÓN DE LA ACEITUNA. INFLUENCIA DE LA PLUVIOMETRÍA

Como ocurriera en la campaña 1997/98, cuando se constató la estrecha relación entre la evolución del color y la dureza de los frutos y el incremento de su IM, usando las mismas variedades de aceituna ('Arbequina' y 'Picual'), en las campañas 1998/99 y 2002/03 también se obtuvieron perfiles de desarrollo madurativo similares (**Tabla 12 y 13**). De nuevo, las aceitunas de la variedad 'Arbequina' mostraron un ligero adelanto en su proceso de maduración. Sin embargo, en la campaña 2002/03 se observó un claro retraso general en la evolución de los parámetros que determinan el progreso de la maduración. Dado que las condiciones de cultivo entre ambas campañas sólo difirieron en el notable incremento en las precipitaciones registradas entre Septiembre y Enero de la última, puede entenderse que ambos hechos estén relacionados entre sí. Estos resultados corroboran los obtenidos por Ortega et al. (2001), que observaron un retraso parecido en el proceso de maduración de las aceitunas 'Arbequina' como consecuencia del incremento de la irrigación artificial y, también, los publicados por Beltrán et al. (2004), que observaron el mismo fenómeno en aceitunas 'Frantoio', 'Hojiblanca' y 'Picual', cosechadas en la misma fecha durante campañas con diferente pluviometría.

El efecto más claro que la maduración del fruto provocó en los aceites, tanto de una como de otra variedad, fue la disminución de su contenido en pigmentos fotosintéticos (carotenos y clorofilas). Lo que es perfectamente lógico, pues el proceso de maduración se mide precisamente por la desaparición de estos pigmentos y su sustitución por derivados antociánicos (Mínguez-Mosquera et al., 1994). Sin embargo, la evolución de estos parámetros no permite el establecimiento de una escala que sirva para evaluar con un mínimo de exactitud el grado de maduración de la aceituna de procedencia, ya que frutos con IM muy diferentes dieron aceites que no diferían significativamente en el contenido en pigmentos. Por otra parte, el retraso de los parámetros que evalúan el avance de la maduración observado en la segunda campaña, no se vio reflejado tan claramente en la evolución de los contenidos en pigmentos, que se mantuvieron dentro de un rango similar al de la primera campaña.

Los resultados obtenidos no concuerdan con los hallados con la variedad 'Hojiblanca' por Beltrán et al. (2005), que observaron cómo la disminución en el aporte de agua al cultivo

durante diferentes campañas coincidía con un descenso en el contenido de carotenos de los aceites. Previamente, otro equipo de investigación (Motilva et al., 2000; Tovar et al., 2001 y 2002) publicaron al respecto trabajos con resultados contradictorios. Estudiando aceites procedentes de olivos de la variedad ‘Arbequina’ bajo diferentes regímenes de irrigación, en los dos primeros encontraron que el contenido de pigmentos disminuía conforme aumentaba la dosis de riego, mientras que en el tercero, muy al contrario, se hace mención a que durante tres campañas el diferente aporte de agua no inducía modificación significativa en el contenido en carotenos y clorofilas del aceite extraído.

Tabla 12.- Evolución de diferentes parámetros (medias \pm SD) indicativos del grado de maduración de dos variedades de aceituna cosechadas durante la campaña 1998/99.

Fecha de cosecha (día/mes)	Índice de Madurez ^y	Índice Color ^y (L(b-a)/100)	Dureza ^y (N/cm ²)	Carotenos ^z (mg/kg)	Clorofilas ^z (mg/kg)
Arbequina^x					
15/10	1,6 \pm 0,1d	32,0 \pm 2,3a	48,2 \pm 0,6a	12,9 \pm 1,4a	12,4 \pm 1,5 a
27/10	1,6 \pm 0,2d	21,8 \pm 2,5b	43,1 \pm 1,0b	7,9 \pm 1,0b	8,4 \pm 1,3 b
11/11	2,6 \pm 0,3c	12,9 \pm 3,3c	42,4 \pm 1,2b	7,6 \pm 1,1 b	8,3 \pm 1,2 b
24/11	3,5 \pm 0,3b	3,9 \pm 1,6d	39,6 \pm 1,2c	8,9 \pm 1,3 b	7,6 \pm 0,9 bc
10/12	3,7 \pm 0,3b	1,2 \pm 1,3e	35,2 \pm 1,3d	6,8 \pm 1,0 bc	6,0 \pm 0,9 cd
23/12	5,0 \pm 0,4a	0,8 \pm 1,3e	27,6 \pm 1,1e	5,6 \pm 0,7c	5,1 \pm 0,8 d
13/01	5,5 \pm 0,4a	0,5 \pm 1,2e	24,7 \pm 1,2f	5,4 \pm 0,7c	4,8 \pm 0,8 d
Picual^x					
15/10	1,1 \pm 0,2de	30,8 \pm 1,3 a	49,4 \pm 0,5a	13,9 \pm 1,3 a	26,1 \pm 1,5 a
27/10	0,9 \pm 0,3e	26,7 \pm 1,5b	47,4 \pm 1,6a	11,8 \pm 0,9 b	17,8 \pm 1,3 b
11/11	1,5 \pm 0,3d	22,0 \pm 2,0c	47,9 \pm 1,7a	11,4 \pm 0,8 b	19,3 \pm 1,4 b
24/11	2,4 \pm 0,4c	16,4 \pm 3,3d	43,6 \pm 1,3b	10,9 \pm 0,9 b	17,4 \pm 1,2 b
10/12	3,8 \pm 0,6 b	2,5 \pm 0,9e	39,7 \pm 1,5c	9,8 \pm 1,1 b	12,3 \pm 1,3 c
23/12	4,0 \pm 0,5b	0,6 \pm 0,7f	35,8 \pm 1,4d	5,9 \pm 1,0 c	6,1 \pm 1,0 d
13/01	4,2 \pm 0,5b	0,2 \pm 0,5f	33,7 \pm 1,5d	5,1 \pm 0,9 c	5,5 \pm 0,9 d
26/01	5,5 \pm 0,5a	0,2 \pm 0,6f	27,6 \pm 1,3e	4,2 \pm 0,8c	4,4 \pm 0,9 d

^x En cada variedad, dos valores del mismo parámetro seguidos con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan.

^y Cada valor de estos parámetros corresponde al valor medio de 300 determinaciones.

^z Cada valor de este parámetro corresponde al valor medio de 3 determinaciones.

El progreso de la maduración de las aceitunas no determinó que se redujera el nivel de calidad comercial de los aceites extraídos en ninguna de las dos campañas estudiadas (Tablas 14 y 15). Los parámetros establecidos para evaluarla se mantuvieron dentro de los límites fijados para la categoría “extra” durante el periodo estudiado. Sin embargo, en la mayoría de los casos se observó un progresivo aumento de la acidez de los aceites conforme fue madurando el fruto, lo que, aunque considerado en términos absolutos resulta irrelevante,

relativamente hablando supuso casi triplicar la cifra presentada por los aceites obtenidos de los frutos más inmaduros. Este resultado confirma los obtenidos por García et al. (1996a), que obtuvieron valores de acidez que variaron de 0,2 a 0,4 %, según el aceite fuera obtenido de frutos verdes o negros, respectivamente. Este incremento podría ser debido a la acción de las lipasas internas de la aceituna, que podrían activarse durante la maduración del fruto, o bien, durante el proceso de extracción del aceite. La actividad de estas enzimas dependerá de múltiples factores, tales como: la variedad, el nivel de maduración, la temperatura, o la humedad y no requeriría la intervención de agentes ajenos al fruto.

Tabla 13.- Evolución de diferentes parámetros (medias \pm SD) indicativos del grado de maduración de dos variedades de aceituna cosechadas durante la campaña 2002/03.

Fechas de cosecha	Índice de Madurez ^y	Índice Color ^y (L(b-a)/100)	Dureza ^y (N/cm ²)	Carotenos ^z (mg/kg)	Clorofilas ^z (mg/kg)
Arbequina^x					
11/9	0,3 \pm 0,1e	34,4 \pm 2,3a	49,5 \pm 0,6a	14,2 \pm 1,3a	14,4 \pm 1,5a
21/10	1,9 \pm 0,2d	22,4 \pm 3,4b	44,8 \pm 1,4b	10,2 \pm 1,1b	10,9 \pm 1,3b
4/11	2,0 \pm 0,3d	10,7 \pm 3,5c	42,7 \pm 1,5c	8,2 \pm 0,7c	9,5 \pm 1,3b
29/11	2,4 \pm 0,3cd	4,9 \pm 1,3d	40,0 \pm 1,2d	7,4 \pm 0,8cd	8,9 \pm 1,0b
28/12	2,8 \pm 0,3c	3,2 \pm 1,6d	37,2 \pm 0,7e	7,1 \pm 0,7cd	6,5 \pm 1,0c
8/1	3,6 \pm 0,3b	0,8 \pm 0,8e	35,8 \pm 0,6f	6,2 \pm 0,7d	6,0 \pm 0,9c
22/1	4,2 \pm 0,4a	0,4 \pm 0,9e	34,8 \pm 0,8f	5,5 \pm 0,8d	5,0 \pm 0,9c
Pical^x					
8/10	0,4 \pm 0,1d	33,5 \pm 2,0b	48,2 \pm 0,8a	10,7 \pm 1,3 b	20,5 \pm 1,3c
16/10	0,4 \pm 0,2d	35,2 \pm 2,5ab	46,8 \pm 0,5b	15,0 \pm 1,2 a	23,2 \pm 1,1b
22/10	0,3 \pm 0,3d	37,0 \pm 2,2a	46,5 \pm 0,6b	13,2 \pm 1,1a	20,1 \pm 1,2c
29/10	0,6 \pm 0,3d	33,4 \pm 3,3b	44,3 \pm 1,0c	14,2 \pm 1,0a	27,5 \pm 1,3a
11/11	1,9 \pm 0,3c	22,0 \pm 4,2c	42,8 \pm 0,8c	9,2 \pm 0,9b	13,8 \pm 1,2d
22/11	2,0 \pm 0,4c	9,4 \pm 1,6d	40,0 \pm 0,9d	5,6 \pm 0,8c	10,5 \pm 0,9e
3/12	2,1 \pm 0,2c	5,9 \pm 1,5e	40,0 \pm 0,7d	5,4 \pm 0,7c	8,7 \pm 0,8f
10/12	2,4 \pm 0,2bc	4,4 \pm 1,2e	39,6 \pm 0,8d	5,5 \pm 0,8c	8,1 \pm 0,9f
17/12	2,6 \pm 0,3bc	4,0 \pm 0,9e	37,9 \pm 0,9e	4,7 \pm 0,7c	7,4 \pm 0,8f
8/1	3,0 \pm 0,3b	1,8 \pm 0,8f	35,2 \pm 0,8f	4,2 \pm 0,7c	4,4 \pm 0,7g
22/1	4,0 \pm 0,4a	0,3 \pm 0,9f	34,2 \pm 0,9f	4,2 \pm 0,6c	4,3 \pm 0,7g

^x En cada variedad, dos valores del mismo parámetro seguidos con diferentes letras minúsculas son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan.

^y Cada valor de estos parámetros corresponde al valor medio de 300 determinaciones.

^z Cada valor de este parámetro corresponde al valor medio de 3 determinaciones.

Los valores de índice de peróxidos, absorbancia en la región ultravioleta y calidad sensorial de los aceites obtenidos no variaron de forma significativa durante la maduración de las variedades estudiadas. En contraste con estos resultados, diferentes autores han publicado que el grado de maduración de los frutos podía inducir cambios significativos en los parámetros de calidad que evalúan la alteración oxidativa de los aceites, pero entre ellos

mismos, a su vez, no coinciden. Por ejemplo, García et al. (1996a) observaron un incremento progresivo de los K_{270} y K_{232} con la maduración de las aceitunas, mientras que Salvador et al. (2001) hallaron un descenso del K_{270} durante este proceso.

Tabla 14.- Cambios en diferentes parámetros utilizados para medir la calidad de los aceites virgenes (medias \pm SD) obtenidos de dos variedades cosechadas en diferentes tiempos durante la campaña 1998/99.

Fechas de cosecha	Acidez (% Oleico)	K_{232}	K_{270}	Peróxidos (meqO/kg)	Estabilidad (horas)	Análisis Sensorial	Amargor
Arbequina^{xy}							
15/10	0,11 \pm 0,01e	1,83 \pm 0,14	0,09 \pm 0,04	6,2 \pm 1,2a	37,1 \pm 2,0a	7,8 \pm 0,5	2,1 \pm 0,2a
27/10	0,10 \pm 0,00e	1,60 \pm 0,24	0,09 \pm 0,05	3,4 \pm 0,8b	36,2 \pm 1,8a	7,6 \pm 0,5	1,8 \pm 0,3ab
11/11	0,13 \pm 0,01d	1,67 \pm 0,20	0,09 \pm 0,05	4,1 \pm 1,2ab	36,8 \pm 1,6a	8,0 \pm 0,3	1,6 \pm 0,3b
24/11	0,13 \pm 0,00d	1,63 \pm 0,22	0,13 \pm 0,05	5,2 \pm 0,8a	36,6 \pm 1,4a	8,0 \pm 0,4	1,4 \pm 0,4bc
10/12	0,15 \pm 0,01c	1,79 \pm 0,16	0,12 \pm 0,04	2,5 \pm 0,7b	33,4 \pm 2,2ab	8,0 \pm 0,3	1,2 \pm 0,3cd
23/12	0,19 \pm 0,01b	1,76 \pm 0,18	0,11 \pm 0,04	2,9 \pm 0,8b	30,5 \pm 2,0b	7,8 \pm 0,6	1,2 \pm 0,2cd
13/01	0,29 \pm 0,03a	1,59 \pm 0,21	0,10 \pm 0,05	2,4 \pm 0,9b	29,6 \pm 2,5b	8,0 \pm 0,4	1,0 \pm 0,3d
Picual^{xy}							
15/10	0,12 \pm 0,01	1,42 \pm 0,16	0,12 \pm 0,04	4,9 \pm 1,0	120,7 \pm 2,2a	8,3 \pm 0,2	5,0 \pm 0,0a
27/10	0,10 \pm 0,01	1,52 \pm 0,14	0,11 \pm 0,03	5,5 \pm 0,9	123,3 \pm 3,0a	8,3 \pm 0,3	5,0 \pm 0,0a
11/11	0,12 \pm 0,02	1,44 \pm 0,17	0,12 \pm 0,04	6,5 \pm 0,8	112,6 \pm 3,5b	8,5 \pm 0,2	4,3 \pm 0,3b
24/11	0,11 \pm 0,01	1,46 \pm 0,20	0,10 \pm 0,05	7,2 \pm 1,5	98,1 \pm 3,2c	8,3 \pm 0,4	3,7 \pm 0,3c
10/12	0,10 \pm 0,02	1,33 \pm 0,23	0,09 \pm 0,03	5,3 \pm 1,2	87,2 \pm 3,5d	8,4 \pm 0,4	3,6 \pm 0,2c
23/12	0,11 \pm 0,02	1,30 \pm 0,24	0,08 \pm 0,03	5,5 \pm 0,8	76,7 \pm 2,8e	8,2 \pm 0,4	3,8 \pm 0,3c
13/01	0,11 \pm 0,01	1,51 \pm 0,14	0,07 \pm 0,04	5,5 \pm 0,9	64,8 \pm 2,8f	8,3 \pm 0,3	3,1 \pm 0,3d
26/01	0,10 \pm 0,02	1,37 \pm 0,15	0,07 \pm 0,04	5,0 \pm 1,2	61,9 \pm 3,0f	8,1 \pm 0,3	3,0 \pm 0,3d

^x Para cada variedad, dos valores del mismo parámetro seguidos con diferentes letras pequeñas son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan.

^y Cada valor de este parámetro es una media de 3 determinaciones.

En las dos variedades estudiadas durante la segunda campaña el contenido en tocoferoles decreció en los aceites a medida que progresaba su maduración. Estos resultados confirman los obtenidos previamente por varios autores (García et al., 1996a; Gutiérrez et al., 1999). Por lo tanto, considerando exclusivamente el contenido en Vitamina E, el valor nutricional de los aceites de oliva decreció con el nivel de maduración de los frutos, pues el principal componente de los tocoferoles del aceite de oliva es precisamente esta vitamina (α -tocoferol).

La evolución presentada por los valores de estabilidad ante la oxidación durante la maduración en las dos campañas estudiadas se mostró fuertemente influenciada por la variedad de procedencia. Los aceites obtenidos de la variedad ‘Picual’ mostraron valores muy elevados en este parámetro al inicio de la maduración hasta alcanzar a finales de

Octubre su máximo (en torno a 120 horas), para luego llegar a perder aproximadamente un 50 % del mismo en los aceites extraídos a finales de Enero, mientras que los procedentes de ‘Arbequina’ presentaron valores más bajos (entre 30 y 35 horas) a lo largo de toda su maduración. Sin embargo, estos valores siguen siendo bastante altos, si se comparan con los que presentan otros aceites diferentes del oliva (Rotondi et al., 2004). Las evoluciones en estabilidad de los aceites de esta variedad también difirieron según la campaña, pues en la primera se registró un descenso significativo de este parámetro al final del proceso madurativo (20 % de pérdida), mientras que en la segunda este hecho no se observó. Sin embargo, durante la primera campaña los aceites obtenidos de ‘Arbequina’ presentaron mayor estabilidad inicial, y los valores inferiores de este parámetro presentados sólo al final de ésta vienen a coincidir con los presentados por los aceites de la misma variedad a lo largo de toda la segunda campaña. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Motilva et al. (2000), quienes, trabajando con la variedad ‘Arbequina’, encontraron que una baja irrigación inducía un ligero incremento en la estabilidad ante la oxidación de sus aceites. La pérdida de la estabilidad en los aceites durante la maduración del fruto ha sido previamente descrita por otros autores en aceites de ‘Picual’, ‘Hojiblanca’ y ‘Nostrana di Brisighella’ (Gutiérrez et al., 1999; Beltrán et al., 2005 y Rotondi et al., 2004), pero no se había observado antes en los aceites de la variedad ‘Arbequina’. Mucho más acusado se ve este efecto en los aceites obtenidos de aceitunas de la variedad ‘Picual’. Si se comparan los valores de estabilidad de cada fecha de la primera campaña con sus homólogos de la segunda, se puede comprobar cómo, sistemáticamente, fueron superiores. En consecuencia, el aumento de precipitación parece inducir una reducción de la estabilidad ante la oxidación en los aceites. Estos resultados coinciden con los publicados por Beltrán et al. (2005), quienes observaron cómo los aceites de la variedad ‘Hojiblanca’ presentaban una mayor estabilidad, en tanto en cuanto más seca fuera la campaña.

Los valores de intensidad de amargor, evaluados sensorialmente, descendieron en las dos campañas a medida que avanzaba la maduración de los frutos en ambas variedades. Se corroboran así los resultados obtenidos previamente por Hermoso et al. (1998), quienes observaron cómo el aumento del grado de madurez de la aceituna era el factor más determinante para la reducción de la intensidad del amargor del aceite. Los aceites obtenidos de la variedad ‘Arbequina’ mostraron sólo una ligera disminución, siendo los valores iniciales de este parámetro ya de por sí muy reducidos (entorno a “2,0”, que equivale a una intensidad ligera). La pérdida de amargor en la variedad ‘Picual’, en cambio, fue mucho más acentuada sobre todo en la segunda campaña. El aumento en la precipitación, en

consecuencia, indujo una reducción en la intensidad del amargor de los aceites obtenidos a partir de estas aceitunas, especialmente de las cosechadas al final de la campaña. Mientras que los aceites de la primera campaña presentaban en las dos últimas tomas de muestra una intensidad media de amargor (entorno al valor “3,0”), sus homólogos de la segunda sólo exhibían un nivel ligero de este atributo. En cambio, el amargor de los aceites procedentes de la variedad ‘Arbequina’ no se afectó por la diferencia de precipitación.

Tabla 15.- Cambios en diferentes parámetros utilizados para medir el nivel de calidad de los aceites vírgenes (medias \pm SD) obtenidos de dos variedades cosechadas en diferentes tiempos durante la campaña 2002/03.

Fechas de Cosecha	Acidez (% Oleico)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	Peróxidos (meqO/kg)	Tocoferoles (ppm)	Estabilidad (horas)	Análisis Sensorial	Amargor
Arbequina^{xy}								
11/9	0,12 \pm 0,01de	1,41 \pm 0,22	0,06 \pm 0,04	5,2 \pm 1,0	276,1 \pm 0,4a	30,2 \pm 1,8	8,0 \pm 0,4	1,9 \pm 0,3a
21/10	0,11 \pm 0,00e	1,62 \pm 0,20	0,14 \pm 0,05	4,8 \pm 1,1	243,3 \pm 0,4b	29,7 \pm 2,2	7,9 \pm 0,5	1,7 \pm 0,4ab
4/11	0,13 \pm 0,01de	1,32 \pm 0,22	0,10 \pm 0,03	4,9 \pm 0,8	239,7 \pm 0,4b	30,8 \pm 1,4	8,1 \pm 0,4	1,8 \pm 0,3ab
29/11	0,15 \pm 0,01cd	1,29 \pm 0,23	0,09 \pm 0,03	6,2 \pm 1,2	234,0 \pm 0,4b	33,1 \pm 2,5	8,2 \pm 0,3	2,1 \pm 0,4a
28/12	0,18 \pm 0,01c	1,51 \pm 0,22	0,10 \pm 0,04	4,5 \pm 0,9	205,5 \pm 0,4c	29,9 \pm 1,9	8,0 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3c
8/1	0,22 \pm 0,02b	1,46 \pm 0,21	0,10 \pm 0,03	4,5 \pm 1,0	192,3 \pm 0,4c	31,3 \pm 1,6	7,9 \pm 0,5	1,2 \pm 0,2c
22/1	0,32 \pm 0,03a	1,44 \pm 0,18	0,08 \pm 0,04	4,2 \pm 1,2	137,5 \pm 0,4d	32,6 \pm 2,1	8,0 \pm 0,4	1,4 \pm 0,3bc
Picual^{xy}								
8/10	0,16 \pm 0,02d	1,42 \pm 0,25	0,13 \pm 0,04	5,7 \pm 1,1	273,9 \pm 0,4a	105,8 \pm 3,4c	8,5 \pm 0,3	5,0 \pm 0,0a
16/10	0,18 \pm 0,01d	1,59 \pm 0,22	0,18 \pm 0,02	7,3 \pm 1,6	272,7 \pm 0,4a	108,2 \pm 3,8c	8,2 \pm 0,4	5,0 \pm 0,0a
22/10	0,19 \pm 0,02d	1,80 \pm 0,35	0,19 \pm 0,03	5,5 \pm 1,0	245,2 \pm 0,4b	116,4 \pm 2,5b	8,4 \pm 0,3	5,0 \pm 0,0a
29/10	0,23 \pm 0,02c	1,74 \pm 0,27	0,18 \pm 0,03	4,5 \pm 1,4	206,1 \pm 0,4c	122,6 \pm 2,4a	8,2 \pm 0,4	5,0 \pm 0,0a
11/11	0,16 \pm 0,02d	1,40 \pm 0,24	0,14 \pm 0,05	6,4 \pm 1,1	252,9 \pm 0,4b	102,4 \pm 4,4c	8,4 \pm 0,3	4,0 \pm 0,4b
22/11	0,23 \pm 0,01c	1,49 \pm 0,26	0,15 \pm 0,04	6,6 \pm 0,8	186,6 \pm 0,4d	85,8 \pm 3,6d	8,3 \pm 0,4	3,8 \pm 0,4b
3/12	0,30 \pm 0,03b	1,27 \pm 0,31	0,15 \pm 0,03	4,5 \pm 1,5	168,9 \pm 0,4e	68,4 \pm 2,4e	8,3 \pm 0,4	3,7 \pm 0,3b
10/12	0,31 \pm 0,02b	1,56 \pm 0,23	0,14 \pm 0,04	4,8 \pm 1,2	187,2 \pm 0,4d	66,2 \pm 2,6ef	8,2 \pm 0,4	3,1 \pm 0,3c
17/12	0,39 \pm 0,02a	1,22 \pm 0,33	0,12 \pm 0,05	4,5 \pm 1,4	153,7 \pm 0,4f	62,4 \pm 2,4f	8,0 \pm 0,5	3,4 \pm 0,3bc
8/1	0,38 \pm 0,02a	1,63 \pm 0,24	0,14 \pm 0,04	5,3 \pm 0,9	184,7 \pm 0,4d	60,6 \pm 3,2f	8,1 \pm 0,4	2,4 \pm 0,4d
22/1	0,41 \pm 0,03a	1,31 \pm 0,26	0,18 \pm 0,03	6,2 \pm 0,7	209,2 \pm 0,4c	60,5 \pm 3,3f	8,2 \pm 0,3	2,2 \pm 0,4d

^x Para cada variedad, dos valores del mismo parámetro seguidos con diferentes letras pequeñas son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan.

^y Cada valor de este parámetro es una media de 3 determinaciones.

La evolución del contenido total en fenoles varió según la pluviometría de la campaña y la variedad estudiada (**Tablas 16 y 17**). Mientras que en la primera campaña este parámetro descendió de una manera más o menos uniforme en las dos variedades conforme progresaba el grado de maduración del fruto, en la segunda con mayor precipitación, en

‘Picual’ se observó un aumento inicial en el contenido fenólico total hasta alcanzar un máximo (2,25 mmol/kg) a finales de Octubre, para posteriormente ir descendiendo hasta exhibir valores claramente inferiores al final de campaña. Por su parte, los aceites de ‘Arbequina’ ofrecieron un comportamiento errático en su contenido total en derivados fenólicos, con continuas subidas y bajadas a lo largo del proceso madurativo, dando a entender que las fluctuaciones obtenidas se deben más a una variabilidad en la recuperación de fenoles en la extracción física del aceite, que a los cambios fisiológicos del fruto. El aumento de la precipitación determinó una disminución del contenido medio total en derivados fenólicos en las dos variedades estudiadas, que coincidió con los descensos de estabilidad y amargor anteriormente citados. Previamente, diferentes autores ya habían puesto de manifiesto cómo la presencia de lluvias durante el crecimiento y la maduración de las aceitunas hacía disminuir la concentración de fenoles en los aceites (Pannelli et al., 1994; Ranalli et al., 1997 y Uceda y Hermoso, 1998). Los contenidos totales en derivados secoiridoideos (FAAO, FAAL, FDAO y FDAL) y en ortodifenoles (FAAO, FDAO, hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosol y luteolina) siguieron evoluciones similares a la presentada por los polifenoles totales. Este hecho era de esperar, pues estos conjuntos de compuestos son los mayoritarios entre los derivados fenólicos del aceite de oliva. La diferencia en contenido de los diferentes compuestos fenólicos, individualmente considerados, entre aceites relativamente amargos y estables, como los obtenidos durante la maduración de la aceituna de la variedad ‘Picual’, y otros que presentan una baja estabilidad e intensidad en este atributo, como los extraídos de las aceitunas de la variedad ‘Arbequina’, puede dar una idea de cuáles están más relacionados con estos parámetros. En las dos campañas estudiadas, no presentaron modificaciones estadísticamente significativas a consecuencia del aumento del grado de madurez los contenidos en tirosol, ácido vanílico, pinosinol, luteolina y apigenina en los aceites obtenidos, tanto de ‘Arbequina’ como de ‘Picual’. Dado que, sobre todo en la variedad ‘Picual’, se produjo una apreciable reducción tanto de la estabilidad como de la presencia del atributo amargo, no parece que los citados compuestos fenólicos estén relacionados con estos descensos, si bien este hecho no los descarta como posibles poseedores de actividad antioxidante o amargor. Es de destacar el descenso registrado en pinosinol durante la campaña 2002/03. En los aceites procedentes de ‘Arbequina’ este compuesto pasa de presentar un contenido medio de 0,114 mmol/kg en la campaña más seca a exhibir apenas un contenido medio de 0,007 mmol/kg en los obtenidos durante la campaña más húmeda. En los aceites de ‘Picual’ se observa el mismo efecto, pero con diferencias menos extremas, pues el contenido pasa de una media de 0,035 mmol/kg, en

la primera campaña, a 0,012 mmol/kg, en la segunda. En la variedad 'Arbequina', tanto en la primera como en la segunda campaña destacan los contenidos en dos derivados secoiridoideos, el FDAO y el FDAL, con valores medios superiores a los presentados por los aceites de la variedad 'Picual'; mucho más amargos y estables, por lo que no parece probable que ambos compuestos estuvieran demasiado relacionados con uno u otro parámetro o, al menos, deben existir otros compuestos con una mayor implicación en este sentido. El FAAO, en cambio, siendo el derivado fenólico más abundante con diferencia en los aceites de 'Picual' de la segunda campaña, fue el derivado secoiridoideo, que al inicio de ésta mantuvo unos valores parecidos a los alcanzados en la campaña seca. Dado que en el inicio de ambas campañas los aceites procedentes de la variedad 'Picual' alcanzaron parecidos valores máximos, tanto de amargor, como de estabilidad, sería razonable pensar que este compuesto es el que parece estar más estrechamente relacionado con la evolución de estos parámetros, pues el resto de derivados secoiridoideos se redujo notablemente. Además, tanto su presencia minoritaria en 'Arbequina', como la reducción de contenido que sufre durante el proceso madurativo del fruto, también coinciden con los cambios experimentados, tanto en intensidad de amargor, como en la estabilidad ante la oxidación en los aceites. Estos resultados coinciden en mayor medida con los presentados por Mateos et al. (2004), que identificaron al FAAO como el principal responsable del amargor del aceite, que con los publicados por Gutiérrez et al. (2003), quienes identificaron a las moléculas del FDAO y FDAL como principales responsables de este atributo por encima del papel desempeñado por el FAAO. El hidroxitirosol y el acetato de hidroxitirosol, dos moléculas con naturaleza antioxidante (Mateos et al., 2003), mostraron diferentes concentraciones según la variedad de procedencia. Mientras que en 'Arbequina' el contenido en hidroxitirosol siempre se mantuvo en valores muy bajos con tendencia a la reducción al final de campaña, en 'Picual' el contenido en este derivado fenólico fue mucho más apreciable y la tendencia a la reducción en su contenido sólo se da claramente en la campaña más seca. El contenido en acetato de hidroxitirosol fue superior en los aceites procedentes de aceitunas 'Arbequina' que en los obtenidos de la variedad 'Picual' en las dos campañas estudiadas, ello cuestiona la importancia de la implicación de este compuesto en el mantenimiento de la estabilidad oxidativa de los aceites, pues los segundos exhibieron sistemáticamente valores superiores en este parámetro.

A finales de la segunda campaña, a pesar del retraso registrado en la maduración de los frutos, medida por el índice de madurez, la dureza o el color de epidermis, se observó un descenso significativo de la estabilidad, de los compuestos fenólicos y de la intensidad de amargor de los aceites extraídos de los mismos. La abundante precipitación registrada entre

Septiembre y Diciembre de esta campaña indujo un retraso en la maduración de estos frutos, y, probablemente, ralentizara el descenso en el contenido en fenoles de su pulpa que transcurre durante este proceso fisiológico. Sin embargo, una mayor absorción de agua por parte del fruto podría facilitar la disolución preferente de los compuestos fenólicos en la fase acuosa de la pasta de aceituna (alpechín o alperujo) tras la extracción física del aceite. Por otra parte, los restos de membrana y los polisacáridos resultantes de la rotura de las paredes celulósicas de las células de la aceituna podrían también formar complejos con los compuestos fenólicos presentes en las pastas, determinando su pérdida de contenido en el aceite extraído (Spencer et al., 1998; Vierhuis et al., 2001). Puesto que en las campañas más húmedas se ralentiza el ablandamiento del fruto, la presencia de estas estructuras se hace más habitual en las pastas de extracción. Otra explicación de la reducción del contenido de polifenoles en el aceite podría ser debida a una ralentización de la síntesis de polifenoles en la oliva durante su maduración. La biosíntesis de estos compuestos fenólicos en las plantas es sensible a las condiciones ambientales (Parr and Bolwell, 2000), por lo tanto el estado hídrico del cultivo podría afectar a la misma a través de una regulación de la actividad del enzima PAL, clave en la ruta de la síntesis fenólica, que se estimularía como respuesta al “estrés” hídrico en las campañas con bajo aporte de agua (Dixon y Paiva, 1995; Patumi et al., 1999). Además, las reacciones oxidativas catalizadas por los oxidoreductasas endógenas, tales como las polifenoloxidasas y las peroxidasas, podrían estimularse por la presencia de mayor humedad en la pasta y promover la oxidación fenólica durante el proceso de extracción, contribuyendo también al descenso de su presencia en el aceite (Sciancalepore, 1985; Servili et al., 1998; Servili et al., 1999).

Tabla 16.- Cambios en diferentes compuestos fenólicos (mmol/kg) de aceites de oliva vírgenes obtenidos de dos variedades de olivos cosechadas a diferentes tiempos durante la campaña 1998/99

Fechas de cosecha	Hidroxi-tirosol	FDAO	FAAO	Tirosol	FDAL	FAAL	Acido Vanílico	Acetato hidroxitirosol	Pino-resinol	Luteolina	Apigenina	Total Orto-difenoles	Total Secoiridoideos	Total Fenoles
Arbequina^{zy}														
15/10	0,014 a	0,460 a	0,053 a	0,018	0,320 a	0,078 a	0,002	0,091 b	0,126	0,012	0,001	0,630 a	0,911 a	1,180 a
27/10	0,012 ab	0,390 b	0,045 b	0,019	0,330 a	0,080 a	0,006	0,088 b	0,136	0,006	0,002	0,541 b	0,845 b	1,120 b
11/11	0,011 ab	0,350 c	0,040 c	0,013	0,230 c	0,057 b	0,003	0,094 b	0,115	0,024	0,005	0,519 c	0,677 d	0,950 d
24/11	0,010 b	0,310 d	0,035 d	0,018	0,320 a	0,078 a	0,005	0,066 d	0,109	0,027	0,005	0,448 d	0,743 c	1,080 c
10/12	0,010 b	0,260 e	0,030 e	0,015	0,260 b	0,064 b	0,004	0,105 a	0,119	0,020	0,004	0,425 e	0,614 e	0,900 d
23/12	0,008 bc	0,250 f	0,029 e	0,012	0,220 c	0,053bc	0,005	0,077 c	0,096	0,015	0,003	0,379 f	0,552 f	0,770 e
13/01	0,006 c	0,180 g	0,021 f	0,010	0,180 d	0,043 c	0,003	0,026 e	0,094	0,022	0,004	0,255 g	0,424 g	0,590 f
Picual^{zy}														
15/10	0,052 a	0,392 b	0,555 b	0,059	0,583 a	0,515 a	0,005	0,023	0,030	0,008	0,002	1,030 b	2,045 a	2,224 a
27/10	0,057 a	0,429 a	0,607 a	0,056	0,557 b	0,493 b	0,008	0,052	0,036	0,015	0,005	1,160 a	2,086 a	2,316 a
11/11	0,043 b	0,324 c	0,459 c	0,048	0,471 e	0,417 d	0,005	0,027	0,024	0,006	0,003	0,859 c	1,671 b	1,828 b
24/11	0,038 bc	0,290 d	0,411 e	0,054	0,530 c	0,469 c	0,006	0,046	0,038	0,010	0,004	0,795 d	1,700 b	1,897 b
10/12	0,037 bc	0,281 d	0,398 f	0,052	0,513 d	0,454 c	0,006	0,045	0,036	0,009	0,004	0,770 d	1,646 b	1,836 b
23/12	0,039 bc	0,298 d	0,422 d	0,055	0,547 b	0,484 b	0,007	0,035	0,044	0,010	0,004	0,804 d	1,751 b	1,946 b
13/01	0,034 cd	0,253 e	0,359 g	0,047	0,463 e	0,410 d	0,005	0,041	0,033	0,009	0,005	0,696 e	1,485 c	1,659 c
26/01	0,031 d	0,235 f	0,333 h	0,044	0,431 f	0,382 e	0,005	0,038	0,037	0,008	0,004	0,645 f	1,381 c	1,548 c

^z Para cada variedad, dos valores del mismo parámetro seguidos con diferentes letras pequeñas son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan. ^y Cada valor de este parámetro es una media de 3 determinaciones.

(FDAO) Forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FDAL) Forma dialdehídica de la aglucona del ligustrósido. (FAAO) Forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FAAL) Forma aldehídica de la aglucona del ligustrósido.

Tabla 17.- Cambios en diferentes compuestos fenólicos (mmol/kg) de aceites de oliva vírgenes obtenidos de dos variedades de olivos cosechadas a diferentes tiempos durante la campaña 2002/03

Fecha de cosecha	Hidroxi-tirosol	FDAO	FAAO	Tirosol	FDAL	FAAL	Acido Vanílico	Acetato hidroxitirosol	Pino-resinol	Luteolina	Apigenina	Total Orto-difenoles	Total Secoiridoideos	Total Fenoles
Arbequina^{zy}														
11/9	0,010 ab	0,317 c	0,042 a	0,012	0,369 a	0,082 b	0,002	0,058 e	0,008	0,005	0,002	0,432 c	0,810 b	0,907 b
21/10	0,008 b	0,159 e	0,026 c	0,017	0,169 c	0,026 d	0,002	0,171 b	0,012	0,005	0,002	0,369 e	0,380 f	0,597 f
4/11	0,011ab	0,230 d	0,033 b	0,015	0,162 c	0,107 a	0,003	0,160 b	0,010	0,010	0,004	0,444 c	0,532 d	0,745 d
29/11	0,012 a	0,425 b	0,046 a	0,013	0,120 d	0,065 c	0,003	0,156 b	0,006	0,015	0,006	0,654 a	0,656 c	0,867 c
28/12	0,013 a	0,176 e	0,012 d	0,010	0,079 e	0,022 d	0,000	0,187 a	0,004	0,012	0,006	0,400 d	0,289 g	0,521 g
8/1	0,008 b	0,324 c	0,024 c	0,010	0,125 d	0,023 d	0,000	0,134 c	0,005	0,008	0,005	0,498 b	0,496 e	0,666 e
22/1	0,007 b	0,494 a	0,046 a	0,010	0,299 b	0,024 d	0,000	0,092 d	0,007	0,005	0,003	0,644 a	0,863 a	0,987 a
Picual^{zy}														
8/10	0,034 f	0,177 f	0,544 d	0,013	0,124 e	0,061 c	0,004	0,019 h	0,015	0,017	0,005	0,791 f	0,906 f	1,014 e
16/10	0,040 de	0,269 e	0,567 c	0,018	0,170 c	0,180 a	0,004	0,028 f	0,010	0,019	0,005	0,923 c	1,186 c	1,311 c
22/10	0,043 d	0,454 b	0,681 b	0,019	0,240 b	0,144 b	0,003	0,069 a	0,020	0,015	0,003	1,262 b	1,519 b	1,691 b
29/10	0,057 b	0,747 a	0,921 a	0,017	0,288 a	0,134 b	0,002	0,063 b	0,018	0,014	0,004	1,802 a	2,090 a	2,251 a
11/11	0,036 ef	0,288 de	0,433 e	0,012	0,114 e	0,061 c	0,002	0,056 c	0,012	0,014	0,004	0,827 e	0,896 f	1,033 e
22/11	0,033 f	0,391c	0,382 f	0,012	0,176 c	0,064 c	0,001	0,047 d	0,010	0,012	0,003	0,865 d	1,013 d	1,132 d
3/12	0,043 d	0,322 d	0,386 f	0,013	0,152 d	0,080 c	0,000	0,037 e	0,010	0,018	0,005	0,806 f	0,940 e	1,067 e
10/12	0,035 f	0,336 cd	0,317 g	0,019	0,159 d	0,085 c	0,000	0,036 e	0,012	0,024	0,007	0,748 g	0,897 f	1,031 e
17/12	0,086 a	0,264 e	0,384 f	0,024	0,125 e	0,073 c	0,000	0,035 e	0,009	0,016	0,005	0,785 f	0,846 h	1,022 e
8/1	0,049 c	0,224 ef	0,298 g	0,022	0,130 e	0,065 c	0,000	0,022 g	0,010	0,015	0,004	0,608 h	0,717 i	0,839 f
22/1	0,045 cd	0,230 e	0,254 h	0,019	0,115 e	0,060 c	0,000	0,018 h	0,011	0,014	0,005	0,561 i	0,659 j	0,771 g

^z Para cada variedad, dos valores del mismo parámetro seguidos con diferentes letras pequeñas son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan. ^y Cada valor de este parámetro es una media de 3 determinaciones.

(FDAO) Forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FDAL) Forma dialdehídica de la aglucona del ligustrósido. (FAAO) Forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FAAL) Forma aldehídica de la aglucona del ligustrósido.

III. 3. DETERMINACIÓN DEL MOMENTO DE ENTRADA DEL ATRIBUTO AMARGO EN EL ACEITE DE OLIVA

La intensidad de amargor que presenta el aceite de oliva antes de su extracción, cuando aún permanece en las células del mesocarpio, es desconocida, o al menos, no aparece en las fuentes bibliográficas a las que se ha tenido acceso. Aparentemente no es probable que este aceite posea este atributo en un nivel apreciable, ya que los compuestos, que presumiblemente lo confieren, se pueden encontrar en otros compartimentos subcelulares. Para intentar profundizar en el conocimiento de cómo aparece el amargor en los aceites es imprescindible tener un cierto grado de certeza de que éste no se halla de manera previa, formando parte constitutiva del aceite original. Para ello se ha procedido a una extracción química en condiciones muy suaves, reduciendo en lo posible que se produzca un trasvase de los compuestos responsables del amargor de un compartimento subcelular a otro. El aceite obtenido de esta forma presenta una intensidad de amargor prácticamente nula (**Figura 9**).

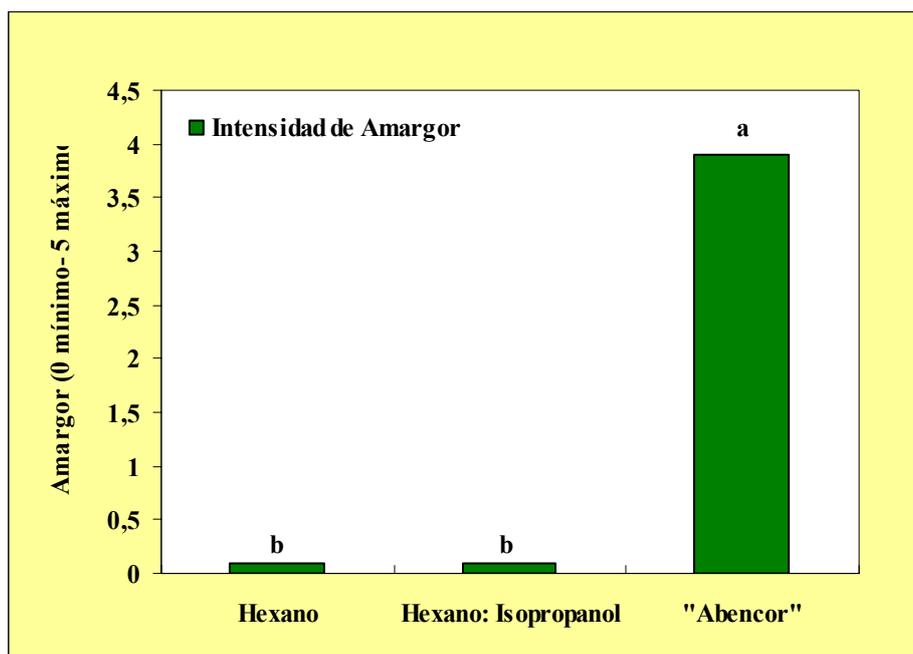


Figura 9.- Intensidad de amargor de aceites extraídos por diferentes métodos de aceitunas de la variedad 'Picual'. Las columnas de una misma serie con diferente letra minúscula presentan valores significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan.

Si los aceites contuvieran componentes amargos antes de la extracción, éstos aparecerían en el aceite tras la extracción química, pues al hallarse los mismos disueltos en el aceite se verían arrastrados por el disolvente pese a su carácter apolar. No obstante, se utilizó además otro disolvente más polar, la mezcla hexano: isopropanol (3:2, v/v) para eliminar la

posibilidad de una extracción selectiva de aceite sin componentes más polares. Sin embargo el aumento de la polaridad del disolvente no determinó un aumento de la intensidad del atributo amargo. Por el contrario, la extracción física mediante el método ‘Abencor’, que reproduce a escala de laboratorio el proceso industrial, determinó la obtención de un aceite con una intensidad de amargor y de componentes fenólicos bastante apreciable. En consecuencia, se puede concluir que el amargor es conferido al aceite de oliva virgen durante su proceso de extracción física y que no se trata de un atributo propio del aceite contenido en el interior de las células de la aceituna.

III. 4. IMPLICACIÓN DE UNA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA EN LA ENTRADA DEL ATRIBUTO AMARGO EN EL ACEITE DE OLIVA

El siguiente paso que conviene aclarar es, si el proceso de entrada del amargor en el aceite se debe a una simple puesta en contacto de éste con los componentes amargos durante la molturación y el batido de la aceituna, o si requiere el concurso de una actividad enzimática. De ser cierta esta segunda posibilidad, sería suficiente el empleo de un tratamiento físico sobre el fruto, que inactivara o simplemente redujera la actividad del hipotético enzima, para reducir la intensidad en amargor del aceite que posteriormente se extrajera del mismo. En este sentido, se estudió si la temperatura, a la que está sometido el fruto previamente al proceso de extracción, afectaba o no a la intensidad de amargor del aceite. La medida sensorial de la intensidad de atributo amargo dejó claro que los aceites que se obtuvieron de los frutos que se habían sometido a 80 °C vieron considerablemente menguado su amargor con respecto al control establecido (**Figura 10**). Sin embargo, la cata del propio fruto puso de manifiesto, que este atributo seguía presente en el mismo después del calentamiento, por lo que se debe descartar la posibilidad de que el tratamiento pudiera causar la eliminación de los compuestos responsables del amargor antes de la extracción. En consecuencia, este ensayo apoya la hipótesis de que es necesaria la intervención de una actividad enzimática, para que el amargor se incorpore al aceite virgen de oliva, pues de ser debida a meras razones físico-químicas, por la espontánea disolución de los compuestos amargos en el aceite, la temperatura previa del fruto no debería influir excesivamente en el momento de la extracción. En consecuencia, se confirma que la realización de tratamientos térmicos en el fruto puede ser factible para la reducción de la intensidad en amargor de los aceites.

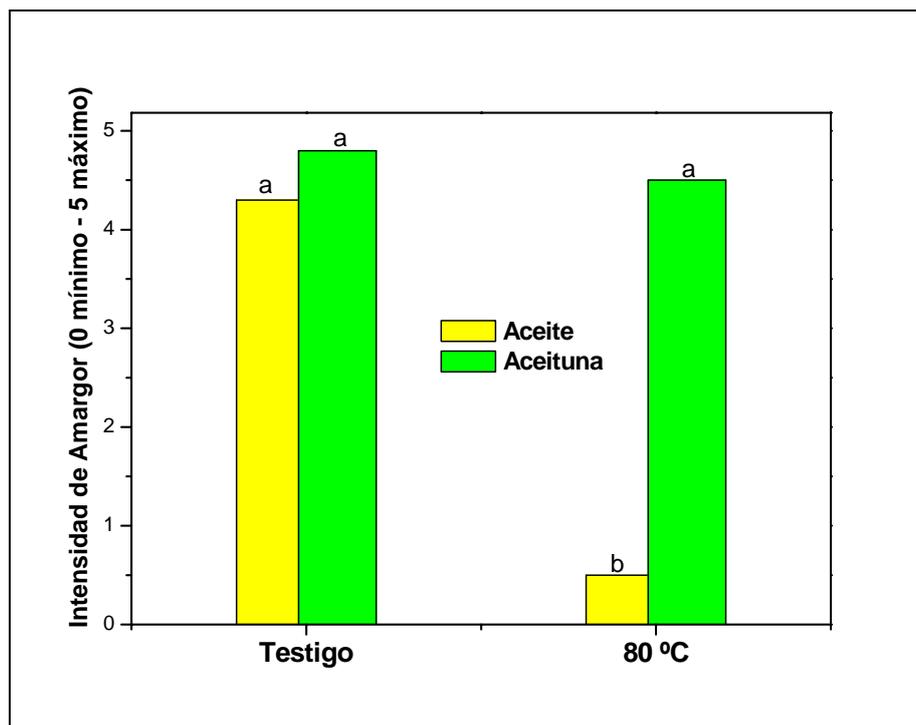


Figura 10.- Intensidad de amargor de aceitunas de la variedad 'Picual' no tratadas (testigo) o previamente mantenidas a 80 °C durante 12 horas y de los aceites extraídos por centrifugación de las mismas. Las columnas de una misma serie marcadas con diferente letra minúscula presentan valores significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan.

III. 5. TRATAMIENTOS FÍSICOS REALIZADOS A ESCALA DE LABORATORIO SOBRE LA ACEITUNA PARA LA DISMINUCIÓN DEL AMARGOR EN EL ACEITE VIRGEN

III. 5. 1. Tratamientos térmicos en cámara

III. 5. 1. 1. Conservación en frío

La conservación a 5 °C permite preservar la fisiología del fruto de manera que se puede extraer de éste un aceite virgen de máxima calidad por un tiempo prolongado (Gutiérrez et al., 1992). Sin embargo, aún no se ha constatado cómo este tipo de tratamientos afecta a la intensidad del atributo amargo. Dado que este fruto es de tipo no climatérico, la refrigeración debe provocar un retraso del proceso madurativo, pero no su interrupción completa. Cabría suponer que la aceituna durante su conservación en frío iría también madurando y, de la misma forma como cuando permanece en el árbol, iría disminuyendo paulatinamente el amargor que confiere al aceite tras su extracción. Puesto que bajo estas condiciones el fruto va desecándose, sería además previsible que las actividades enzimáticas contenidas en sus células progresivamente fueran inhibiéndose, haciéndose cada vez más

inerte desde el punto de vista bioquímico, mientras que el aceite contenido en las mismas apenas se alteraría, protegido por la propia estructura celular.

En la **Figura 11** se muestra cómo la intensidad de amargor va paulatinamente disminuyendo en los aceites, que se obtienen de aceitunas previamente conservadas a 5 °C conforme progresaba el tiempo de almacenamiento. Sin embargo, este descenso no ocurrió de forma similar en las distintas variedades estudiadas, aunque las tres evoluciones se ajustaron a un mismo tipo de patrón, siguiendo curvas polinomiales de segundo grado. Mientras que las aceitunas ‘Manzanilla’ precisaron una permanencia en cámara refrigerada de sólo 4 semanas para que pudiera extraerse de las mismas un aceite con una intensidad “media” de amargor (valor “3” en la escala de “0” a “5”), las de la variedad ‘Picual’ necesitaron 6 semanas para ver reducido a un nivel similar este atributo, y las ‘Verdiales’ no experimentaron un descenso análogo hasta dos semanas después, necesitando, en consecuencia, una permanencia doble en cámara que las primeras. Por tanto, las características particulares de cada variedad determinaron claramente las condiciones del proceso, necesitando cada una un estudio específico.

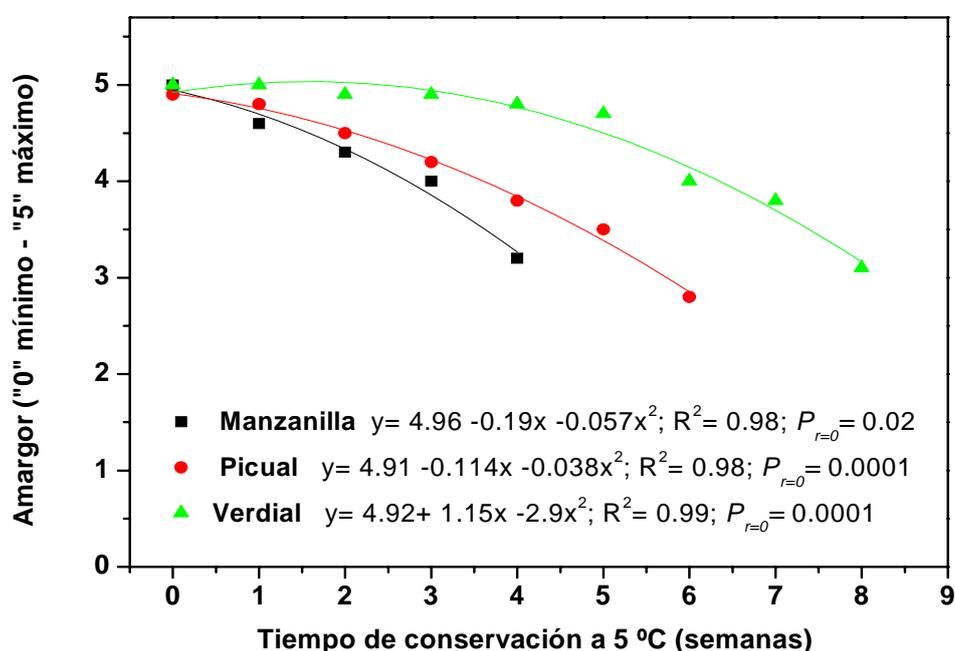


Figura 11.- Evolución de las intensidades en atributo amargo presentadas por aceites extraídos de aceitunas de diferentes variedades previamente conservadas durante tiempos crecientes a 5 °C. Cada punto corresponde a la valoración media realizada por duplicado de 6 catadores entrenados en la valoración de la calidad sensorial de los aceites vírgenes de oliva.

Ello sugiere que otros factores determinantes de las características fisiológicas de la aceituna también podrían influir en el tiempo de conservación requerido para que las actividades enzimáticas responsables de conferir el atributo amargo al aceite vayan disminuyendo su actividad durante el proceso de extracción del aceite. Sería, pues, arriesgado fijar, a priori, un tiempo determinado de almacenamiento para conseguir una reducción significativa de este atributo.

La correlación entre las condiciones de cultivo particulares de cada campaña y la determinación del tiempo idóneo de conservación refrigerada deberá dar a cada olivarero, bajo sus propias características particulares de variedad y cultivo, la experiencia necesaria para poder predecir el tiempo más indicado de almacenamiento en frío.

Las aceitunas de las tres variedades, almacenadas cuando adquirieron su tamaño definitivo y conservando aún su pigmentación verde inicial (estadio verde-maduro), fueron madurando lentamente a 5 °C, como demuestra el progresivo aumento de su IM o las paulatinas disminuciones, tanto de su índice de color, como de su dureza (**Tablas 18, 19 y 20**). Sin embargo, cada variedad respondió de manera diferente en la evolución de estos parámetros. La variedad ‘Picual’ fue la que presentó al mismo tiempo un incremento más rápido del IM y una disminución más acusada de su índice de color, mientras que la ‘Manzanilla’ experimentó un cambio más lento de estos índices que ‘Picual’, pero, simultáneamente, sufrió un ablandamiento más rápido. Dado que el atributo amargo se redujo antes en los aceites obtenidos de aceitunas ‘Manzanilla’ que en los extraídos en los frutos ‘Picual’, la reducción de la intensidad de este atributo estaría más ligada al ablandamiento de las drupas que a su cambio de color. Las ‘Verdiales’, en cambio, presentaron una evolución general del proceso madurativo más lenta que las anteriores, retrasándose tanto su cambio de color epidérmico, como su pérdida de consistencia. Estas diferencias entre variedades en el desarrollo de los parámetros, que sirven para evaluar el grado de maduración de la aceituna durante la conservación refrigerada, fueron ya observadas por García et al. (1996b), quienes encontraron que la variedad ‘Villalonga’ maduraba mucho más rápido que la ‘Blanqueta’ durante su almacenamiento a 5 °C.

En el rendimiento de la obtención de aceite virgen se distingue claramente el comportamiento de la variedad ‘Manzanilla’, propia de mesa, con valores muy inferiores del presentado por las otras dos variedades ‘Picual’ y ‘Verdial’, más utilizadas en molino. A lo largo de su almacenamiento refrigerado las ‘Manzanillas’ apenas vieron modificado este parámetro, observándose en las dos últimas semanas un ligero aumento del mismo, que no llegó a ser estadísticamente significativo. Las dos variedades aceiteras mostraron una

evolución muy parecida del rendimiento graso. Al principio de la conservación, durante las dos primeras semanas, ambas experimentaron un descenso significativo de este parámetro, que posteriormente fue aumentando, hasta alcanzar incluso valores significativamente superiores a los iniciales. La baja temperatura al inicio del procesado podría inducir cambios en la estructura de la pasta que pudieran favorecer la emulsión del aceite durante su extracción. En presencia de una humedad elevada y baja temperatura, los restos de membrana plasmática y de pared celular presentes actúan especialmente como agentes emulsionantes, dificultando la separación del aceite durante la centrifugación de la pasta (Martínez-Moreno et al., 1964; Alba-Mendoza et al., 1982). El aumento de la temperatura de procesado, en cambio, favorece la extracción del aceite. Conforme avanza el tiempo de conservación, el fruto va perdiendo humedad, con lo que el aceite extraído va representando un valor cada vez más importante con respecto al peso total, por eso va aumentando el rendimiento graso, pese a que la temperatura del proceso sigue siendo la misma, más baja que la que se usó inicialmente antes de la conservación en frío (tiempo “0”). Gutiérrez et al. (1992) y Castellano et al. (1993) describieron cómo se producía la pérdida de agua en la aceituna ‘Picual’ conservada a 5 °C y 93 % de humedad durante un periodo de 60 días, evaluándola en un promedio de un 3 %.

En cuanto a los parámetros físico-químicos que miden la calidad del aceite de oliva virgen, los aceites extraídos de las tres variedades durante todo el periodo de conservación del fruto se mantuvieron dentro de los límites establecidos para la categoría “extra”. La acidez libre de los aceites extraídos de las tres variedades experimentó un ligero aumento a medida que avanzaba el tiempo de conservación. En otros trabajos de almacenamiento refrigerado de aceitunas realizados previamente, los valores de acidez presentados por los aceites extraídos de frutos conservados por un periodo superior a los 30 días superaron los alcanzados en este trabajo. Así, Gutiérrez et al. (1992) encontraron valores de 0,33, 0,69 y 1,88 en aceites extraídos después de 30, 45 y 60 días, respectivamente de conservación a 5 °C de aceitunas ‘Picual’, que se habían almacenado con un IM medio de “2”. Cuatro años después García et al. (1996a), empleando aceitunas de la misma variedad, IM, un mismo tiempo de almacenamiento e igual temperatura, obtuvieron valores de acidez de 0,35, 0,84 y 2,91, respectivamente. Finalmente, el mismo año, en un ensayo a escala industrial García et al. (1996b), empleando las variedades ‘Blanqueta’ y ‘Villalonga’, obtuvieron valores de este parámetro de 0,6, 1,7 y 3,5 para la primera y de 0,32, 1,22 y 1,37 para la segunda, después de 32, 49 y 60 días de almacenamiento a 5 °C, respectivamente. Es muy posible que el factor determinante de que se hayan obtenido valores inferiores en este trabajo fuera el menor grado de maduración de las aceitunas que se emplearon en el ensayo. El aumento de la acidez está

estrechamente ligado normalmente con el incremento en la incidencia de podredumbre en los frutos de donde es extraído el aceite. Es un hecho reconocido que, conforme más inmaduro es un fruto, más resistente es a sufrir infecciones o daños mecánicos. Dado que en el presente trabajo no se detectó incidencia alguna de podredumbre (datos no mostrados), es normal que la acidez libre apenas se incrementara. Es de suponer que el ligero aumento de este parámetro fuera debido a la actividad lipásica interna del propio fruto, como ocurre cuando madura en el árbol (García et al., 1996c; Yousfi et al., 2006).

El índice de peróxido no mostró ninguna tendencia clara que estuviera vinculada con el proceso de conservación refrigerada de los frutos de las tres variedades estudiadas. Probablemente, este parámetro depende más de factores que no pueden ser controlados en el experimento, como la demora en los sucesivos pasos que requiere el sistema de extracción a escala de laboratorio (tiempos de filtración y decantación, la temperatura y tiempo durante la extracción o los análisis). No obstante, parece suficientemente claro que la permanencia del fruto en cámaras refrigeradas no parece afectar de manera significativa a este parámetro, que se mantiene muy alejado del límite establecido para la pérdida de categoría del aceite virgen (20 meqO/kg), independientemente del tiempo que se haya mantenido el fruto en frío.

Los valores de absorbancia en la región del ultravioleta de los aceites (K_{232} y K_{270}) apenas se afectaron por el tiempo de permanencia del fruto en la cámara frigorífica. Sólo los valores de K_{232} obtenidos de la variedad 'Picual' mostraron un leve, aunque significativo, aumento, mantenido sólo durante las 4 primeras semanas de conservación. García et al. (1996a) encontraron prácticamente el mismo efecto con aceitunas menos inmaduras de la misma variedad. Puede que este tipo de efecto sea debido a que en estas aceitunas se estimule especialmente la formación de ácidos grasos conjugados en el proceso de extracción durante el primer mes de almacenamiento, como paso inicial en la ruta de formación de aromas.

La calidad sensorial de los aceites vírgenes extraídos de las tres variedades disminuyó levemente con el tiempo de estancia de los frutos en la cámara refrigerada, siendo este descenso sólo estadísticamente significativo en la variedad 'Verdial'. En cualquier caso, estos valores siempre se mantuvieron dentro del margen propio de la calidad extra.

La evolución del contenido en carotenos y clorofilas del aceite extraído durante la conservación del fruto fue diferente en cada una de las variedades analizadas. En los aceites de la variedad 'Manzanilla' el contenido en carotenos mantuvo valores similares durante las 4 semanas que se mantuvo el fruto a 5 °C. En los extraídos a partir de aceitunas 'Picual' se registró un claro descenso inicial tras la primera semana de refrigeración, para luego ir subiendo, hasta alcanzar los valores mostrados al principio. Finalmente, en la 'Verdial' se

registra un descenso inicial muy brusco, análogo al observado en los aceites de ‘Picual’, e igualmente después experimentó un aumento en su contenido, pero sin llegar a alcanzar los valores iniciales.

Tabla 18.- Evolución del color, de la dureza, del índice de madurez y del rendimiento graso de aceitunas ‘Manzanilla’ durante su conservación a 5 °C y de diferentes parámetros de calidad de los aceites extraídos de las mismas.

	Tiempo de conservación a 5 °C (Semanas)				
	0	1	2	3	4
Índice de Madurez	0,6 c	0,7 bc	0,9 b	0,9 b	1,2 a
Dureza (N/cm ²)	47,3 a	48,5 a	48,7 a	48,3 a	41,2 b
Índice de Color [L(b-a)/100]	39,4 a	38,9 a	37,4 ab	35,8 b	34,8 b
Rendimiento (%)	4,6	4,6	4,6	4,8	4,8
Acidez (% Oleico)	0,23 b	0,21 b	0,29 a	0,31 a	0,30 a
I. Peróxidos (meqO/kg)	8,78 a	9,79 a	6,89 b	6,12 b	8,40 a
K ₂₃₂	1,69	1,77	1,62	1,75	1,67
K ₂₇₀	0,16	0,17	0,15	0,17	0,17
Análisis Sensorial	7,8	7,6	7,9	7,7	7,6
Carotenos (mg/kg)	22,61	22,66	22,57	23,61	22,09
Clorofilas (mg/kg)	35,92 b	39,22 a	39,02 a	39,49 a	41,59 a
Estabilidad (horas)	118,5	119,4	114,8	113,2	110,5

Tabla 19.- Evolución del color, de la dureza, del índice de madurez y del rendimiento graso de aceitunas ‘Picual’ durante su conservación a 5 °C y de diferentes parámetros de calidad de los aceites extraídos de las mismas.

	Tiempo de conservación a 5 °C (Semanas)						
	0	1	2	3	4	5	6
Índice de Madurez	0,7 d	0,8 d	1,0 c	1,1 c	1,5 b	1,7 b	2,3 a
Dureza (N/cm ²)	47,4 a	44,2 b	44,4 b	44,2 b	44,2 b	43,9 b	43,9 b
Índice de Color [L(b-a)/100]	33,8 a	31,5 b	30,8 b	29,4 c	27,1 d	25,5 e	23,6 f
Rendimiento (%)	18,2 b	16,5 c	17,1 c	18,3 b	18,6 b	20,4 a	20,9 a
Acidez (% Oleico)	0,18 b	0,17 b	0,17 b	0,23 a	0,24 a	0,26 a	0,24 a
I. Peróxidos (meqO/kg)	6,4 a	5,7 a	3,2 b	3,1 b	2,9 b	5,6 a	5,7 a
K ₂₃₂	1,27 b	1,57 a	1,51 a	1,64 a	1,58 a	1,30 b	1,27 b
K ₂₇₀	0,15	0,14	0,15	0,14	0,16	0,14	0,15
Análisis Sensorial	7,7	7,5	7,6	7,4	7,5	7,4	7,4
Carotenos (mg/kg)	14,44 a	10,82 c	11,28 c	10,97 c	14,13 a	14,76 a	12,92 ab
Clorofilas (mg/kg)	24,26 b	25,30 b	27,10 b	33,74 a	32,63 a	35,29 a	26,39 b
Estabilidad (horas)	174,0	169,9	170,4	164,6	172,1	166,5	165,7

Tabla 20.- Evolución del color, de la dureza, del índice de madurez y del rendimiento graso de aceitunas 'Verdial' durante su conservación a 5 °C y de diferentes parámetros de calidad de los aceites extraídos de las mismas.

	Tiempo de conservación a 5 °C (Semanas)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Índice de Madurez	0,7 d	0,8 cd	0,8 cd	0,9cd	1,0 c	1,0 c	1,2 bc	1,4 b	1,8 a
Dureza (N/cm²)	46,4 a	46,6 a	45,8 a	45,7 a	45,2 ab	44,9 ab	43,5 b	40,2 c	38,2 d
Índice de Color [L(b-a)/100]	29,4 a	28,7 a	28,8 a	27,6 ab	27,2 ab	26,7 b	24,6 c	22,5 d	20,4 e
Rendimiento (%)	20,0 c	18,3 d	18,5 d	21,2 b	21,1 b	22,4 a	22,2 a	22,1 a	22,2 a
Acidez (% Oleico)	0,28	0,27	0,26	0,30	0,32	0,34	0,32	0,36	0,38
I. Peróxidos (meqO/kg)	5,4 c	5,6 c	4,2 d	5,1 c	5,4 c	5,4 c	8,8 a	6,8 b	3,0 e
K₂₃₂	1,51	1,56	1,61	1,53	1,48	1,47	1,52	1,50	1,61
K₂₇₀	0,15	0,15	0,15	0,16	0,13	0,13	0,15	0,16	0,15
Análisis Sensorial	7,5 a	7,4 a	7,4 a	7,5 a	7,3 a	7,4 a	7,3 a	7,2 ab	7,0 b
Carotenos (mg/kg)	22,07 a	15,70 c	16,21 c	16,19 c	15,93 c	18,70 b	17,14 b	17,47 b	18,92 b
Clorofilas (mg/kg)	40,26 a	23,1 b	22,87 b	22,16 b	22,60 b	22,57 b	21,97 b	21,36 b	21,59 b
Estabilidad (h)	76,0	75,6	74,8	75,2	74,1	74,4	73,8	73,2	72,6

En cuanto a las clorofilas, su contenido no dejó de subir en las tomas de muestra realizadas con la variedad 'Manzanilla' en las 4 semanas que se mantuvo en frío, coincidiendo en este periodo con lo mostrado por los aceites obtenidos de 'Picual', que mostraron un crecimiento continuado durante 5 semanas para descender bruscamente en la sexta, mientras que los de 'Verdial' experimentaron en la primera semana una pérdida superior al 40 % de su contenido inicial, manteniéndose desde este momento hasta el final del periodo de 8 semanas con valores similares de este parámetro. La interpretación de estos resultados se hace muy difícil, dada la complejidad de factores, que determinan la presencia de estos pigmentos en el aceite. Así, su contenido en el fruto, el reparto de estos pigmentos entre las fases oleosa y acuosa durante la extracción física, las diferentes actividades enzimáticas, o reacciones químicas, que pueden determinar su formación o destrucción, tanto en el propio fruto como durante su procesado, etc. Con tantas causas de variabilidad sería claramente difícil e injusto, establecer un criterio de limitación de calidad en los aceites vírgenes, utilizando como base el nivel de la presencia de estos pigmentos, independientemente de la variedad de procedencia.

Finalmente, la estabilidad de los aceites apenas se redujo, como consecuencia de la conservación en frío del fruto. En valores relativos disminuyó en menos de un 10 % para las tres variedades.

El contenido total en compuestos fenólicos de los aceites extraídos fue descendiendo conforme transcurría el periodo de conservación a 5 °C de los frutos de las tres variedades estudiadas (**Tablas 21, 22 y 23**). En los aceites procedentes de ‘Picual’ el descenso del contenido en derivados secoiridoideos (45,8 %) fue proporcionalmente superior al experimentado por los ortodifenoles (31,2 %), debido especialmente a la pérdida registrada en el contenido de compuestos derivados del tirosol (FAAL y FDAL), mientras que en los aceites procedentes de las variedades ‘Manzanilla’ y ‘Verdial’ la reducción en las diferentes familias de compuestos fenólicos fue más homogénea. Resulta complicado establecer paralelismos entre la evolución del contenido de estos compuestos y la presencia del atributo amargo en el aceite. En principio se confirma que la reducción de los primeros coincidió con el descenso de la segunda (**Figura 11**). El mantenimiento por mayor tiempo de una elevada presencia del atributo amargo coincidió con una más lenta reducción del contenido en compuestos fenólicos de los aceites. Así, la variedad ‘Verdial’ necesitó un periodo de 8 semanas de almacenamiento, para ver reducido su contenido en estos compuestos de una manera comparable a lo que sucedió a las 6 semanas en ‘Picual’ y a las 4 en ‘Manzanilla’, coincidiendo con el grado de amargor exhibido por sus aceites respectivos. Sin embargo, se hace imposible identificar exactamente qué compuestos individuales son los principales responsables del amargor, pues la existencia de valores de saturación del atributo dificulta el establecimiento de correlaciones fiables. Según Mateos et al. (2004), concentraciones $\geq 0,5$ mmol/kg de FAAO en el aceite determinaban una saturación en la percepción sensorial del atributo amargo. En el presente trabajo los aceites extraídos de las tres variedades al final de la conservación del fruto exhibieron siempre valores superiores a este límite y, sin embargo, presentaron sólo una intensidad media de este atributo.

Convendría destacar que las pérdidas de estabilidad registradas para las tres variedades no coincidieron en proporción con las pérdidas en compuestos fenólicos (**Tablas 18, 19 y 20**). Así, la mayor pérdida porcentual de estabilidad correspondió a los aceites extraídos de la variedad ‘Manzanilla’ con un 6,8 %, seguido por los de ‘Picual’ con un 5,7 % y finalmente por los de ‘Verdial’ con apenas un 4,5 % de descenso. Sin embargo, la mayor pérdida relativa de compuestos fenólicos correspondió a la variedad ‘Verdial’ con un 50 %, seguido por los de ‘Picual’ con un 45 % y por los aceites de ‘Manzanilla’ con un 32 %. Curiosamente, además, los aceites que de partida exhibieron un mayor contenido en cualquiera de estos compuestos

(los aceites extraídos de aceitunas ‘Verdial’) fueron los que presentaron sistemáticamente una menor estabilidad. Uceda y Hermoso, (1998) explicaron este fenómeno por la dependencia que la estabilidad de los aceites presenta con respecto al conjunto de las condiciones características propias de cada variedad, empezando por su particular composición en ácidos grasos. Obviamente, resultaría erróneo sacar conclusiones estableciendo correlaciones exclusivamente entre los contenidos fenólicos y las estabilidades de aceites procedentes de diferentes variedades.

Tabla 21.- Evolución de la composición fenólica de aceites extraídos de aceitunas ‘Manzanilla’ conservadas previamente a 5 °C durante diferentes tiempos.

Compuestos fenólicos (mmol/kg)	Tiempo de conservación a 5 °C (Semanas)				
	0	1	2	3	4
Hidroxitirosol	0,020	0,049	0,037	0,015	0,035
Tirosol	0,04	0,058	0,04	0,031	0,050
Ac. Vanílico	0,004	0,003	0,003	0,003	0,004
Vanillina	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ac. p-Cumárico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acetato Hidroxitirosol	0,065 a	0,014 b	0,014 b	0,019 b	0,021 b
FDAO	0,885 a	0,468 b	0,475 b	0,542 b	0,466 b
Acetato Tirosol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
FDAL	0,712 a	0,439 b	0,389 b	0,478 b	0,352 b
Pinoresinol	0,012	0,000	0,007	0,013	0,013
Ac. Cinámico	0,003	0,004	0,003	0,002	0,002
Acetoxy-pinoresinol	0,012	0,021	0,015	0,013	0,012
FAAO	0,852 b	1,160 a	1,011 a	0,743 b	0,735 b
FAAL	0,569 b	0,703 a	0,587 b	0,487 c	0,438 c
Ac. Ferúlico	0,005	0,005	0,007	0,003	0,008
Luteolina	0,006	0,007	0,006	0,007	0,009
Apigenina	0,004	0,004	0,004	0,005	0,006
Total Fenoles	3,188 a	2,935 b	2,610 c	2,368 d	2,154 e
Total Ortodifenoles	1,828 a	1,698 ab	1,546 bc	1,330 d	1,267 d
Total Secoiridoideos	3,019 a	2,770 b	2,466 c	2,247 d	1,992 e

(FDAO) Forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FDAL) Forma dialdehídica de aglucona del ligustrósido. (FAAO) Forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FAAL) Forma aldehídica de la aglucona del ligustrósido.

Tabla 22.- Evolución de la composición fenólica de aceites extraídos de aceitunas ‘Picual’ conservadas previamente a 5 °C durante diferentes tiempos.

Compuestos fenólicos (mmol/kg)	Tiempo de conservación a 5 °C (Semanas)						
	0	1	2	3	4	5	6
Hidroxitirosol	0,015	0,026	0,016	0,011	0,010	0,017	0,013
Tirosol	0,017	0,016	0,012	0,009	0,010	0,013	0,018
Ac, Vanílico	0,002	0,006	0,006	0,004	0,003	0,007	0,006
Vanillina	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ac, p-Cumárico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acetato Hidroxitirosol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
FDAO	0,266 a	0,273 a	0,264 a	0,256 a	0,228 a	0,259 a	0,135 b
Acetato Tirosol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
FDAL	0,235 a	0,158 b	0,118 c	0,171 b	0,107 c	0,108 c	0,083 c
Pinoresinol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ac, Cinámico	0,005	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003
Acetoxy-pinoresinol	0,035 a	0,022 b	0,020 b	0,017 b	0,016 b	0,016 b	0,014 b
FAAO	1,601 a	1,534 a	1,696 a	1,267 b	1,342 b	1,273 b	1,139 b
FAAL	1,332 a	0,713 b	0,611 c	0,530 d	0,516 d	0,516 d	0,502 d
Ac, Ferúlico	0,003	0,004	0,002	0,002	0,001	0,003	0,003
Luteolina	0,021	0,022	0,026	0,027	0,022	0,019	0,023
Apigenina	0,012	0,012	0,012	0,011	0,011	0,011	0,011
Total Fenoles	3,544 a	2,789 b	2,785 b	2,309 c	2,268 c	2,244 c	1,950 d
Total Ortodifenoles	1,903 a	1,854 a	2,001 a	1,562 b	1,602 b	1,568 b	1,310 c
Total Secoiridoideos	3,433 a	2,678 a	2,688 b	2,225 c	2,193 c	2,156 c	1,859 d

(FDAO) Forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FDAL) Forma dialdehídica de aglucona del ligustrósido. (FAAO) Forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FAAL) Forma aldehídica de la aglucona del ligustrósido.

Tabla 23.- Evolución de la composición fenólica de aceites extraídos de aceitunas 'Verdial' conservadas previamente a 5 °C durante diferentes tiempos.

Compuestos fenólicos (mmol/kg)	Tiempo de conservación a 5 °C (Semanas)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Hidroxitiroso	0,032	0,036	0,025	0,025	0,032	0,029	0,019	0,011	0,023
Tiroso	0,111 a	0,129 a	0,128 a	0,120 a	0,113 a	0,062 b	0,068 b	0,054 b	0,051 b
Ac. Vanílico	0,009	0,008	0,006	0,007	0,008	0,008	0,005	0,006	0,004
Vanilina	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ac. p-Cumárico	0,003	0,000	0,000	0,002	0,001	0,002	0,001	0,001	0,004
Acetato Hidroxitiroso	0,050	0,027	0,023	0,014	0,017	0,015	0,010	0,011	0,005
FDAO	0,458 bc	0,621 a	0,677 a	0,530 b	0,387 c	0,553 b	0,335 c	0,264 d	0,237 d
Acetato Tiroso	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
FDAL	0,425 c	0,546 b	0,643 a	0,527 b	0,327 d	0,561 b	0,288 d	0,300 d	0,278 d
Pinosino	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ac. Cinámico	0,002	0,003	0,003	0,005	0,003	0,003	0,004	0,003	0,003
Acetoxy-pinosino	0,020	0,026	0,023	0,031	0,021	0,019	0,027	0,020	0,016
FAAO	1,912 a	1,679 b	1,223 c	1,255 c	1,015 d	0,766 e	0,980 d	0,829 e	0,760 e
FAAL	1,957 a	1,653 b	1,195 d	1,316 c	1,087 e	0,826 g	1,085 e	0,938 f	0,848 fg
Ac. Ferúlico	0,004	0,004	0,004	0,003	0,004	0,004	0,003	0,004	0,003
Luteolina	0,010	0,011	0,007	0,009	0,011	0,007	0,010	0,008	0,007
Apigenina	0,007	0,007	0,005	0,006	0,007	0,004	0,002	0,006	0,005
Total Fenoles	5,001 a	4,749 b	3,962 c	3,851 c	3,034 d	2,859 e	2,837 e	2,455 f	2,244 g
Total Ortodifenoles	2,462 a	2,374 a	1,956 b	1,834 b	1,463 c	1,370 d	1,354 d	1,123 e	1,032 f
Total Secoiridoideos	4,753 a	4,499 b	3,739 c	3,629 c	2,817 d	2,705 d	2,688 d	2,331 e	2,123 f

(FDAO) Forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FDAL) Forma dialdehídica de aglucona del ligustrósido. (FAAO) Forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FAAL) Forma aldehídica de la aglucona del ligustrósido.

III. 5. 1. 2. Tratamientos de calor mediante transmisión por aire

El amargor del aceite de oliva virgen, medido sensorialmente, decreció linealmente conforme se aumentaba la temperatura aplicada a frutos de la variedad ‘Manzanilla’ durante 24 horas antes de su procesamiento en una cámara termostaticada (**Figura 12**). El uso de un tratamiento a 40 °C permitió la obtención de aceite con un nivel de amargor medio (entorno al valor de “3” en la escala de “0” a “5”), mientras que el aceite obtenido de frutos no sometidos a tratamiento (control) exhibía una intensidad cercana a la extrema de este atributo (“5”). En consecuencia, estos resultados claramente demuestran cómo la aplicación de este tipo de tratamiento poscosecha puede conseguir una disminución del exceso de amargor del aceite de oliva virgen hasta un nivel perfectamente aceptable para el consumidor. Esta reducción de amargor se vio acompañada por una disminución también lineal del contenido en el conjunto de derivados secoiridoideos del hidroxitirosol, apuntando una posible estrecha relación entre ambas. Autores como García et al. (2001), Gutiérrez et al. (2003) o Mateos et al. (2004) han vinculado la presencia del atributo amargo en los aceites de oliva con al menos uno de estos compuestos.

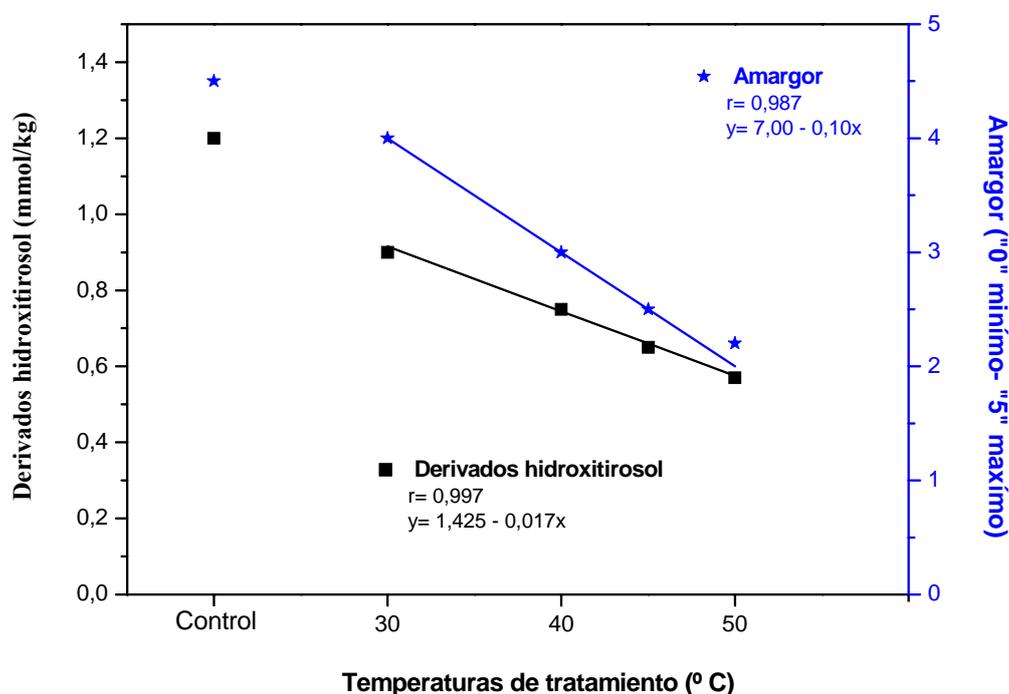


Figura 12.- Efecto del calentamiento durante 24 horas a diferentes temperaturas de aceitunas ‘Manzanilla’ en la intensidad del amargor y el contenido en derivados secoiridoideos del hidroxitirosol del aceite posteriormente extraído. Cada punto es la media de tres replicados.

El tratamiento térmico a temperaturas ≤ 45 °C apenas afectó a los parámetros legalmente establecidos para determinar el grado de calidad de los aceites de oliva (**Tabla 24**). Sin embargo, el tratamiento a 50 °C determinó una disminución significativa de la valoración absoluta de la calidad sensorial de los aceites, aunque ello no determinó una pérdida del nivel comercial del aceite, pues se mantuvo por encima del valor mínimo establecido para la categoría extra (“6,5”). Tres catadores pusieron de manifiesto la aparición de un atributo sensorial descrito como “habichuela verde cocida”, ajeno a los que se encuentran habitualmente en este producto. Por otra parte, también se observó un ligero, aunque significativo, aumento del índice de peróxidos, cuando se emplearon tratamientos ≥ 40 °C, pero este incremento se encuentra por debajo del límite establecido para que se pierda la categoría (20 meqO /kg). Ni la acidez, ni las absorbancias en la región ultravioleta se vieron afectadas como consecuencia del tratamiento aplicado.

Tabla 24.- Parámetros de calidad del aceite de oliva virgen obtenido a partir de aceitunas ‘Manzanilla’ no tratadas (control) o previamente calentadas a diferentes temperaturas durante 24 horas. Cada punto es el valor medio de tres replicados. En cada columna los valores seguidos por una misma letra minúscula no son diferentes significativamente ($P \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan. La falta de letras minúsculas indica la ausencia de efecto significativo ($P \leq 0,05$) del tratamiento sobre la variable por ANOVA.

Temperaturas (°C)	Acidez (% Oleico)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	I. Peróxidos (meqO/kg)	A. Sensorial (1 – 9) ^a
Control	0,17	1,48	0,12	7,73 b	8,0 a
30 °C	0,20	1,54	0,13	7,65 b	8,0 a
40 °C	0,18	1,51	0,13	8,21 a	8,0 a
45 °C	0,18	1,40	0,12	8,25 a	7,8 a
50 °C	0,11	1,43	0,11	8,40 a	6,8 b

^a "1" significa la peor calidad posible y "9" la mejor.

Otros parámetros de calidad, no contemplados en la legislación para evaluar el grado de calidad comercial de los aceites, fueron, en cambio, sensiblemente afectados por el calentamiento mediante transmisión por aire (**Tabla 25**). El contenido en fenoles fue el parámetro más sensible al tratamiento, observándose una reducción significativa del mismo incluso tras el tratamiento más suave realizado a sólo 30 °C. Probablemente, la reducción de la presencia de estos compuestos de naturaleza antioxidante esté relacionada con la pérdida de estabilidad, que también tuvo lugar con la aplicación del tratamiento, si bien este descenso sólo fue significativo tras la aplicación de temperaturas ≥ 45 °C. Es decir, los descensos

significativos de contenido fenólico hallados tras los tratamientos a 30 y 40 °C no se tradujeron en disminuciones igualmente significativas de estabilidad ante la oxidación. Es posible que a 30 y 40 °C tenga lugar una inactivación parcial de los enzimas responsables de la degradación de la oleuropeína o el ligustrósido, que reduzca la formación sólo de derivados fenólicos con baja o nula actividad antioxidante, mientras que la aplicación de temperaturas superiores puede afectar además la formación de otras moléculas fenólicas con mayor capacidad de proteger al aceite contra la oxidación. Por otra parte, el tratamiento térmico indujo un importante incremento de los pigmentos fotosintéticos en el aceite de oliva. Los aceites extraídos de frutos tratados a 40 °C presentaron un contenido aproximadamente doble en carotenos y clorofilas comparados con el obtenido a partir de frutos no tratados. Como resultado, estos aceites adquirieron un color más intenso (verde oscuro), que se podía distinguir a simple vista del obtenido a partir de aceitunas no sometidas al calentamiento previo a la extracción, dándose la paradoja de que los aceites más verdes, tradicionalmente relacionados con el uso en la extracción de frutos más inmaduros y por tanto más amargos, fueron en realidad más dulces, que los menos verdosos del control.

En resumen, el mantenimiento de aceitunas ‘Manzanilla’ durante 24 horas a 40 °C, fácilmente alcanzable en la Cuenca Mediterránea, permitió una reducción del atributo amargo del aceite, que posteriormente se extrajo de las mismas, hasta un nivel perfectamente tolerable, sin que ello supusiera un detrimento significativo de su calidad comercial.

Tabla 25.- Estabilidad ante la oxidación, fenoles totales y contenido en pigmentos del aceite de oliva virgen obtenido a partir de aceitunas ‘Manzanilla’ no tratadas (control) o previamente calentadas a diferentes temperaturas durante 24 horas. Cada punto es el valor medio de tres replicados. En cada columna los valores seguidos por una misma letra minúscula no son diferentes significativamente ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan.

Temperaturas (°C)	Estabilidad (horas)	Fenoles totales (mmol/kg)	Carotenos (mg/kg)	Clorofilas (mg/kg)
Control	69,35 a	1,89 a	26,50 c	38,60 b
30 °C	70,75 a	1,70 b	26,80 c	37,50 b
40 °C	67,15 a	1,48 c	55,05 b	53,36 a
45 °C	57,00 b	1,31d	61,66 a	56,54 a
50 °C	55,00 b	1,23 e	62,60 a	58,19 a

En un segundo ensayo, utilizando aceitunas de la variedad ‘Verdial’, se buscó el tiempo idóneo de ensayo, manteniendo los 40 °C como temperatura de tratamiento, dado que en el experimento anteriormente citado fue la que obtuvo mejores resultados. El aumento del tiempo de tratamiento determinó, al igual que lo hiciera la temperatura en el anterior ensayo, un descenso lineal tanto de la intensidad del amargor, como de los derivados secoiridoideos del hidroxitirosol en los aceites extraídos después del calentamiento (**Figura 13**).

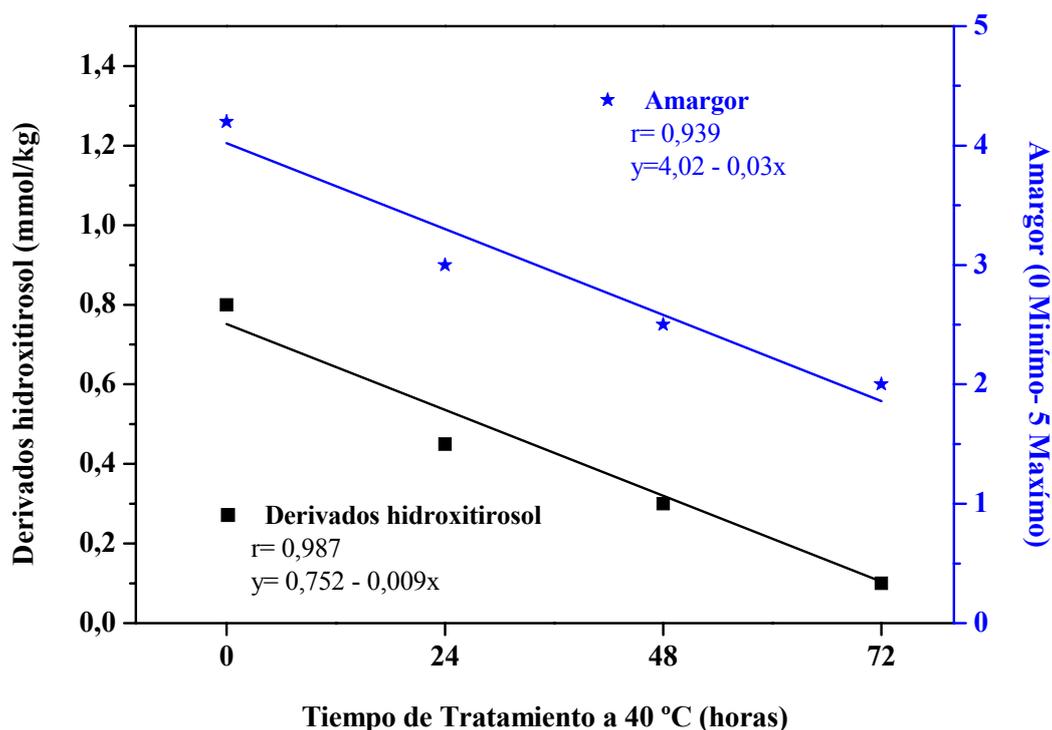


Figura 13.- Efecto del calentamiento a 40 °C durante diferentes tiempos de aceitunas ‘Verdial’ en la intensidad del amargor y el contenido en derivados secoiridoideos del hidroxitirosol del aceite posteriormente extraído. Cada punto representa el valor medio de tres replicados.

Todos los aceites obtenidos a partir de estas aceitunas ‘Verdiales’, calentadas durante diferentes tiempos a 40 °C, mantuvieron el nivel de calidad establecido para la categoría virgen extra (**Tabla 26**). Sólo el tratamiento a 40 °C durante 72 horas registró un aumento significativo de su índice de peróxidos, sin llegar a alcanzar el límite estipulado.

El contenido en fenoles totales fue claramente afectado, decreciendo significativamente conforme aumentaba el tiempo de tratamiento a 40 °C (**Tabla 27**). La estabilidad oxidativa no cambió en el aceite extraído tras las primeras 24 horas de tratamiento; sin embargo, se redujo significativamente en los obtenidos tras 48 y 72 horas. El descenso

máximo en este parámetro supuso una pérdida aproximada de la tercera parte del valor alcanzado inicialmente. No obstante, en valores absolutos, la estabilidad mínima presentada (29,6 horas) es comparable con la que habitualmente presentan los aceites procedentes de la variedad ‘Arbequina’, sin que se les haya aplicado ningún tipo de tratamiento térmico y no por ello dejan de ser consideradas como de calidad excelente (García et al., 1996c).

Tabla 26.- *Parámetros de calidad del aceite de oliva virgen obtenido a partir de aceitunas ‘Verdial’ mantenidas a 40 °C durante diferentes tiempos inmediatamente antes de su procesamiento. Cada punto es el valor medio de tres replicados. En cada columna los valores seguidos por una misma letra minúscula no son diferentes significativamente ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan. La falta de letras minúsculas indica la ausencia de efecto significativo ($p \leq 0,05$) del tratamiento sobre la variable por ANOVA.*

Tiempo (horas)	Acidez (% Oleico)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	I. Peróxidos (meqO/kg)	Análisis Sensorial
0	0,19	1,56	0,15	2,78 b	8,3
24	0,20	1,54	0,14	2,53 b	8,0
48	0,23	1,50	0,13	2,90 b	7,7
72	0,22	1,40	0,14	4,35 a	7,8

Tabla 27.- *Estabilidad ante la oxidación, fenoles totales y contenido en pigmentos del aceite de oliva virgen obtenido a partir de aceitunas ‘Verdial’ calentadas a temperaturas de 40 °C durante diferentes tiempos inmediatamente antes de su procesamiento. Cada punto es el valor medio de tres replicados. En cada columna los valores seguidos por una misma letra minúscula no son diferentes significativamente ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan.*

Tiempo (horas)	Estabilidad (horas)	Fenoles totales (mmol/kg)	Carotenos (mg/kg)	Clorofilas (mg/kg)
0	46,3 a	2,14 a	55,96 c	55,36 c
24	46,5 a	1,60 b	66,83 a	67,38 a
48	34,6 b	1,22 c	64,52 b	60,36 b
72	29,6 c	0,75 d	55,63 c	50,34 d

El contenido en pigmentos registró un aumento significativo inicial tras las primeras 24 horas de tratamiento, tanto en carotenos como en clorofilas, para posteriormente irse reduciendo, sucesivamente, a las 48 y 72 horas, cuando presentaron valores similares (carotenos) o incluso significativamente inferiores que los iniciales (clorofilas). El tratamiento térmico podría inducir una mejor extracción de los pigmentos, afectando a la estructura del cloroplasto, y/o provocando una inhibición de los enzimas responsables de la degradación de

estos compuestos durante el proceso de extracción. Los resultados obtenidos apoyan la primera de las hipótesis propuestas, ya que si el aumento de pigmentos se debiera sólo a la inhibición de una actividad enzimática, ésta sería tanto mayor o, como mínimo, igual conforme aumentara el tiempo de tratamiento, pero no tiene sentido que una inhibición inducida térmicamente disminuya con el tiempo. En cambio, aunque la rotura de los cloroplastos también aumentaría con el tiempo, el mantenimiento prolongado del tratamiento también podría inducir la rotura de los pigmentos en el interior del fruto y la consecuente reducción de su concentración tras la extracción física.

III. 5. 1. 3. Tratamientos con atmósfera modificada

La modificación atmosférica, producida por la respiración de las aceitunas almacenadas en el contenedor cerrado herméticamente, se puso de manifiesto por las concentraciones halladas al final del periodo de conservación de 72 horas (**Tabla 28**). La concentración de CO₂ aumentó considerablemente con el ensayo en atmósfera modificada, tanto a 20 como a 40 °C. Esta concentración se vio fuertemente incrementada por la adición inicial de 30 ppm de etileno, en las dos temperaturas empleadas. Dado que la concentración de O₂ a 20 °C fue prácticamente la misma que a 40 °C en el envase cerrado, cabe concluir que la presencia de este gas indujo otras actividades enzimáticas liberadoras de CO₂ ajenas a la respiración, pues el aumento del CO₂ formado no supuso una mayor disminución de la concentración final de O₂. Tanto a 20 como a 40 °C, se detectó producción de etileno por el fruto almacenado, mínimo (0,1 ppm) en el contenedor abierto y apreciable en los cerrados (2,7 y 2,0 ppm, respectivamente), en donde se formó la atmósfera modificada. En los recipientes a los que se añadieron 30 ppm de etileno se mantuvo aproximadamente esta misma concentración a 20 °C y se redujo aproximadamente a la mitad al aumentar la temperatura de tratamiento a 40 °C. Esta reducción claramente significativa demuestra que el fruto a esta temperatura metaboliza más eficientemente el etileno. En cualquier caso, como ya se ha dicho, la presencia de etileno en atmósfera modificada pasiva indujo tanto a 20 como a 40 °C una mayor producción de CO₂ con un menor consumo de oxígeno. Por tanto, sería de suponer que de alguna forma el fruto tuvo que captar la fitohormona antes de responder, acelerando la producción de CO₂. En consecuencia, bajo esta perspectiva, los resultados apoyarían la hipótesis de que a 20 °C el fruto respondería a la adición de etileno externo con la propia síntesis de este gas, de manera que se compensaría el gas consumido con el producido, mientras que a 40 °C el etileno añadido se consumiría igualmente, pero luego su

síntesis no se produciría o, al menos, sería más reducida, de manera que el balance total entre el etileno formado y el consumido se inclinaría hacia este último en la atmósfera de conservación. Sin embargo, en ausencia de etileno externo la síntesis de este gas fue sólo ligeramente inferior a 40 °C. Ello podría ser debido a que la concentración alcanzada de etileno espontáneamente no fuera suficiente para que se desarrollaran en los frutos las mismas actividades metabólicas que se produjeron con la adición de etileno externo. En resumen, se ha detectado formación de etileno por la aceituna en atmósfera modificada y se intuye que bajo esta atmósfera la presencia de 30 ppm de este gas ha acelerado actividades descarboxilasas y, probablemente, ha estimulado la síntesis de etileno en la aceituna. En los frutos climatéricos la maduración se puede estimular sometiendo al fruto a la acción de una concentración umbral de etileno externo, que será tanto más baja en cuanto éste se halle con un grado de maduración más cercano al punto climatérico. Como es sabido, cuando el fruto alcanza el punto climatérico se dispara la respiración, la síntesis auto-catalizada de etileno y todo el metabolismo asociado al proceso madurativo. Los frutos no climatéricos, en cambio, responden a la exposición al etileno externo de una manera proporcional a la concentración recibida, sin que exista un valor umbral a partir del cual se desarrollen al mismo tiempo todos los procesos que conlleva la maduración del fruto: cambio de color con pérdida de clorofilas, ablandamiento, movilización de compuestos de reserva, eliminación de polifenoles, etc. Estos frutos sólo responden parcialmente a la acción de este gas y no presentan un pico climatérico. Por ejemplo, los cítricos reaccionan ante el etileno variando su color, sustituyendo los pigmentos clorofílicos de su epidermis por carotenos, pero se ablandan muy poco y no aumenta su contenido en sólidos solubles, madurando sólo parcialmente. La consideración de la aceituna como fruto climatérico o no es un hecho controvertido. Los primeros estudios realizados sobre este fruto resolvieron su inclusión entre los no climatéricos (Maxie et al., 1960). Sin embargo, posteriormente se encontró que este fruto presentaba dos facetas según estuviera cosechado o no. En el árbol la aceituna parece mostrar un pico de respiración climatérica, que puede ser inducido por etileno y que acelera todos los procesos responsables de la maduración del fruto. Por el contrario, los frutos cosechados en el mismo momento de la aplicación en el árbol y tratados igualmente no experimentaron este fenómeno (Rugini et al., 1982). Posteriormente, Fernández-Bolaños et al. (1997) observaron que el etileno no era capaz de estimular la actividad o la síntesis de enzimas en aceitunas verdes cosechadas, pero que sí podía desarrollar este efecto en las que ya habían adquirido la pigmentación negra en su epidermis. En la misma línea, Ranalli et al. (1998) encontraron un pico respiratorio climatérico en aceitunas cosechadas de las variedades 'Frantoio' y 'Leccino' con IM de '3,5'

y '4,5', respectivamente, y proponen este momento como el idóneo para su procesamiento para obtener aceites con las mejores características de calidad. Sin embargo, Nanos et al. (2002) encontraron que las aceitunas de la variedad griega de mesa 'Conservolea', cosechadas tanto en la etapa verde como negra, no presentaban el pico respiratorio climatérico, ni la síntesis autocatalizada de etileno propio de los frutos de este tipo. Nuestros resultados, en principio, apoyan, pero no demuestran, la hipótesis del carácter climatérico de este fruto, ya que la síntesis de etileno como respuesta a la aplicación de etileno externo es un claro síntoma de crisis climatérica, así como el estímulo inducido por etileno de actividades enzimáticas que intervienen en el progreso de la maduración del fruto, si bien esto último puede también ser experimentado por frutos no climatéricos.

Tabla 28.- Concentraciones finales de CO₂, O₂ y C₂H₄ de las atmósferas de conservación usadas con aceituna 'Lechín' mantenidas a diferentes temperaturas durante 72 horas y efecto de los distintos tratamientos sobre su color y dureza. Cada valor corresponde a la media de 100 determinaciones. En una misma columna los valores seguidos al menos por una misma letra minúscula no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan.

Temperatura	Atmósfera	CO ₂ (%)	O ₂ (%)	C ₂ H ₄ (ppm)	Índice de Color (L(b-a)/100)	Dureza (N/cm ²)
Inicial		0,0 c	21,0 a	0,0 d	29,96 a	47,75 a
20 °C	Aire	0,1 c	21,0 a	0,1 d	29,87 a	47,68 a
	At. Mod.	18,8 b	4,8 b	2,7 c	30,50 a	47,62 a
	At. Mod.+Etileno*	31,7 a	4,4 b	32,3 a	27,56 b	47,32 a
40 °C	Aire	0,1 c	21,0 a	0,1 d	29,54 a	40,64 b
	At. Mod.	20,2 b	2,4 c	2,0 c	29,61 a	41,52 b
	At. Mod.+Etileno*	29,8 a	5,9 b	12,9 b	7,30 c	39,45 b

* 30 ppm

Por otra parte, la adición de etileno a la atmósfera modificada aceleró la pérdida del color verde superficial del fruto, sobre todo cuando éste se mantuvo a mayor temperatura, comportándose de manera análoga a como actúa en el desverdizado de cítricos. En cambio no pareció ejercer ningún efecto sobre su textura, mostrando en este sentido un comportamiento propio de fruto no climatérico. El uso de 40 °C durante 72 horas indujo en la variedad 'Lechín' una notable pérdida de textura, sin que se observara ningún efecto adicional atribuido al uso de atmósfera modificada en este parámetro de calidad del fruto.

El uso de una atmósfera modificada pasiva, manteniendo al fruto en un recipiente cerrado herméticamente, en donde el CO₂ producido por la respiración de las aceitunas no

podía escapar al exterior y el O₂ consumido en el mismo proceso no podía ser reemplazado por el presente en el aire exterior, no indujo a 20 °C una pérdida significativa del contenido en derivados de hidroxitirosol, ni redujo la intensidad del atributo amargo en el aceite (**Figura 14**). Sin embargo, el uso adicional de etileno en la atmósfera modificada empleada para la conservación de estos frutos provocó un descenso significativo tanto de este atributo como de la presencia de los citados derivados fenólicos. Así, el aceite extraído de frutos tratados con etileno en atmósfera modificada a temperatura ambiente (20 °C) apenas presentó un nivel medio de amargor (valoración en torno a ‘3’), mientras que los procedentes de aceitunas conservadas el mismo tiempo, tanto en aire como en atmósfera modificada, exhibieron aproximadamente el mismo nivel de amargor que la muestra inicial (\geq ‘4’, “intensidad fuerte”), sin que se registrara diferencia significativa alguna entre éstos. En consecuencia, el aumento de CO₂ y la disminución de O₂ en la atmósfera de almacenamiento de la aceituna tuvieron una escasa influencia para el control del amargor en el aceite posteriormente extraído, en cambio el empleo de etileno en estas condiciones permitió la obtención de un nivel aceptable para el consumidor de este atributo. La elevación de la temperatura de almacenamiento hasta 40 °C indujo una elevada disminución del nivel de amargor de los aceites posteriormente extraídos, independientemente de la atmósfera que se empleara en este periodo, por lo que se mostró como el tratamiento más eficaz al respecto, sin que se requiriera el concurso de sistemas más costosos.

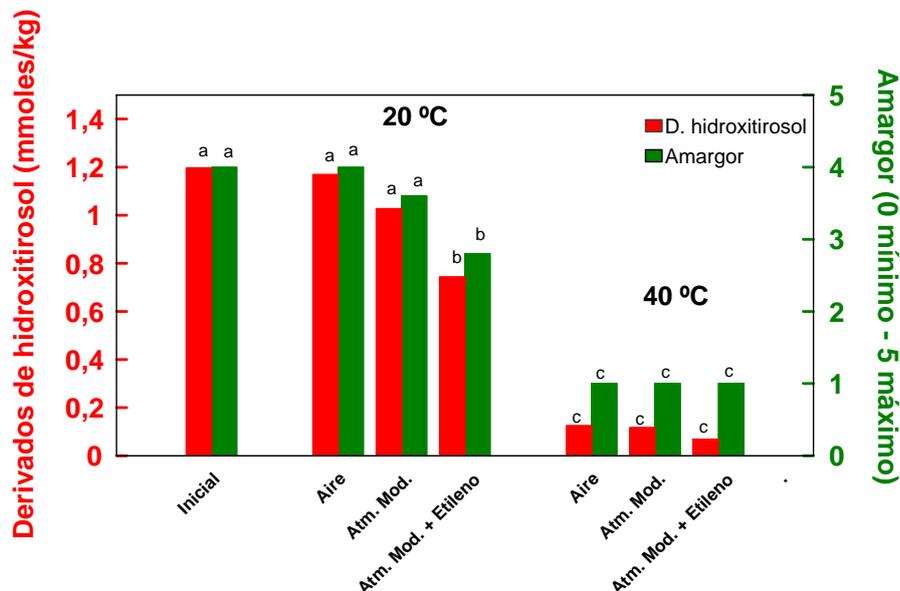


Figura 14.- Contenido en derivados de hidroxitirosol y valoración sensorial del amargor de aceites extraídos de aceitunas ‘Lechín’ previamente tratadas a diferentes temperaturas durante 72 horas bajo diferentes atmósferas de conservación. Las columnas de una misma variable con diferente letra minúscula presentan valores significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) según el test de múltiple rango de Duncan. Cada columna representa el valor medio de tres muestras diferentes.

En cuanto a los parámetros que miden la calidad del aceite obtenido, de nuevo ni la acidez ni la absorbancia en la región de ultravioleta sufrieron una alteración apreciable debida a los tratamientos ensayados (**Tabla 29**). La adición de etileno a la atmósfera modificada indujo un aumento significativo del índice de peróxidos en los aceites, tanto si el fruto fue conservado a 20 como a 40 °C. Por otra parte, como ya se observara en anteriores ensayos con otras variedades de aceituna, el uso del tratamiento a 40 °C también provocó un aumento significativo de este parámetro. De cualquier forma, ninguno de los aceites exhibió un contenido en peróxidos cercano al límite establecido para la categoría “extra”. La utilización de atmósfera modificada en la conservación del fruto provocó el desarrollo en el aceite de un olor y sabor no habitual, que se acentuó con el incremento de la temperatura y la adición de etileno. Ello determinó un descenso significativo en su valoración sensorial global. Previamente, Gutiérrez et al. (1992) habían apreciado un fuerte deterioro de este parámetro en los aceites procedentes de aceitunas que habían sido almacenadas durante un mes a 5 °C en una atmósfera con 3 % de CO₂ y/o 5 % de O₂, motivado por la aparición en los mismos de estos atributos sensoriales anómalos. Probablemente el desarrollo de estos atributos indeseables este relacionado con procesos fermentativos inducidos por la falta de O₂ y/o el exceso de CO₂ y cuya actividad se vería catalizada por la presencia de etileno externo.

Tabla 29.- Efecto de la atmósfera de conservación de la aceituna ‘Lechín’ tratada a diferentes temperaturas (20 y 40 °C) durante 72 horas sobre los parámetros físico-químicos y sensoriales de los aceites obtenidos de estos frutos. Cada valor corresponde a la media de 3 determinaciones. En una misma columna los valores seguidos al menos por una misma letra minúscula no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan.

Tratamientos	Acidez (% Oleico)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	I. Peróxidos (meqO/kg)	Análisis Sensorial
Inicial	0,21	1,63	0,12	5,55 c	8,0 a
20 °C					
Aire	0,20	1,72	0,14	5,73 c	7,8 a
At. Mod.	0,20	1,68	0,13	5,45 c	6,5 b
At. Mod.+Etileno (30 ppm)	0,23	1,64	0,12	6,24 b	6,0 c
40 °C					
Aire	0,22	1,64	0,10	6,22 b	7,8 a
At. Mod.	0,21	1,63	0,11	6,10 b	5,8 c
At. Mod.+Etileno (30 ppm)	0,25	1,60	0,12	8,15 a	5,2 d

El uso de atmósfera modificada indujo una reducción en la incorporación de pigmentos clorofílicos en el aceite. Sin embargo, la adición de etileno, conjuntamente con el tratamiento térmico y la atmósfera modificada, la hizo aumentar enormemente (**Tabla 30**). Este resultado es aun más sorprendente si se tiene en cuenta que precisamente las aceitunas de las que se obtuvo este aceite fueron las que más claramente perdieron la coloración inicial verde de la superficie de su epidermis. Probablemente a 40 °C la presencia de etileno indujo una pérdida de consistencia en la estructura cloroplástica, facilitando la liberación de estos pigmentos durante el proceso de extracción de aceite, mientras que la atmósfera modificada pasiva a 20 o 40 °C provocaría un efecto inverso.

A 20 °C la atmósfera modificada pasiva indujo una reducción significativa de la estabilidad de los aceites obtenidos. Este efecto se intensificó con la adición de etileno. Sin embargo, el aumento de la temperatura de conservación a 40 °C fue responsable del mayor deterioro de este parámetro, independientemente de la atmósfera utilizada. Este descenso de estabilidad coincidió con la reducción de amargor y de contenido en derivados de hidroxitirosoles observada en los mismos aceites.

Tabla 30.- Efecto de la atmósfera de conservación de la aceituna 'Lechín' tratada a diferentes temperaturas (20 y 40 °C) durante 72 horas sobre el contenido en pigmentos y la estabilidad ante la oxidación de los aceites obtenidos de estos frutos. Cada valor corresponde a la media de 3 determinaciones. En una misma columna los valores seguidos al menos por una misma letra minúscula no son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan

Tratamientos	Carotenos (mg/kg)	Clorofilas (mg/kg)	Estabilidad (horas)
Inicial	35,04 b	41,92 b	54,6 a
20 °C			
Aire	34,96 b	42,66 b	54,4 a
At. Mod.	18,56 d	18,48 d	46,5 b
At. Mod.+Etileno (30 ppm)	26,25 c	26,69 c	39,9 c
40 °C			
Aire	24,88 c	19,88 d	24,8 d
At. Mod.	16,55 d	15,89 d	25,7 d
At. Mod.+Etileno (30 ppm)	117,88 a	244,52 a	26,3 d

En resumen, los tratamientos térmicos de al menos 24 horas, a temperaturas de 40 °C, bajo atmósfera de aire han permitido, a escala de laboratorio, una reducción significativa del amargor, sin que suponga para éstos una pérdida de su categoría comercial "extra". Probablemente, el mantenimiento de la aceituna a estas moderadamente altas temperaturas

dificulta o ralentiza el desarrollo de la actividad o actividades enzimáticas responsables de la entrada de los compuestos causantes del amargor en el aceite de oliva. La utilización de atmósferas diferentes al aire presenta el problema del desarrollo de atributos sensoriales extraños, no aportando ninguna ventaja añadida a la utilización de aire. El uso de etileno, en cambio, merece un estudio más amplio. Sería interesante comprobar qué ocurre en los aceites si en los tratamientos sobre el fruto se mantiene su presencia sin modificar la atmósfera de aire, mediante un continuo o programado suministro de este gas, en combinación con el empleo de diferentes temperaturas, tal y como tiene lugar en la desverdización de cítricos.

En general, los tratamientos en cámara de transmisión de calor por aire son difíciles de adaptar a las líneas actuales de extracción en la industria olivarera. Requieren la construcción de cámaras termostalizadas para la realización de los tratamientos, así como el uso de cajas para contener las aceitunas durante el transcurso del mismo. Por otra parte, mientras se realiza el tratamiento, la demora durante 24 a 72 horas de la molienda del fruto supone añadir una interrupción en el sistema de procesado continuo de la aceituna. De cualquier forma, la paletización del fruto mediante el uso de cajas perforadas transportadas en carretillas elevadoras, sistema habitualmente empleado en otros frutos como naranjas, manzanas, peras, etc., permitiría un manejo más fácil y organizado del fruto, pudiendo clasificarlo por origen, variedad, calidad, sistema utilizado para su cosecha, etc. antes de su procesamiento. Este sistema facilitaría conocer la trazabilidad del aceite, desde la botella que se vende en el comercio hasta la parcela del árbol en donde nacieron las aceitunas de donde se extrajo.

III. 5. 2. Tratamientos térmicos por inmersión

III. 5. 2. 1. Ensayos preliminares

Una vez que parece claro que los tratamientos térmicos aplicados al fruto son capaces de inducir una reducción de la intensidad de amargor en el aceite, el siguiente paso es decidir de qué manera sería más conveniente realizar esta transferencia de calor. El agua es mucho mejor agente transmisor que el aire, por lo que puede acelerar sustancialmente los procesos en los que se requiere una comunicación de calor. En cítricos, los tratamientos de “curado” para la prevención de los procesos de podredumbre superficial, que requieren una exposición del fruto durante tres días a 37 °C en cámara, pueden ser reemplazados por inmersiones en un baño de agua mantenida a 50 °C durante tres minutos (Tuset et al., 1996). El tratamiento térmico por inmersión del fruto podría realizarse al mismo tiempo que transcurre su lavado dentro de la línea de su procesamiento en almazara, simplemente calentando el agua que se

utiliza al efecto, o bien utilizando máquinas pasteurizadoras de aceituna de mesa, que permiten el tratamiento en continuo del fruto. Este sistema presenta la ventaja de no requerir la utilización de una cámara para los tratamientos, ni el envasado del fruto en cajas para su realización a escala industrial.

En un primer ensayo se estudió el efecto de la inmersión en agua a 45 °C durante diferentes tiempos de la aceituna ‘Pico Limón’ ($IM \leq 2,0$) sobre el color, la dureza del fruto y la calidad de los aceites posteriormente extraídos (**Tabla 31 y 32**). Se ha seleccionado esta temperatura, porque siendo utilizada en cámara durante 24 horas reportó una considerable reducción de amargor, sin repercutir apreciablemente en la calidad del aceite. En cuanto a las características presentadas por el fruto, sólo se observó una significativa pérdida de su dureza tras dos horas de inmersión en agua a 45 °C y está representó menos de un 10 % del valor inicial. El color de su epidermis no se vio alterado. Después de 30 minutos de tratamiento ya se obtuvo un aceite con una intensidad de amargor significativamente inferior. La reducción de contenido en derivados de hidroxitirosol siguió un perfil muy semejante a la pérdida de amargor (**Tabla 31**).

Tabla 31.- Efecto del tiempo de inmersión en agua a 45 °C durante diferentes tiempos sobre el color de la epidermis y la dureza de la aceituna ‘Pico Limón’, así como sobre la intensidad del amargor y el contenido en derivados de hidroxitirosol del aceite extraído posteriormente de estos frutos. ^x Cada valor corresponde a la media de 100 determinaciones. ^y Cada valor corresponde a la media de 3 determinaciones. En una misma columna los valores seguidos al menos por una misma letra minúscula no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan. La ausencia de letras minúsculas en una columna indica la no existencia de efecto significativo (ANOVA, $p \leq 0,05$) debido al tratamiento.

Tiempo (minutos)	Índice de Color (L(b-a)/100)	Dureza ^x (N/cm ²)	Intensidad Amargor ^y (0 min – 5 max)	Derivados hidroxitirosol ^y (mmol/kg)
0	27,82	43,28 a	3,8 a	1,15 a
30	27,96	43,12 a	3,4 b	1,05 ab
60	27,75	42,61 ab	3,0 c	0,95 abc
90	28,02	41,85 ab	3,0 c	0,88 bc
120	27,69	40,18 b	2,8 c	0,80 c

A diferencia de lo que se observara en los tratamientos térmicos realizados en cámara, no se vio que la inmersión provocara un aumento significativo del contenido en peróxidos (**Tabla 32**). El resto de los parámetros establecidos por la legislación para evaluar el grado de calidad de los aceites tampoco se vieron afectados por la inmersión del fruto a 45 °C, independientemente del tiempo empleado.

La pérdida de estabilidad aumentó con el tiempo de inmersión, pero en escasa cuantía en valores relativos (**Tabla 33**). Como en los calentamientos en cámara durante 24 horas, se

registró un aumento de la presencia de clorofilas y carotenos en el aceite en todas las aceitunas tratadas, pero este aumento no fue proporcional al tiempo de inmersión.

Tabla 32.- *Parámetros físico-químicos y sensoriales de calidad del aceite extraído de la aceituna ‘Pico Limón’ previamente sumergida en agua a 45 °C durante diferentes tiempos. Cada valor corresponde a la media de 3 determinaciones. La ausencia de letras minúsculas en una columna indica la no existencia de efecto significativo (ANOVA, $p \leq 0,05$) debido al tratamiento.*

Tiempo (minutos)	Acidez (% Oleico)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	I. Peróxidos (meqO/kg)	Análisis Sensorial
0	0,11	1,36	0,11	3,16	8,2
30	0,12	1,36	0,12	2,76	7,8
60	0,13	1,41	0,10	3,07	8,0
90	0,10	1,45	0,13	2,76	7,9
120	0,12	1,39	0,11	3,39	8,0

Tabla 33.- *Contenido en pigmentos y estabilidad ante la oxidación del aceite extraído de la aceituna ‘Pico Limón’ sumergida en agua a 45 °C durante diferentes tiempos. Cada valor corresponde a la media de 3 determinaciones. En una misma columna los valores seguidos al menos por una misma letra minúscula no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan.*

Tiempo (minutos)	Carotenos (mg/kg)	Clorofilas (mg/kg)	Estabilidad (horas)
0	43,57 b	32,06 b	103,6 a
30	61,23 a	55,82 a	106,4 a
60	59,63 a	53,72 a	97,0 b
90	59,51 a	52,63 a	93,0 c
120	62,55 a	56,24 a	91,4 c

La inmersión del fruto a 45 °C afectó muy poco a la calidad del aceite, pero apenas consiguió reducir la intensidad de amargor presente en el mismo. Por ello se realizó un segundo ensayo, empleando 50 °C y la variedad ‘Picual’ ($IM \leq '2,0'$). El fruto de partida ofreció un aceite de amargor entre ligero y medio (valor ‘2,4’ en el análisis sensorial), no obstante la reducción del amargor inducida por este tratamiento fue evidente, hasta conseguir prácticamente su eliminación tras 2 horas de tratamiento. El contenido en derivados de hidroxitirosol disminuyó en la misma medida a lo largo del tiempo de inmersión. De forma que tras el citado periodo de tratamiento a 50 °C llegaron a desaparecer 5 de cada 6 moléculas

de derivados de hidroxitirosol de las que estaban presentes en el aceite procedente de las aceitunas no tratadas (**Tabla 34**).

Los parámetros de calidad analizados en los aceites no se vieron afectados por la aplicación del tratamiento térmico al fruto (**Tabla 35**). El análisis de la varianza de los resultados obtenidos en acidez, peróxidos, absorbancia ultravioleta y la valoración sensorial global no detectó que la inmersión a 50 °C ejerciera efecto significativo alguno sobre éstos, repitiéndose así lo observado en el ensayo con ‘Pico Limón’ a 45 °C.

A diferencia de lo observado en el tratamiento a 45 °C en donde el incremento de pigmentos fue uniforme, en los aceites obtenidos de las aceitunas sumergidas a 50 °C se produjo un aumento de su contenido en clorofilas y carotenos, que creció conforme fue progresando el tiempo de tratamiento (**Tabla 36**). Así mismo, la pérdida de estabilidad fue mucho más considerable, llegándose a perder más de la mitad de la estabilidad inicial a las 2 horas de tratamiento. Probablemente esta pérdida de estabilidad se deba a la notable reducción de derivados de hidroxitirosol, que indujo el tratamiento aplicado durante ese tiempo.

Tabla 34.- Efecto del tiempo de inmersión en agua a 50 °C durante diferentes tiempos sobre el color de la epidermis y la dureza de la aceituna ‘Picual’, así como sobre la intensidad del amargor y el contenido en derivados de hidroxitirosol del aceite extraído posteriormente de estos frutos. ^x Cada valor corresponde a la media de 100 determinaciones. ^y Cada valor corresponde a la media de 3 determinaciones. En una misma columna los valores seguidos al menos por una misma letra minúscula no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan. La ausencia de letras minúsculas en una columna indica la no existencia de efecto significativo (ANOVA, $p \leq 0,05$) debido al tratamiento.

Tiempo (minutos)	Índice de Color ^x (L(b-a)/100)	Dureza ^x (N/cm ²)	Intensidad Amargor ^y (0 min – 5 max)	Derivados hidroxitirosol ^y (mmol/kg)
0	28,73	45,17 a	2,4 a	0,60 a
30	27,90	45,53 a	2,0 a	0,52 ab
60	28,53	45,28 a	1,2 b	0,42 b
90	28,32	41,37 b	0,7 c	0,20 c
120	29,28	42,29 b	0,5 c	0,10 c

En resumen, estos experimentos preliminares han puesto de manifiesto cómo el tratamiento en inmersión en agua caliente permite reducir el amargor obtenido posteriormente en el aceite, de una manera mucho mas rápida que los tratamientos de transmisión de calor por aire, siendo perfectamente adaptables a los sistemas en línea actualmente utilizados para

el procesado de aceitunas de molino. La única desventaja, con respecto a la calidad del aceite que va unida a la reducción de la presencia del atributo amargo en los aceites, es la reducción de su estabilidad ante la oxidación. Sin embargo, incluso en los casos en que las condiciones de tratamiento empleadas determinaron un máximo de esta reducción, el valor de estabilidad remanente fue aún considerable, equivalente al habitual de otros aceites de oliva virgen procedentes de otras variedades no sometidas previamente a ningún tipo de tratamiento. De cualquier forma, la estabilidad ante la oxidación no está incluida entre los parámetros que se utilizan legalmente para evaluar el nivel de calidad de los aceites vírgenes de oliva.

Tabla 35.- Parámetros físico-químicos y sensoriales de calidad del aceite extraído de la aceituna 'Picual' previamente sumergida en agua a 50 °C durante diferentes tiempos. Cada valor corresponde a la media de 3 determinaciones. La ausencia de letras minúsculas en una columna indica la no existencia de efecto significativo (ANOVA, $p \leq 0,05$) debido al tratamiento.

Tiempo (Minutos)	Acidez (% Oleico)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	I. Peróxidos (meqO/kg)	Análisis Sensorial
0	0,13	1,32	0,10	3,77	8,0
30	0,13	1,29	0,10	3,99	7,8
60	0,13	1,28	0,10	3,83	7,7
90	0,12	1,36	0,08	3,91	7,7
120	0,14	1,33	0,08	3,70	7,6

Tabla 36.- Contenido en pigmentos y estabilidad ante la oxidación del aceite extraído de la aceituna 'Picual' sumergida en agua a 50 °C durante diferentes tiempos. Cada valor corresponde a la media de 3 determinaciones. En una misma columna los valores seguidos al menos por una misma letra minúscula no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan.

Tiempo (minutos)	Carotenos (mg/kg)	Clorofilas (mg/kg)	Estabilidad (horas)
0	30,86 d	20,89 e	64,9 a
30	55,71 c	53,93 d	58,1 b
60	58,69 c	63,09 c	58,0 b
90	68,50 b	75,64 b	42,9 c
120	96,09 a	131,67 a	31,2 d

III. 5. 2. 2. Condiciones idóneas de tratamiento de la aceituna ‘Picual’

Una vez que se ha comprobado la efectividad del tratamiento térmico por inmersión del fruto sobre la reducción del amargor en el aceite posteriormente extraído, el siguiente paso consistió en la búsqueda de las condiciones idóneas de este tratamiento. Esto es, la temperatura y el tiempo de inmersión que consigan de la manera más eficaz una reducción de la intensidad del atributo amargo hasta un nivel comercialmente aceptable con un mínimo deterioro de la calidad original del aceite. Para ello, se empleó la aceituna ‘Picual’, que, siendo la variedad más cultivada en España, es una de la que más se significa por la dificultad de su comercialización debido a presentar en exceso atributos, como el amargo, el astringente o el picante. Para realizar este cometido, frutos de esta variedad con un IM de ‘1,0’, que ofrecían un aceite con una presencia del atributo de amargo evaluada sensorialmente con una intensidad superior a “fuerte” (‘4,2’), fueron sometidos a un amplio abanico de temperaturas y tiempos de tratamientos (**Figura 15**).

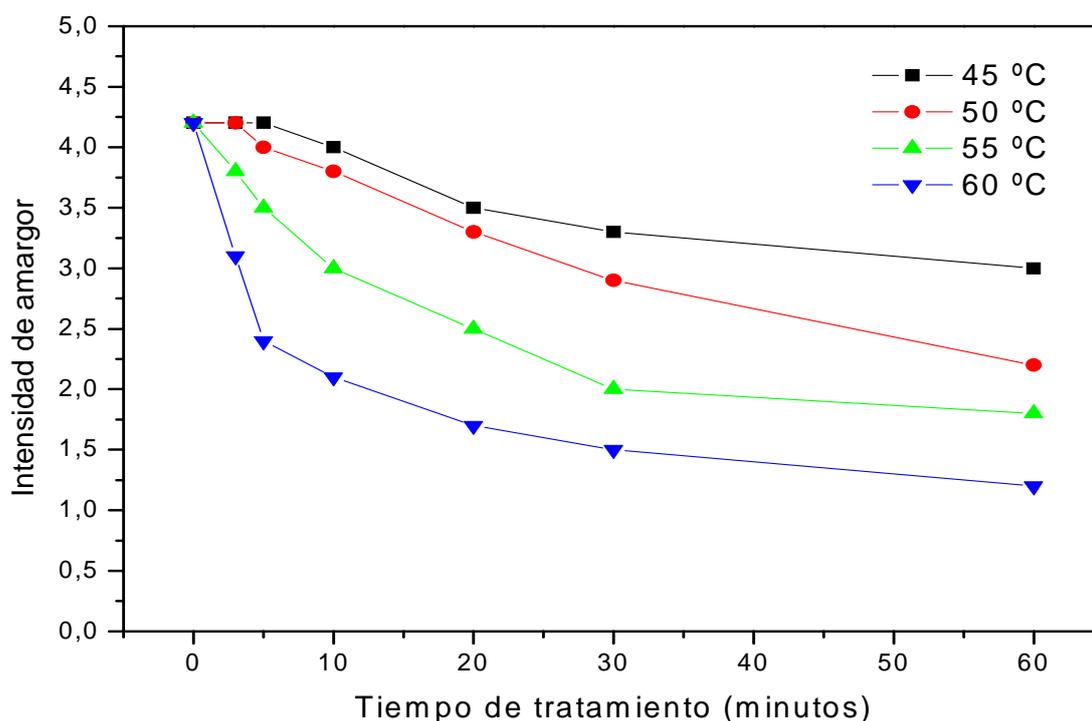


Figura 15.- Evolución de la intensidad del amargor de aceites extraídos de aceitunas ‘Picual’ previamente sumergidas en agua a diferentes temperaturas y durante distintos tiempos.

El factor más determinante en el control de la intensidad de amargor fue el aumento de la temperatura. La reducción hasta un nivel medio de amargor (‘3,0’) no se pudo alcanzar

empleando una temperatura de 45 °C; requirió 30 minutos a 50 °C; 10 minutos a 55 °C y apenas 5 minutos a 60 °C. Desde el punto de vista industrial interesaría que el tratamiento transcurriera en el tiempo más corto posible, pero a la temperatura también más baja, pues el mantenimiento de ésta será, tanto más costoso en cuanto sea más elevada y conllevará un mayor riesgo de deterioro de la calidad del aceite. Este ensayo deja claro que el empleo de temperaturas inferiores a 50 °C requiere un tiempo de tratamiento demasiado prolongado, industrialmente hablando, para conseguir una reducción efectiva del amargor. Por otra parte, el uso de temperaturas ≥ 80 °C podría ser causante del desarrollo de sabores ajenos a los habitualmente encontrados en el aceite de oliva. Además, a estas temperaturas se podría aumentar la extracción en el aceite de eritrodiool y uvaol, localizados en la cutícula del fruto, lo cual conllevaría el riesgo de que el aceite de oliva que se extrajera posteriormente incumpliera la normativa superando el límite establecido para el conjunto de estos compuestos. A partir de los resultados obtenidos, se puede estimar que las condiciones de tratamientos idóneas para la industria estarían delimitadas por el uso de temperaturas ≥ 55 °C durante periodos ≤ 10 minutos, siempre que éstas no determinen un deterioro de la calidad del aceite o una reducción del rendimiento graso en su extracción.

III. 5. 2. 3. Tratamientos a escala de laboratorio de ajuste para la escala industrial

Una vez delimitado el tiempo de ensayo y el rango viable de temperaturas utilizables, a continuación se estudió la aplicación del sistema en tres de las variedades cultivadas en Andalucía, donde el control del amargor aportaría mayores beneficios comerciales ('Manzanilla', 'Picual' y 'Verdial'; IM '1,0'), con el fin de seleccionar las condiciones idóneas de tratamiento para su aplicación industrial. Se analizó, así mismo, con más detalle la repercusión de estos tratamientos sobre la calidad del aceite, incluyendo su composición fenólica.

La intensidad de amargor de los aceites de oliva obtenidos a partir de las tres variedades estudiadas disminuyó significativamente conforme aumentaba la temperatura de inmersión previa del fruto (**Tablas 37, 38 y 39**). Los aceites extraídos de aceitunas 'Manzanilla' y 'Picual' exhibieron una respuesta similar en la intensidad de amargor a las mismas temperaturas de tratamiento. En ambas variedades fue necesaria la aplicación de 68 °C para conseguir una reducción del amargor hasta un nivel medio ('3'), partiendo de una intensidad inicial próxima a la extrema ('5'). En cambio, para la variedad 'Verdial', el tratamiento a 68 °C sólo indujo una reducción del amargor hasta un nivel algo inferior al considerado como "fuerte" ('4'), siendo necesario el empleo de una temperatura de 70 °C para

obtener una intensidad de amargor algo superior a la considerada como “media”, mientras que el incremento de otros 2 grados en la temperatura de tratamiento ya inducía una eliminación más notable del amargor, dejándolo en un nivel de “ligero” (‘2’). El tratamiento térmico de 40 °C aplicado a frutos de ‘Manzanilla’ y ‘Verdial’ en cámara durante 24 y 48 horas, respectivamente, proporcionó resultados similares (**Figuras 12 y 13**). La inmersión en agua redujo claramente el tiempo de tratamiento en relación a la transmisión del calor por corriente de aire, permitiendo el uso de temperaturas más altas sin afectar a la calidad del aceite.

El baño en caliente de la aceituna afectó al rendimiento en la posterior extracción física de aceite de manera diferente a cada una de las variedades utilizadas para el ensayo. Mientras que las aceitunas de la variedad ‘Manzanilla’ tratadas a temperaturas entre 60 y 64 °C ofrecieron un rendimiento claramente superior al de las aceitunas del control o las tratadas a temperaturas superiores, las de la variedad ‘Picual’ presentaron un rendimiento similar sin diferencia significativa entre todos los tratamientos y las ‘Verdiales’, en cambio, exhibieron una reducción significativa de la producción de aceite a consecuencia del tratamiento. Este rendimiento depende de diferentes variables de la estructura del fruto, tales como, la variedad, la edad, la textura de la pulpa, el contenido en aceite, la humedad, la relación pulpa-hueso, etc., que pueden cambiar sensiblemente de un año a otro dependiendo de las condiciones climáticas.

Tabla 37. *Parámetros de calidad presentados por aceites de oliva vírgenes obtenidos a partir de aceitunas ‘Manzanilla’ no tratadas (control) o previamente sumergidas a diferentes temperaturas durante 3 minutos*^x

	Control	60 °C	62 °C	64 °C	66 °C	68 °C
Rendimiento graso (%)	10,3 b	14,2 a	14,0 a	13,0 a	10,4 b	10,5 b
Acidez (% Oleico)	0,50 a	0,43 b	0,42 b	0,26 c	0,39 b	0,22 c
I. Peróxidos (meqO/kg)	7,2 c	5,6 d	7,6 c	7,5 c	8,6 b	10,3 a
K₂₃₂	2,28 a	2,04 b	1,72 c	1,71 c	1,62 c	1,12 d
K₂₇₀	0,26 a	0,23 a	0,17 b	0,16 b	0,16 b	0,10 c
Carotenos (mg/kg)	12,65 d	24,45 c	26,39 c	23,01 c	33,16 b	49,3 a
Clorofilas (mg/kg)	20,91 e	45,78 d	63,85 c	48,68 d	123,6 b	137,8 a
Estabilidad (horas)	186,2 a	168,2 b	160,5 b	154,8 b	159,4 b	126,2 c
A. Sensorial global (1 – 9)^y	7,4	7,5	7,4	7,6	7,5	7,7
Amargor (0 - 5)^z	4,9 a	4,5 b	4,3 b	3,7 c	3,5 c	2,7 d

^x Cada punto es el valor medio de tres replicados. En la misma fila, la ausencia de letras minúsculas significa la ausencia de efecto significativo ($p \leq 0,05$) del tratamiento según ANOVA y los valores seguidos por al menos una misma letra minúscula no son diferentes significativamente ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan. ^y “1” indica la peor calidad sensorial posible y “9” la mejor. ^z “0” indica la ausencia del atributo y “5” la intensidad extrema del mismo.

Estos tratamientos térmicos indujeron variaciones significativas en algunos de los parámetros legalmente establecidos para valorar el grado de calidad de los aceites vírgenes de oliva (acidez, índice de peróxidos, absorción ultravioleta y el análisis sensorial global), pero éstos no afectaron en ningún caso a la categoría comercial de los aceites que se mantuvo en la máxima en todos los tratamientos. Por ejemplo, los valores de acidez de los aceites de ‘Manzanilla’ fueron incluso reducidos significativamente, como consecuencia de los tratamientos, mientras que no se observó ningún efecto sobre este parámetro en los aceites procedentes de las otras dos variedades. Probablemente, ello se deba a una reducción de la actividad lipásica inducida por el calentamiento previo durante el proceso de extracción de las aceitunas ‘Manzanilla’. En la aceitunas ‘Picual’ y ‘Verdial’, estas enzimas podrían estar ya inactivadas inicialmente, por esta razón, sus aceites exhibieron valores muy bajos de acidez en los aceites del control. En general, el índice de peróxidos aumentó significativamente en los aceites extraídos de frutos tratados de las variedades ‘Manzanilla’ y ‘Verdial’, pero, en cualquier caso, estos valores ni siquiera se aproximaron al límite establecido para la pérdida de la calidad comercial (20 meqO/kg).

Tabla 38. *Parámetros de calidad presentados por aceites de oliva vírgenes obtenidos a partir de aceitunas ‘Picual’ no tratadas (control) o previamente sumergidas a diferentes temperaturas durante 3 minutos^x*

	Control	60 °C	62 °C	64 °C	66 °C	68 °C
Rendimiento graso (%)	18,2	18,5	17,7	17,6	18,0	17,8
Acidez (% Oleico)	0,18	0,22	0,23	0,23	0,20	0,16
I. Peróxidos (meqO/kg)	6,4	5,7	7,3	5,5	6,9	4,7
K₂₃₂	1,27 b	1,64 a	1,21 b	1,34 b	1,61 a	1,16 c
K₂₇₀	0,15	0,16	0,15	0,11	0,15	0,10
Carotenos (mg/kg)	14,44 d	30,1 b	35,7 a	21,38 c	29,50 b	25,65 bc
Clorofilas (mg/kg)	14,26 e	77,50 b	98,18 a	50,95 d	76,25 b	63,33 c
Estabilidad (horas)	174,0 a	164,0 b	173,0 a	156,0 c	120,6 d	76,5 e
A. Sensorial global (1 – 9)^y	7,7	7,5	7,7	7,4	7,6	7,9
Amargor (0 - 5)^z	4,7 a	4,2 b	4,0 b	3,6 c	3,3 d	2,8 e

^x Cada punto es el valor medio de tres replicados. En la misma fila, la ausencia de letras minúsculas significa la ausencia de efecto significativo ($p \leq 0,05$) del tratamiento según ANOVA y los valores seguidos por al menos una misma letra minúscula no son diferentes significativamente ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan^y “1” indica la peor calidad sensorial posible y “9” la mejor. ^z “0” indica la ausencia del atributo y “5” la intensidad extrema del mismo.

La absorbancia ultravioleta a 232 y a 270 nm decreció claramente en los aceites extraídos de aceitunas ‘Manzanilla’ tratadas, pero no cambió significativamente en los procedentes de las dos variedades restantes. Probablemente, el calentamiento previo podría reducir la actividad de enzimas como la lipoxigenasa o la hidroperóxido-liasa durante la

molturación o el batido en el proceso de extracción del aceite en las aceitunas ‘Manzanilla’, mientras que, como ocurriera con la lipasa, estas enzimas se mantendrían inactivas en las pastas de ‘Picual’ y ‘Verdial’. Farag et al. (1997) observaron que la actividad lipoxigenasa de las aceitunas ‘Picual’ durante la extracción decrecía linealmente conforme aumentaba la intensidad del calentamiento con microondas que se le aplicaba previamente.

Tabla 39.- Parámetros de calidad presentados por aceites de oliva vírgenes obtenidos a partir de aceitunas ‘Verdial’ no tratadas (control) o previamente sumergidas a diferentes temperaturas durante 3 minutos^x

	Control	60 °C	64 °C	68 °C	70 °C	72 °C
Rendimiento graso (%)	20,0 a	18,8 b	18,4 b	18,5 b	18,6 b	17,0 c
Acidez (% Oleico)	0,25	0,25	0,24	0,18	0,21	0,16
I. Peróxidos (meqO/kg)	5,4 c	6,9 b	5,0 c	9,8 a	10,1 a	6,6 b
K₂₃₂	1,51	1,57	1,62	1,6	1,48	1,37
K₂₇₀	0,15	0,16	0,16	0,14	0,14	0,12
Carotenos (mg/kg)	22,07 c	44,19 a	43,12 a	36,9 b	45,65 a	43,48 a
Clorofilas (mg/kg)	40,26 d	116,82 a	111,24 a	83,4 c	108,25 b	100,53 b
Estabilidad (horas)	74,7 a	69,4 b	76,0 a	54,8 c	54,0 c	49,0 d
A. Sensorial global (1 – 9)^y	7,5	7,7	7,5	7,6	7,7	7,6
Amargor (0 - 5)^z	4,4 a	4,1 b	4,0 b	3,8 b	3,4 c	2,1 d

^x Cada punto es el valor medio de tres replicados. En la misma fila, la ausencia de letras minúsculas significa la ausencia de efecto significativo ($p \leq 0,05$) del tratamiento según ANOVA y los valores seguidos por al menos una misma letra minúscula no son diferentes significativamente ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan. ^y “1” indica la peor calidad sensorial posible y “9” la mejor. ^z “0” indica la ausencia del atributo y “5” la intensidad extrema del mismo.

La calidad sensorial de los aceites extraídos de las tres variedades no cambió significativamente a consecuencia del tratamiento, mostrando valores muy parecidos al control independientemente de la temperatura utilizada.

Otros parámetros no contemplados en la normativa reguladora de las categorías comerciales de calidad del aceite virgen de oliva, como el contenido en pigmentos o la estabilidad ante la oxidación fueron afectados más sensiblemente por la inmersión previa del fruto en agua caliente. Así, los contenidos en clorofilas y carotenos aumentaron considerablemente en todas las variedades estudiadas, como respuesta al tratamiento térmico. Probablemente, la aplicación de calor permitiría una mejor extracción de estos pigmentos presentes en el cloroplasto y/o inactivaría posibles actividades enzimáticas responsables de la degradación de los pigmentos durante el proceso de extracción. Se confirma así el mismo efecto experimentado en los ensayos de transmisión de calor por aire, siendo en los de inmersión los aumentos mucho más elevados. Luaces et al. (2005) han realizado una descripción más detallada del contenido en pigmentos de los aceites producidos a partir de

aceitunas sometidas a estos tratamientos. El contenido en estos pigmentos unido a la baja intensidad de amargor sirven como huella distintiva de la aplicación de estos tratamientos, ya que sería muy difícil encontrar aceites procedentes de aceitunas no tratadas, que, presentando el mismo contenido en pigmentos (excesivo incluso para frutos extremadamente inmaduros), exhibieran una intensidad de amargor sólo “ligera” o “media”. La posibilidad de producir aceites fuertemente pigmentados con escasa intensidad del atributo amargo podría constituir una herramienta de alto valor industrial, pues facilitaría la elaboración de “coupages” (mezclas de aceites vírgenes), mejorando el color y el sabor de aceites con pobre color y excesiva presencia de atributos como el astringente, amargo o picante. Podría incluso mezclarse con el aceite obtenido sin previo tratamiento hasta obtenerse una proporción, que se considere idónea en color, olor y sabor, permitiendo año tras año ofrecer al consumidor un producto con las mismas características variando las proporciones de la mezcla. Se reduciría así la variabilidad que sufre este producto debido a las diferencias climáticas o a las circunstancias anuales del cultivo, como ya se ha reseñado, que afectan tanto al color, como a las características sensoriales del aceite. De forma general, la estabilidad oxidativa decreció, conforme aumentaba la temperatura de tratamiento en las tres variedades estudiadas, de manera paralela a como se reducía la intensidad de amargor en los aceites. Sin embargo, los valores remanentes de este parámetro, incluso los exhibidos por los aceites extraídos a partir de los frutos sometidos a las temperaturas más altas, alcanzaron una magnitud aún considerable, superior a la que presentarían los aceites de las mismas variedades cuando son extraídos a partir de frutos maduros (García et al., 1996c). Comparativamente hablando, el tratamiento de calentamiento por inmersión de la aceituna ‘Verdial’ a 72 °C indujo una pérdida de amargor (desde ‘4,3’ hasta ‘2,1’) y de estabilidad oxidativa similares al causado por la aplicación de 40 °C en cámara durante 72 horas al mismo tipo de aceituna (34,4 y 36,0 %, respectivamente).

El tratamiento térmico redujo la presencia de derivados fenólicos en los aceites de las tres variedades (**Tablas 40, 41 y 42**). Esta reducción coincidió con la que experimentaron tanto la intensidad de amargor como la estabilidad oxidativa, por lo que se apoya la hipótesis de que ambas estarían relacionadas con el contenido en estos compuestos. Los contenidos en ortodifenoles y en el conjunto de derivados secoiridoideos también disminuyeron en los aceites extraídos de las tres variedades sometidos a tratamiento. Estos resultados coincidieron con los previamente obtenidos empleando el aire como transmisor del tratamiento térmico. Sin embargo, la composición en derivados fenólicos individuales difirió de una variedad a otra. En los aceites de aceitunas ‘Manzanilla’ la reducción de grupos fenólicos se debió

principalmente a la disminución en un derivado secoiridoideo del hidroxitirosol y otro del tirosol (FAAO y FAAL, respectivamente), mientras que los otros dos derivados de ambos compuestos (FDAO y FDAL, respectivamente) aumentaron, aunque en menor medida, con la aplicación del tratamiento. Otros compuestos apenas merecen mención dada su baja presencia en todos los casos.

En los aceites procedentes de la variedad 'Picual' se observó una tendencia similar, pero el contenido en FDAL sólo se incrementó tras la utilización de 60 °C, decreciendo luego progresivamente según aumentó la temperatura de tratamiento. Por último, en los aceites de 'Verdial' el contenido en estos 4 derivados secoiridoideos disminuyó claramente conforme aumentó la temperatura de tratamiento. Éste descenso en los contenidos de FAAO y FAAL de los aceites extraídos de las tres variedades, que coincide con una progresiva reducción de su intensidad de amargor, apoyarían sólo muy parcialmente la propuesta de Gutiérrez-Rosales et al. (2003), pues estos autores identificaron al FAAO como el menos relacionado con el amargor de un terceto formado por éste, el FDAO y el FDAL, que identificaron como directos responsables de este atributo, mientras que descartaban la intervención del FAAL. En cambio, vienen a confirmar la presentada posteriormente por Mateos et al. (2004), quienes relacionaron principalmente al FAAO con la presencia de este atributo en el aceite. Sin embargo, las concentraciones encontradas de este compuesto fueron más altas de lo esperado según la fórmula propuesta por estos autores, relacionado con el grado de amargor determinado sensorialmente.

El aumento de FDAL, que coincidió con la pérdida de estabilidad de los aceites, como consecuencia del tratamiento contradice lo establecido por Morello et al. (2005), quienes consideraron esta molécula, como la principal responsable de la actividad antioxidante del aceite de 'Arbequina'. En cambio, nuestros resultados están más de acuerdo con los obtenidos por Del Carlo et al. (2004), quienes encontraron que la estabilidad oxidativa estaba mejor correlacionada con el contenido total de polifenoles, que con cada uno de ellos considerados individualmente.

Tabla 40.- Contenido en compuestos fenólicos presentados por aceites de oliva vírgenes obtenidos a partir de aceitunas 'Manzanilla' no tratadas (control) o previamente sumergidas a diferentes temperaturas durante 3 minutos¹

Compuestos fenólicos (mmol/kg)	Control	60 °C	62 °C	64 °C	66 °C	68 °C
Hidroxitirosol	0,040 b	0,045 b	0,055 a	0,032 c	0,028 c	0,034 c
Tirosol	0,031 c	0,034 c	0,045 a	0,031 c	0,045 a	0,039 b
Ac. Vanílico	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Vanillina	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ac. p-Cumárico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acetato Hidroxitirosol	0,015	0,013	0,012	0,014	0,016	0,012
FDAO	0,430	0,612 c	0,759 b	0,588 c	0,800 a	0,724 b
Acetato Tirosol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
FDAL	0,303 f	0,486 e	0,642 c	0,520 d	0,684 b	0,756 a
Pinoresinol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009
Ac. Cinámico	0,008	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
Acetoxi-pinoresinol	0,024 a	0,001 c	0,000 c	0,000 c	0,000 c	0,009 b
FAAO	1,963 a	1,456 b	1,218 c	1,023 d	0,783 e	0,781 e
FAAL	1,091 a	1,012 a	1,036 a	0,867 b	0,558 c	0,586 c
Ac. Ferúlico	0,003	0,002	0,001	0,002	0,001	0,002
Luteolina	0,015 a	0,006 b	0,002 c	0,001 c	0,000 c	0,000 c
Apigenina	0,008 a	0,003 b	0,001 c	0,001 c	0,000 c	0,000 c
Total Fenoles	3,932 a	3,670 b	3,771 b	3,079 c	2,915 c	2,953 c
Total Ortodifenoles	2,463 a	2,132 b	2,046 b	1,658 c	1,627 c	1,551 c
Total Secoiridoideos	3,787 a	3,566 b	3,655 b	2,998 c	2,825 d	2,847 d

¹Cada punto es el valor medio de tres replicados. En la misma fila, la ausencia de letras minúsculas significa la ausencia de efecto significativo ($p \leq 0,05$) del tratamiento según ANOVA y los valores seguidos por al menos una misma letra minúscula no son diferentes significativamente ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan. (FDAO) Forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FDAL) Forma dialdehídica de la aglucona del ligustrósido. (FAAO) Forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FAAL) Forma aldehídica de la aglucona del ligustrósido.

Tabla 41.- Contenido en compuestos fenólicos presentados por aceites de oliva vírgenes obtenidos a partir de aceitunas 'Picual' no tratadas (control) o previamente sumergidas a diferentes temperaturas durante 3 minutos ¹

Compuestos fenólicos (mmol/kg)	Control	60 °C	62 °C	64 °C	66 °C	68 °C
Hidroxitirosol	0,015 b	0,022 a	0,011 b	0,014 b	0,012 b	0,010 b
Tirosol	0,017 a	0,017 a	0,008 b	0,008 b	0,005 c	0,005 c
Ac. Vanílico	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Vanillina	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ac. p-Cumárico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acetato Hidroxitirosol	0,000 b	0,008 a	0,005 a	0,005 a	0,006 a	0,005 a
FDAO	0,206 f	0,764 a	0,544 b	0,350 e	0,411 d	0,459 c
Acetato Tirosol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
FDAL	0,235 b	0,402 a	0,222 b	0,180 c	0,171 c	0,133 d
Pinoresinol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ac. Cinámico	0,005 a	0,004 a	0,002 b	0,002 b	0,001 bc	0,000 c
Acetoxi-pinoresinol	0,035 a	0,027 b	0,018 c	0,005 de	0,009 d	0,002 e
FAAO	1,601 a	1,372 b	1,252 c	0,964 d	0,951 d	0,995 d
FAAL	1,332 a	0,806 b	0,561 c	0,371 d	0,323 d	0,113 e
Ac. Ferúlico	0,003	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001
Luteolina	0,021 a	0,006 b	0,002 b	0,003 b	0,004 b	0,003 b
Apigenina	0,012 a	0,003 b	0,001 b	0,002 b	0,001 b	0,002 b
Total Fenoles	3,484 a	3,433 a	2,627 b	1,905 c	1,895 c	1,728 d
Total Ortodifenoles	1,843 b	2,172 a	1,814 b	1,336 d	1,384 d	1,472 c
Total Secoiridoideos	3,374 a	3,344 a	2,579 b	1,865 c	1,856 c	1,700 d

¹Cada punto es el valor medio de tres replicados. En la misma fila, la ausencia de letras minúsculas significa la ausencia de efecto significativo ($p \leq 0,05$) del tratamiento según ANOVA y los valores seguidos por al menos una misma letra minúscula no son diferentes significativamente ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan. (FDAO) Forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FDAL) Forma dialdehídica de la aglucona del ligustrósido. (FAAO) Forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FAAL) Forma aldehídica de la aglucona del ligustrósido.

Tabla 42.- Contenido en compuestos fenólicos presentados por aceites de oliva vírgenes obtenidos a partir de aceitunas 'Verdial' no tratadas (control) o previamente sumergidas a diferentes temperaturas durante 3 minutos¹

Compuestos fenólicos (mmol/kg)	Control	60 °C	64 °C	68 °C	70 °C	72 °C
Hidroxitirosol	0,029 a	0,017 c	0,023 b	0,008 d	0,017 c	0,013 c
Tirosol	0,052 a	0,016 c	0,022 b	0,021 b	0,014 c	0,014 c
Ac. Vanílico	0,004 a	0,000 b				
Vanillina	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Ac. <i>p</i> -Cumárico	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Acetato Hidroxitirosol	0,014 b	0,012 b	0,013 b	0,016 b	0,033 a	0,026 a
FDAO	0,606 a	0,530 b	0,509 b	0,260 c	0,322 c	0,245 c
Acetato Tirosol	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
FDAL	0,565 a	0,529 a	0,582 a	0,327 b	0,386 b	0,326 b
Pinoresinol	0,000 c	0,000 c	0,000 c	0,009 a	0,000 c	0,004 b
Ac. Cinámico	0,003 a	0,004 a	0,004 a	0,001 b	0,000 b	0,000 b
Acetoxi-pinoresinol	0,019 a	0,012 bc	0,015 b	0,009 c	0,009 c	0,004 d
FAAO	1,084 a	0,694 b	0,723 b	0,467 c	0,456 c	0,281 d
FAAL	0,994 a	0,596 b	0,670 b	0,464 c	0,357 d	0,224 e
Ac. Ferúlico	0,004	0,002	0,002	0,000	0,002	0,001
Luteolina	0,006 a	0,003 b	0,002 b	0,002 b	0,002 b	0,001 b
Apigenina	0,004 a	0,001 b	0,002 b	0,002 b	0,002 b	0,001 b
Total Fenoles	3,384 a	2,416 b	2,567 b	1,586 c	1,600 c	1,140 d
Total Ortodifenoles	1,739 a	1,256 b	1,270 b	0,753 c	0,830 c	0,566 d
Total Secoiridoideos	3,249 a	2,349 b	2,484 b	1,518 c	1,521 c	1,076 d

¹Cada punto es el valor medio de tres replicados. En la misma fila, la ausencia de letras minúsculas significa la ausencia de efecto significativo ($p \leq 0,05$) del tratamiento según ANOVA y los valores seguidos por al menos una misma letra minúscula no son diferentes significativamente ($p \leq 0,05$) de acuerdo con el test de múltiple rango de Duncan. (FDAO) Forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FDAL) Forma dialdehídica de la aglucona del ligustrósido. (FAAO) Forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FAAL) Forma aldehídica de la aglucona del ligustrósido.

III. 5. 2. 4.- Tratamientos a escala industrial

III. 5. 2. 4. 1.- Campaña 2002/03

Antes de proceder a los ensayos a escala industrial, se realizaron de manera rutinaria ensayos a pequeña escala, con el fin de ajustar lo mejor posible las condiciones óptimas que debería presentar el tratamiento industrial con el mismo material biológico. Se fijó en 3 minutos la duración del ensayo, por ser éste el tiempo que se había considerado óptimo en los experimentos previos y se procedió a sumergir 1 kg de fruto, por triplicado, durante dicho tiempo a temperaturas crecientes entre 50 y 70 °C, según los ensayos de ajuste para cada variedad. Tras la extracción del aceite, un panel reducido formado por tres catadores evaluaba su intensidad de amargor y su calidad sensorial global, para decidir lo más rápidamente posible el tratamiento más adecuado.

El primer ensayo a una escala de planta piloto experimental (600 kg por muestra) se llevó a cabo en las condiciones consideradas previamente como óptimas (68 °C durante 3 minutos) con aceitunas ‘Manzanilla’ procedentes de Dos Hermanas (Sevilla), con un índice de madurez de ‘0,5’, un índice de color de 39,01 y una dureza de 46,82 N/cm² (**Foto 6**).



Foto 6.- Aspecto de las aceitunas antes y después del tratamiento térmico

El tratamiento indujo una reducción significativa de la presencia del atributo amargo del aceite (‘3,8’ frente a ‘4,8’ del control), sin que se afectara significativamente su categoría comercial de virgen extra (**Tabla 43**). Las aceitunas sumergidas en agua a 68 °C antes de la extracción presentaron una mayor producción de aceite respecto al control (incremento de un 2,4 %). En cambio, el grado de acidez no experimentó ningún cambio como consecuencia del tratamiento, exhibiendo prácticamente un mismo valor en este parámetro, tanto los aceites

extraídos de aceitunas tratadas como los del control. Por el contrario, el índice de peróxidos del aceite obtenido de aceitunas tratadas presentó esta vez un valor significativamente inferior que el de su homólogo obtenido a partir de las aceitunas del control.

Tabla 43.- Análisis físico-químico y sensorial de los aceites obtenidos a partir de aceitunas ‘Manzanilla’ no tratadas (Control) o previamente sumergidas en agua a 68 °C durante 3 minutos en la campaña 2002/03. Cada valor representa la media de tres determinaciones recogidas al inicio, en el intermedio y al final del proceso de extracción industrial salvo los valores de rendimiento que carecen de replicado. En cada parámetro de calidad los valores de los tratamientos seguidos por diferente letra minúscula son diferentes significativamente de acuerdo al test de múltiple rango de Duncan. La ausencia de letra minúscula indica la ausencia de efecto significativo del tratamiento ($p \leq 0,05$) sobre el parámetro estudiado según ANOVA.

Parámetro de calidad	Control	68 °C
Intensidad de amargor (0 ausencia – 5 máxima)	4,8 a	3,8 b
Rendimiento (%)	14,2	16,6
Acidez (% Oleico)	0,41	0,41
I. Peróxidos (meqO/kg)	6,2 a	4,8 b
K₂₃₂	1,97 a	1,56 b
K₂₇₀	0,20 a	0,16 b
Análisis sensorial global (1 pésima – 9 óptima)	8,1 a	7,3 b
Tocoferoles (mg/kg)	160,7 a	148,6 b
Estabilidad (horas)	145,4 a	141,6 b

Curiosamente, en los ensayos a escala de laboratorio, empleando la misma temperatura, los valores de este índice fueron más altos en los aceites del tratamiento, que en los extraídos de los frutos del control (datos no mostrados). Probablemente, la variabilidad presentada por este índice sea más debida a otros factores experimentales de difícil control, como el tiempo de separación de las fracciones tras la centrifugación o del filtrado de la muestra, que del propio tratamiento en sí. Es un hecho conocido que la medida del índice de peróxidos es muy inestable y sólo cabe deducir que realmente un determinado factor lo afecta, cuando el mismo efecto se registra muy repetidamente ante similares condiciones de ensayo, y éste no ha sido el caso. Así mismo, se registró a consecuencia del tratamiento industrial una disminución significativa de la absorbancia en la región ultravioleta de los aceites, evaluada por los K₂₃₂ y K₂₇₀, lo que indicaría una reducción de los procesos de oxidación de los acilos de los triglicéridos del aceite. Estos resultados apoyarían la hipótesis de Farag et al. (1997), quienes sugirieron que la disminución del índice de peróxidos en los aceites extraídos de

frutos previamente tratados por microondas era debida a una reducción de la actividad lipoxigenasa durante el proceso de la extracción del aceite. Sin embargo, en contraposición a lo observado por estos autores, se obtuvo una ligera pérdida de estabilidad ante la oxidación a consecuencia del tratamiento, frente al aceite procedente de aceitunas no tratadas (< 5 horas). En cuanto al análisis sensorial, el aceite procedente de aceitunas tratadas fue valorado de manera significativamente inferior que los del control, debido a la pérdida que experimenta en atributos como “verde”, “frutado verde” o “hierba cortada”, aunque mejoró en “frutado maduro”. Sin embargo, la evaluación conseguida (‘7,3’) lo mantiene muy por encima del mínimo exigido para la categoría “extra” de aceites vírgenes de oliva (‘6,5’). Por otra parte, el tratamiento térmico indujo una reducción significativa del contenido en tocoferoles, pudiendo ser ésta una de las posibles causas de la pérdida de estabilidad de estos aceites.

También fue significativo el efecto del tratamiento térmico sobre la pigmentación de los aceites posteriormente extraídos. En la misma línea de cómo ocurriera en todos los ensayos térmicos a escala de laboratorio, el contenido en pigmentos aumentó de nuevo como consecuencia del calentamiento a escala industrial, especialmente en las clorofilas, por lo que sería muy conveniente su mantenimiento en oscuridad (**Foto7**). La presentación simultánea de una fuerte pigmentación y una intensidad media de amargor constituye así una señal identificadora de los aceites procedentes de tratamientos térmicos, como si de una huella dactilar se tratara, pues los aceites con esta pigmentación sólo pueden proceder de frutos muy inmaduros, extraordinariamente amargos.

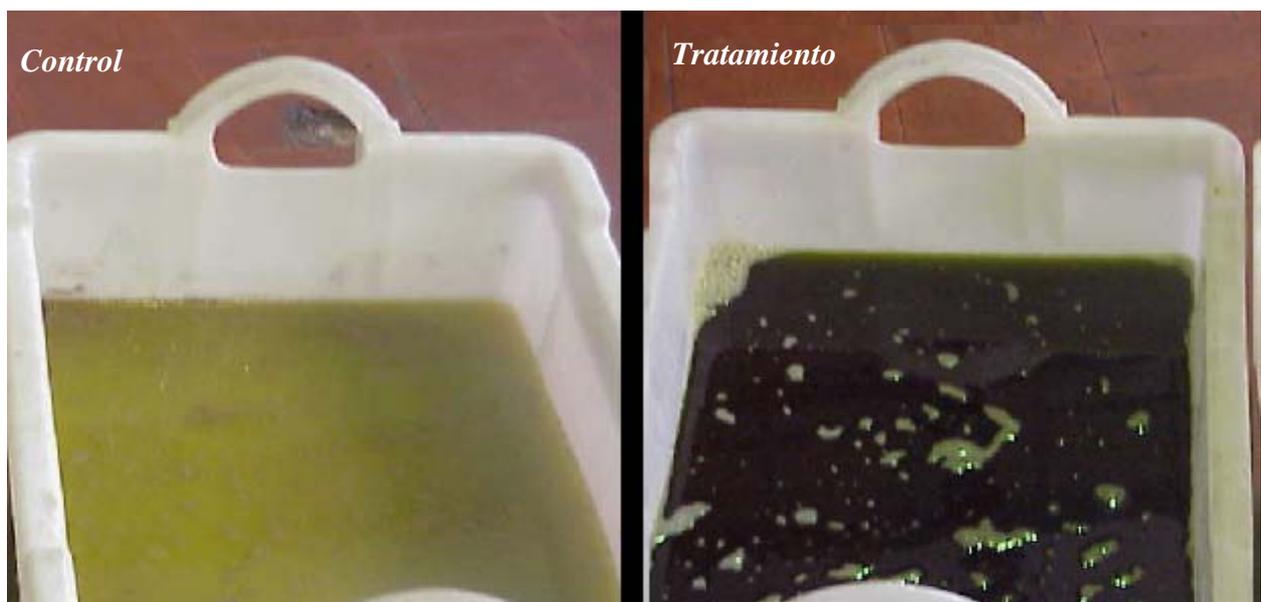


Foto 7.- La pigmentación de los aceites extraídos de aceitunas no tratadas (Control) o previamente sumergidas en agua caliente (Tratamiento)

El análisis de los componentes fenólicos de los aceites obtenidos a partir del ensayo realizado a escala industrial fue bastante parecido al obtenido a escala de laboratorio en campañas precedentes (**Tabla 44**). El tratamiento indujo una disminución altamente significativa en los componentes fenólicos mayoritarios, las formas aldehídicas de la aglucona de la oleuropeína (FAAO) y del ligustrósido (FAAL). También disminuyeron el hidroxitirosol y el acetato de hidroxitirosol. En cambio, al mismo tiempo, se registró un aumento considerable de las formas dialdehídicas de la aglucona de la oleuropeína y del ligustrósido (FDAO y FDAL). El balance final resultó en una reducción significativa del contenido en polifenoles totales, derivados secoiridoideos y ortodifenoles.

Tabla 44.- Contenido en los diferentes compuestos fenólicos de los aceites obtenidos a escala industrial a partir de aceitunas ‘Manzanilla’ no tratadas (Control) o sumergidas previamente en agua a 68 °C durante 3 minutos. Cada valor representa la media de tres determinaciones recogidas al inicio, en el intermedio y al final del proceso de extracción industrial. En cada compuesto y escala los valores de los tratamientos seguidos por diferente letra minúscula son diferentes significativamente de acuerdo al test de múltiple rango de Duncan. La ausencia de letra minúscula indica la ausencia de efecto significativo del tratamiento ($P \leq 0.05$) sobre el parámetro estudiado según ANOVA.

Compuestos fenólicos (mmol/kg)	Control	68 °C
Hidroxitirosol	0,042	0,038
Tirosol	0,033	0,034
Ac. Vanílico	0,001	0,000
Vanillina	0,000	0,000
Ac. p-Cumárico	0,000	0,000
Acetato Hidroxitirosol	0,013	0,012
FDAO	0,465 b	0,683 a
Acetato Tirosol	0,000	0,000
FDAL	0,344 b	0,560 a
Pinoresinol	0,000	0,001
Ac. Cinámico	0,007	0,004
Acetoxy-pinoresinol	0,022	0,019
FAAO	1,943 a	0,699 b
FAAL	1,100 a	0,506 b
Ac. Ferúlico	0,003	0,002
Luteolina	0,013	0,014
Apigenina	0,007	0,006
Total Fenoles	3,993 a	2,578 b
Total Ortodifenoles	2,470 a	1,438 b
Total Secoiridoideos	3,852 a	2,448 b

(FDAO) Forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FDAL) Forma dialdehídica de la aglucona del ligustrósido. (FAAO) Forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FAAL) Forma aldehídica de la aglucona del ligustrósido.

En resumen, el ensayo realizado a escala industrial con aceituna ‘Manzanilla’ en la campaña olivarera 2002/03 consiguió una reducción significativa del atributo amargo en el aceite posteriormente extraído, sin alterar apreciablemente los parámetros establecidos para evaluar su nivel de calidad, aunque ello conllevó pérdidas significativas de su estabilidad ante la oxidación, de su contenido en tocoferoles y de su contenido total en derivados fenólicos.

Los aceites obtenidos en este ensayo fueron estudiados más extensamente que los obtenidos previamente a menor escala con el fin de conocer si los tratamientos térmicos podían afectar a los niveles de componentes mayoritarios o minoritarios del mismo y si su aplicación pudiera conllevar el riesgo de hacer superar los límites establecidos en cada caso para el aceite de oliva virgen (**Tabla 45**). No se registró ningún efecto sobre las concentraciones de componentes mayoritarios (ácidos grasos) o minoritarios que pudiera suponer la pérdida de la condición de aceite virgen de oliva. Así, ni la composición en ácidos grasos de los aceites extraídos, ni el contenido total ni la composición de sus esteroides; ni de sus alcoholes lineales o triterpénicos; ni del contenido en eritrodiool + uvaol se vieron afectados significativamente por el tratamiento. No obstante, se registró un pequeño, pero significativo, aumento del contenido en ceras alifáticas, que no supuso riesgo alguno de aproximación al límite exigido para los aceites vírgenes de oliva (250 mg/kg). La comparación de los perfiles de los componentes volátiles del aceite obtenido a partir de las aceitunas tratadas con el control puso de manifiesto una disminución patente del número de componentes y de la intensidad de los mismos, no registrándose la aparición de ningún compuesto nuevo ajeno al control. No se observó, por tanto, el desarrollo de ningún olor extraño (**Figura 16**). Esta pérdida de contenido en compuestos como el hexanal y los diferentes isómeros de hexenal explicaría por qué el aceite procedente de aceitunas sometidas a inmersión en agua caliente presentara una menor presencia de atributos como verde o hierba cortada. Estos resultados apoyarían la hipótesis de que el tratamiento térmico inhibiría la ruta de formación de volátiles derivada de la acción de la lipoxigenasa (Pérez-Rubio et al., 2004).

La comparación del contenido en pigmentos de los aceites procedentes de aceitunas tratadas y no tratadas mediante un análisis más exhaustivo reveló el enorme aumento que indujo la inmersión de agua caliente en todos y cada uno de estos (**Tabla 46**). Nutricionalmente hablando, resultan especialmente interesantes los incrementos que se inducen en luteína y β -caroteno, que además de antioxidantes naturales se consideran provitaminas. La descomposición de pigmentos, que tiene lugar durante el procesado de la aceituna para la extracción de aceite, ha sido relacionada también con la actividad lipoxigenasa, que oxidaría tanto a las clorofilas como a los carotenoides (Pérez-Rubio et al., 2004).

Tabla 45.- Contenido en diferentes componentes de los aceites obtenidos a escala industrial a partir de aceitunas 'Manzanilla' no tratadas (Control) o sumergidas previamente en agua a 68 °C durante 3 minutos. Cada valor representa la media de tres determinaciones recogidas al inicio, en el intermedio y al final del proceso de extracción industrial. En cada compuesto y escala los valores de los tratamientos seguidos por diferente letra minúscula son diferentes significativamente de acuerdo al test de múltiple rango de Duncan. La ausencia de letra minúscula indica la ausencia de efecto significativo del tratamiento ($p \leq 0,05$) sobre el parámetro estudiado según ANOVA.

Componentes	Control	68 °C
Composición ácidos grasos (%)		
Palmítico	15,98	14,92
Palmitoleico	1,64	1,47
Esteárico	2,48	2,62
Elaídico	0,02	0,02
Oleico	74,87	76,00
Linoleico	4,48	4,57
Linolénico	0,53	0,40
Esteroles totales (mg/kg)	1050	1110
Composición Esteroles (%)		
Colesterol	0,24	0,27
Brasicasterol	0,00	0,00
Campesterol	2,20	2,27
Estigmasterol	0,79	1,16
Clerosterol	0,99	0,90
Sitostanol	0,25	0,29
$\Delta 5$ -Avenasterol	7,04	5,60
$\Delta 5,24$ -Estigmastadienol	0,93	0,58
$\Delta 7$ -Estigmastenol	0,17	0,33
$\Delta 7$ -Avenasterol	0,85	0,59
β -Sitosterol aparente	95,38	94,91
Alcoholes lineales (mg/kg)	100,3	106,7
Alcoholes triterpénicos (mg/kg)	248,9	252,4
Eritrodiol + uvaol (mg/kg)	3,7	3,6
Metilesteroles (mg/kg)	129,3	135,3
Ceras alifáticas (mg/kg)	24,97 b	37,54 a
C ₄₀	6,41 b	14,28 a
C ₄₂	8,05 b	11,09 a
C ₄₄	3,72 b	4,82 a
C ₄₆	6,78	7,36

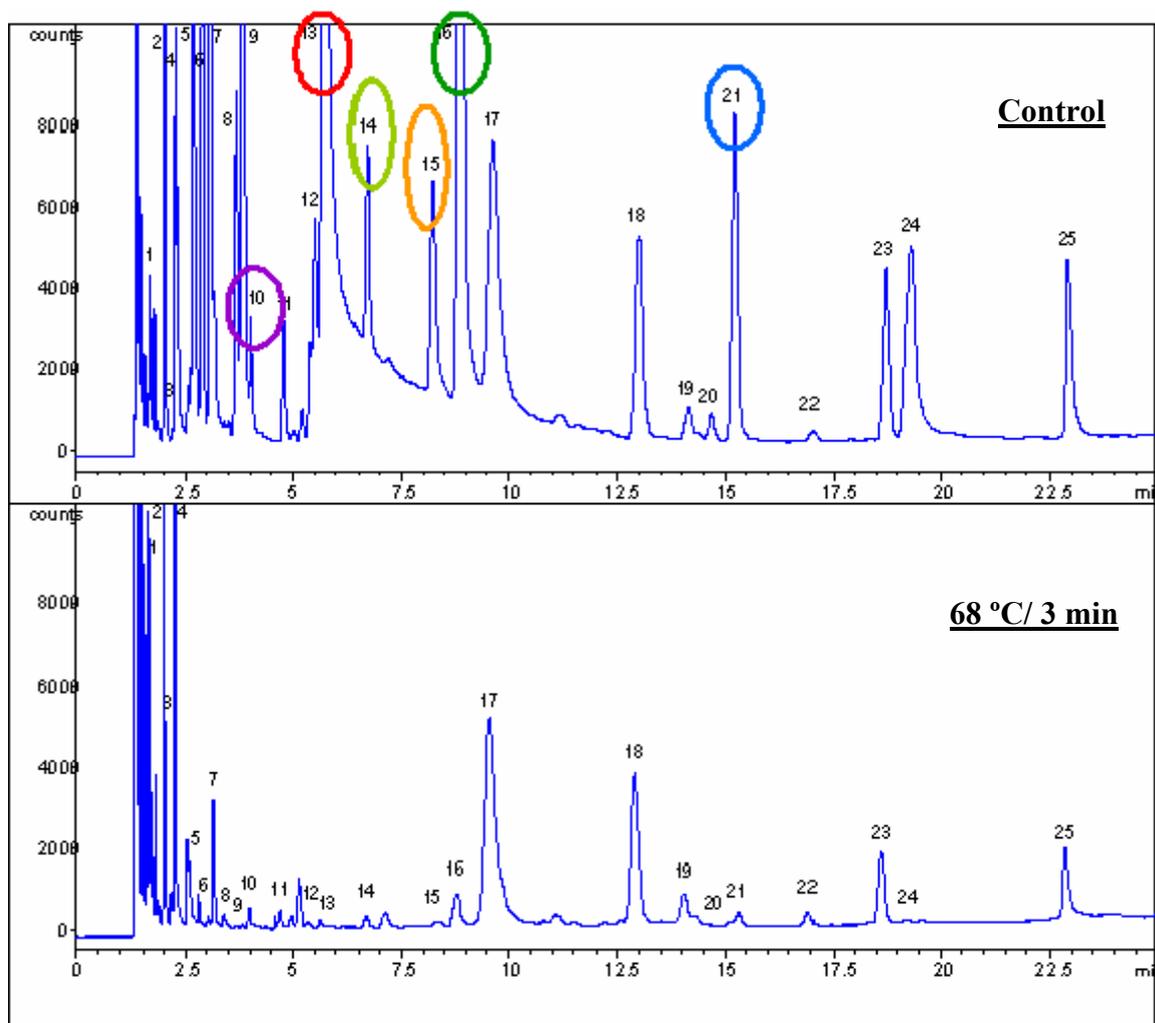


Figura 16.- Análisis por cromatografía gas-líquido de alta resolución. Los compuestos volátiles del aroma del aceite que se ven más afectados por el tratamiento térmico de la aceituna corresponden a los picos cromatográficos: (1) acetato de metilo. (2) metanol. (3) 2-metilbutanal. (4) etanol. (5 y 6) dímeros de penteno. (7) 1-penten-3-ona. (8 y 9) dímeros de penteno. **(10) hexanal.** (11) Z2-pentenal. (12) E3-hexenal. **(13) Z3-hexenal.** **(14) 1-penten-3-ol.** **(15) Z2-hexenal.** **(16) E2-hexenal.** (17) desconocido. (18) desconocido. (19) acetato de Z3-hexenilo. (20) E2-pentanol. **(21) Z2-pentanol.** (22) hexanol. (23) Z3-hexenol. (24) desconocido. (25) ácido acético.

Tabla 46.- Efecto del tratamiento sobre el contenido en pigmentos de los aceites obtenidos a escala industrial a partir de aceitunas ‘Manzanilla’ no tratadas (Control) o sumergidas previamente en agua a 68 °C durante 3 minutos. Cada valor representa la media de tres determinaciones recogidas al inicio, en el intermedio y al final del proceso de extracción industrial. En cada compuesto y escala los valores de los tratamientos seguidos por diferente letra minúscula son diferentes significativamente de acuerdo al test de múltiple rango de Duncan.

Pigmento (mg/kg)	Control	68 °C
Luteína	1,764 b	14,592 a
Clorofila b	0,649 b	24,261 a
Clorofila a	6,535 b	50,335 a
Feofitina b	0,005 b	3,010 a
Feofitina a	2,991 b	52,315 a
β-Caroteno	1,558 b	4,664 a

III. 5. 2. 4. 2. Campaña 2004/05

En la campaña 2004/05 se llevaron a cabo ensayos a escala industrial, utilizando dos variedades diferentes ('Manzanilla' y 'Picual') de tres distintos orígenes: Villarrasa (Huelva), Dos Hermanas (Sevilla) y Cabra (Córdoba). La variedad 'Manzanilla' se obtuvo de dos localizaciones diferentes con lo que se pretendió comprobar, si las condiciones idóneas de tratamiento eran independientes de la procedencia del fruto (**Tabla 47**). Así mismo, este ensayo permitiría verificar al mismo tiempo, si dichas condiciones de ensayo podían variar con la campaña, pues se emplearon aceitunas 'Manzanilla' procedentes de la misma finca que se usaron en la campaña 2002/03. Finalmente se estudió el tratamiento industrial con una de las aceitunas que ofrece mayores problemas de exceso de amargor, la 'Picual' de secano de Cabra, aprovechándose este ensayo para comprobar a escala industrial el efecto de una demora de 24 horas en la molturación del fruto tras el tratamiento. Las aceitunas 'Manzanilla' de ambas procedencias exhibieron unos índices de maduración muy aproximados, correspondientes al momento en que se cosecha habitualmente para su molturación, una vez que no pueda ser empleada para mesa, por tamaño, forma, moteado, exceso de producción, etc. La 'Picual' fue utilizada, coincidiendo aproximadamente con su envero (IM de '3,5'), momento en que se recomienda su cosecha (Hermoso et al., 1998).

Tabla 47.- *Parámetros para la evaluación del grado de madurez de las aceitunas empleadas en los ensayos industriales de tratamientos térmicos por inmersión durante la campaña 2004/05. Cada valor representa el valor medio de 100 determinaciones en frutos diferentes.*

Variedad y Origen	Índice de Color	Dureza (N/cm ²)	Índice de Madurez
'Manzanilla' (Villarrasa)	7,43	49,45	0,5
'Manzanilla' (Dos Hermanas)	8,98	45,13	0,8
'Picual' (Cabra)	0,06	37,83	3,5

Como en la campaña anterior, los ensayos a gran escala fueron precedidos de experimentos preliminares a escala de laboratorio, que permitieron establecer las condiciones idóneas de tratamiento (datos no mostrados). Las aceitunas 'Manzanilla' de ambas procedencias respondieron de manera similar a las temperaturas aplicadas, seleccionándose las mismas condiciones de tratamiento para su realización a gran escala: 56 °C durante 3

minutos. Estas condiciones de tratamiento contrastan con las requeridas por los frutos de la misma procedencia en la campaña 2002/03, que necesitaron entonces 68 °C, para obtener un efecto similar. Por tanto, los resultados parecen indicar que las condiciones de tratamiento dependen más de las condiciones particulares que experimenta el cultivo de una misma variedad en cada campaña, que de la procedencia, si ha estado sometido a similares condiciones, ya que las variables climáticas experimentadas por Dos Hermanas y Villarrasa durante esta campaña apenas difirieron (datos no mostrados).

A consecuencia del tratamiento térmico aplicado a los frutos, la intensidad de amargor de los aceites extraídos se redujo desde un nivel de entre “fuerte” y “extremo” (‘4,5’) hasta una intensidad “media” (‘3,0’), tanto en los aceites de ambas ‘Manzanilla’ como en los aceites de ‘Picual’ (**Tabla 48**), coincidiendo con los resultados previamente obtenidos en los ensayos preliminares (datos no mostrados). Así pues, en esta segunda campaña el tratamiento fue más efectivo que el empleado en la campaña 2002/03 con la aceitunas ‘Manzanilla’ de Dos Hermanas, pese a que en la segunda campaña el tratamiento fue mucho más suave (56 °C frente a 68 °C). Es evidente, por tanto, que las condiciones experimentadas por el cultivo durante el desarrollo del fruto en cada campaña son determinantes de la intensidad de amargor y de la selección de las condiciones del tratamiento térmico necesario para su control. Sería enormemente erróneo el empleo a ciegas de las mismas condiciones de tratamiento de una campaña a otra, sin realizar previamente un estudio a pequeña escala.

La demora durante 24 horas del procesamiento del fruto de la variedad ‘Picual’ después de la inmersión en agua caliente no determinó una disminución de la efectividad del tratamiento en la reducción de la presencia del atributo amargo en el aceite, manteniéndose aproximadamente en el mismo nivel que cuando fue extraído inmediatamente después del tratamiento térmico. En consecuencia, la reducción del amargor en el aceite dependió directamente de la temperatura empleada en el tratamiento previo y no de la temperatura de la molienda, pues la aceituna tras 24 horas de reposo fue procesada a temperatura ambiente.

Pese a mostrar una respuesta parecida frente al mismo tratamiento térmico, en lo que se refiere a la reducción de amargor, las aceitunas ‘Manzanilla’ de las dos procedencias mostraron un comportamiento muy distinto frente al proceso de extracción. Así, el rendimiento en la producción de aceite no superó el 5 % en los frutos control de Villarrasa, mientras que en los de Dos Hermanas se obtuvo más de un 15 % en este parámetro, volviéndose a registrar un valor análogo al de la campaña estudiada anteriormente. La aplicación del tratamiento térmico determinó una mejora sustancial del rendimiento graso de la aceituna ‘Manzanilla’ procedente de Villarrasa, mientras que no determinó mejora alguna

en los otros dos ensayos. La inmersión previa en agua caliente resultó, pues, especialmente útil, cuando el rendimiento graso del control era más reducido por la aparición de “pastas difíciles”, permitiendo obtener un aumento en la producción de aceite virgen, al mismo tiempo que modulaba su intensidad de amargor. En cambio, cuando el rendimiento ya es de por sí elevado, porque la extracción física de las aceitunas del control no plantea problemas, se alcanzaría ya un máximo de extractabilidad y el tratamiento térmico no podría aumentar el rendimiento graso.

Tabla 48- *Parámetros de calidad físico-químicos y sensoriales de los aceites obtenidos a partir de aceitunas de diferentes variedades y orígenes, no tratadas (Control) o previamente sumergidas en agua a diferentes temperaturas durante 3 minutos en la campaña 2004/05. Los aceites fueron extraídos inmediatamente tras el tratamiento o 24 horas después del mismo (+ 24h). Cada valor representa la media de tres determinaciones recogidas al inicio, en el intermedio y al final del proceso de extracción industrial, salvo los valores de rendimiento que carecen de replicado. En cada parámetro de calidad los valores de los tratamientos seguidos por diferente letra minúscula son diferentes significativamente de acuerdo al test de múltiple rango de Duncan. La ausencia de letra minúscula indica la ausencia de efecto significativo del tratamiento ($p \leq 0,05$) sobre el parámetro estudiado según ANOVA.*

Variedad (Origen)	'Manzanilla' (Villarrasa)		'Manzanilla' (Dos Hermanas)		'Picual' (Cabra)		
	Control	56 °C	Control	56 °C	Control	50 °C	50 °C (+ 24h)
Intensidad de amargor (0 ausencia – 5 máxima)	4,5 a	3,2 b	4,5 a	3,0 b	4,5 a	3,2 b	3,0 b
Rendimiento %	4,7	7,7	16,9	16,7	24,4	24,1	24,5
Acidez (% Oleico)	0,19	0,22	0,36	0,34	0,15	0,16	0,14
I. Peróxidos (meqO/kg)	7,7	6,3	8,4 b	11,2 a	7,8	8,0	8,2
K ₂₃₂	1,40	1,44	1,67	1,47	1,48	1,49	1,44
K ₂₇₀	0,17	0,17	0,16	0,14	0,15	0,14	0,12
Análisis sensorial global (1 pésima – 9 óptima)	8,0	8,2	8,0	7,0	8,0	7,5	8,0
Carotenos (mg/kg)	17,4 b	34,5 a	15,8 b	36,4 a	12,2 b	27,0 a	26,7 a
Clorofilas (mg/kg)	29,7 d	112,6 b	35,6 b	118,8 a	20,8 b	84,5 a	86,1 a
Tocoferoles (mg/kg)	430,9	412,5	157,6	156,4	208,9	219,8	206,6
Estabilidad (h)	89,2 a	62,1 b	124,2 a	98,0 b	150,0 a	140,0 b	121,6 c

Como ha venido siendo habitual en los ensayos realizados tanto a escala de laboratorio como a gran escala, los tratamientos térmicos no fueron responsables de un deterioro apreciable de ninguno de los parámetros físico-químicos establecidos legalmente para evaluar el grado de calidad de los aceites de oliva vírgenes. Sólo se incrementó significativamente el

valor del índice de peróxidos en el aceite procedente de la extracción de aceitunas ‘Manzanilla’ de Dos Hermanas, previamente sometidas a tratamiento con respecto a su correspondiente control, pero el valor alcanzado no se acercó al límite establecido para la pérdida de la categoría “extra” de calidad. Si se tiene en cuenta que en el ensayo industrial realizado en la anterior campaña con frutos de la misma variedad y procedencia ocurrió justo lo contrario, se pone de nuevo de manifiesto la poca fiabilidad de esta medida, que, como ya se ha comentado, puede depender de muchas variables ajenas al tratamiento realizado.

La calidad sensorial global de los aceites extraídos de frutos de la variedad ‘Manzanilla’ fue afectada de manera distinta a consecuencia del tratamiento según la procedencia del fruto. Mientras que el procedente de Villarrasa alcanzó una valoración análoga al control, el obtenido de aceitunas de Dos Hermanas mereció una calificación significativamente inferior. Por otra parte, el retraso en el procesamiento de la aceituna ‘Picual’ tras su tratamiento tuvo un efecto positivo sobre la calidad sensorial del aceite extraído, que recibió una evaluación parecida al obtenido sin que mediara tratamiento, mientras que el que se extrajera inmediatamente después del calentamiento sufrió una reducción estadísticamente significativa de su valoración de calidad sensorial, aunque ello no le determinaría un descenso de categoría comercial, pues se mantuvo dentro de los límites establecidos para la categoría extra.

En los ensayos realizados esta campaña también se registró el aumento de pigmentos en los aceites como consecuencia del tratamiento térmico que se le aplicó previamente a las aceitunas de las dos variedades empleadas, siendo especialmente notable el incremento de clorofilas experimentado por el aceite de ‘Manzanilla’ procedente de Villarrasa, probablemente debido a ser la más inmadura de las utilizadas en estas experiencias. En cambio, el contenido en tocoferoles no disminuyó de manera significativa en esta ocasión como efecto del tratamiento, manteniéndose prácticamente en los mismos niveles que el control. Un dato reseñable fue la diferencia encontrada en el contenido en estos compuestos entre los aceites de ‘Manzanilla’ procedentes de Villarrasa y los de la misma variedad de Dos Hermanas, que presentaron una concentración inferior a la mitad de la exhibida por los primeros. Finalmente, la estabilidad ante la oxidación de los aceites se redujo significativamente con la inmersión previa en agua caliente de todos los frutos tratados, especialmente en los que se demoró el procesado durante 24 horas de la variedad ‘Picual’.

El efecto de los tratamientos sobre el contenido total en fenoles, en ortodifenoles y derivados secoiridoideos de los aceites obtenidos a partir de los ensayos realizados a escala industrial fue bastante parecido al obtenido a escala de laboratorio o al realizado

anteriormente a escala industrial (**Tabla 49**). Las concentraciones de estos conjuntos de diferentes compuestos fenólicos disminuyeron en el aceite tras el tratamiento aplicado al fruto. Sin embargo, si se analiza cada compuesto fenólico por separado se pueden ver algunas diferencias con respecto al anterior ensayo industrial realizado con aceitunas ‘Manzanilla’ de Dos Hermanas. Así, en este segundo ensayo a escala industrial los contenidos en FDAO y FDAL descendieron en los aceites procedentes de esta variedad, mientras que en el primero aumentaron igualmente de forma significativa. Tampoco coincidió el efecto observado sobre el hidroxitirosol y el tirosol, que en la primera campaña no variaron significativamente en su concentración a consecuencia del tratamiento, mientras que descendieron claramente en la segunda. El comportamiento de los compuestos fenólicos de los aceites de ‘Manzanilla’ procedentes de Villarrasa con respecto al tratamiento difirió del exhibido por los de Dos Hermanas en el hidroxitirosol y acetato de hidroxitirosol, que aumentaron sensiblemente y en el tirosol, que no se vio modificado; pero coincidió en el descenso inducido en sus componentes fenólicos mayoritarios (FDAO, FDAL, FAAO y FAAL). En los aceites de la variedad ‘Picual’ cabe destacar el efecto potenciador de la reducción de compuestos fenólicos, que supuso el retraso de 24 horas en la extracción del aceite tras el tratamiento. Mientras que en el aceite obtenido de aceitunas procesadas inmediatamente después de la inmersión sólo se registraron, con respecto al control, descensos en el contenido en hidroxitirosol y FAAO, en el obtenido tras una demora de 24 horas se produjo, además, una reducción significativa de contenido en otros compuestos fenólicos, como el acetato de tirosol, el FDAO o el acetoxypinoresinol. Sin embargo, no se observaron cambios significativos en el FDAL ni en el FAAL. Siendo el FAAO el único derivado secoiridoideo que se redujo en el aceite, cuando éste fue extraído inmediatamente después del tratamiento térmico y que al mismo tiempo descendió significativamente la intensidad de amargor, se apoya de nuevo la hipótesis de que el FAAO debe ser uno de los responsables del atributo amargo (Mateos et al., 2004).

La demora en la extracción tras el tratamiento térmico pareció inactivar en mayor grado los enzimas responsables de facilitar la entrada en el aceite de derivados fenólicos durante la molienda de la aceituna y el batido de la pasta. Ello indica que la acción del tratamiento sobre el fruto provocaría un efecto irreversible sobre los enzimas responsables de la rotura de la oleuropeína y sus derivados, pues el retorno del fruto a la temperatura ambiente no indujo una recuperación de las concentraciones fenólicas iniciales en el aceite extraído. Por el contrario, se redujeron aun más las concentraciones de estos compuestos, sugiriendo que durante este retraso se inactivarían aún más estos enzimas. Debe tenerse en cuenta este hecho

en la realización industrial de los tratamientos, cuya eficacia se vería afectada si se retrasa el procesado después de su aplicación.

Tabla 49.- Contenido en los diferentes compuestos fenólicos de los aceites obtenidos a escala industrial a partir de aceitunas ‘Manzanilla’ y ‘Picual’ no tratadas (Control) o sumergidas previamente en agua durante 3 minutos a diferentes temperaturas. Cada valor representa la media de tres determinaciones recogidas al inicio, en el intermedio y al final del proceso de extracción industrial. En cada compuesto y escala los valores de los tratamientos seguidos por diferente letra minúscula son diferentes significativamente de acuerdo al test de múltiple rango de Duncan. La ausencia de letra minúscula indica la ausencia de efecto significativo del tratamiento ($p \leq 0,05$) sobre el parámetro estudiado según ANOVA.

Variedad (Origen)	‘Manzanilla’ (Villarrasa)		‘Manzanilla’ (Dos Hermanas)		‘Picual’ (Cabra)		
	Control	56 °C	Control	56 °C	Control	50 °C	50° C (+ 24h)
Hidroxitiroso	0,048 b	0,074 a	0,169 a	0,088 b	0,089 a	0,074 b	0,053 c
Tirosol	0,038	0,042	0,122 a	0,068 b	0,043	0,036	0,047
Ac. Vanílico	0,002	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,001
Vanilina	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	0,003
Ac. p-Cumárico	0,005	0,004	0,005	0,002	0,002	0,002	0,002
Acetato Hidroxitirosol	0,025 b	0,053 a	0,041	0,040	0,009	0,010	0,008
FDAO	0,486 a	0,367 b	0,659 a	0,430 b	0,241 a	0,250 a	0,157 b
Acetato Tirosol	0,028 a	0,018 b	0,118 a	0,029 b	0,029 a	0,027 a	0,016 b
FDAL	0,507 a	0,376 b	0,481 a	0,301 b	0,283	0,299	0,261
Pinoresinol	0,008	0,005	0,010	0,007	0,012	0,012	0,011
Ac. Cinámico	0,002	0,001	0,006	0,004	0,011	0,010	0,008
Acetoxypinoresinol	0,027 a	0,013 b	0,055 a	0,015 b	0,055 a	0,050 a	0,036 b
FAAO	0,264 a	0,182 b	0,576 a	0,243 b	0,856 a	0,584 b	0,544 b
FAAL	0,133 a	0,079 b	0,328 a	0,085 b	0,222	0,239	0,205
Ac. Ferúlico	0,002	0,002	0,001	0,001	0,001	0,002	0,002
Luteolina	0,003	0,002	0,005	0,001	0,002	0,002	0,003
Apigenina	0,002	0,001	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001
Total Fenoles	1,537 a	1,220 b	2,581 a	1,317 b	1,857 a	1,601 b	1,358 c
Total Ortodifenoles	0,825 a	0,677 b	1,448 a	0,802 b	1,196 a	0,919 b	0,763 c
Total Secoiridoideos	1,390 a	1,004 b	2,044 a	1,059 b	1,602 a	1,372 b	1,167 c

(FDAO) Forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FDAL) Forma dialdehídica de la aglucona del ligustrósido. (FAAO) Forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FAAL) Forma aldehídica de la aglucona del ligustrósido.

III. 5. 2. 4. 3. Campaña 2005/06

En la campaña 2005/06 se abordó por tercera vez consecutiva el tratamiento térmico en la variedad ‘Manzanilla’, el segundo de la procedencia Villarrasa de esta variedad, y se llevaron a cabo, además, dos ensayos con frutos de diferente grado de maduración de la variedad ‘Verdial’ de la misma procedencia, que presentaban una alta intensidad de atributo amargo en sus aceites (**Tabla 50**). Como en anteriores campañas, los tratamientos a escala industrial fueron precedidos de una serie de ensayos a escala de laboratorio (datos no mostrados). De nuevo fue necesario el empleo de una temperatura de baño a 65 °C durante 3 minutos para conseguir reducir significativamente la intensidad del amargor del aceite procedente de la aceituna ‘Manzanilla’, sin que se alteraran sus parámetros de calidad, de manera similar a como ocurriera en la campaña 2002/03 con las aceitunas ‘Manzanilla’ procedentes de Dos Hermanas. Sin embargo, la aplicación de estas condiciones a escala industrial determinó que el aceite se emulsionara durante el proceso de extracción, no respondiendo por primera vez de la misma manera que lo hiciera a pequeña escala (**Foto 8**). Intentando corregir este problema se realizó otro ensayo en el que se mantuvo la temperatura del tratamiento, pero se redujo su duración a 1 minuto.

Tabla 50.- *Parámetros para la evaluación del grado de madurez de las aceitunas cultivadas en Villarrasa empleadas en los ensayos industriales de tratamientos térmicos por inmersión durante la campaña 2005/06. Cada valor representa el valor medio de 100 determinaciones en frutos diferentes.*

Variedad	Índice de Color	Dureza (N/cm ²)	Índice de Madurez
‘Manzanilla’	7,93	49,44	0,5
‘Verdial’	8,43	47,55	0,5
‘Verdial’	3,21	44,28	1,5

En el experimento realizado con las aceitunas más inmaduras de la variedad ‘Verdial’, los ensayos previos a escala de laboratorio mostraron que se necesitaban 60 °C durante 3 minutos para conseguir el efecto deseado. Sin embargo, teniendo en cuenta lo ocurrido con las aceitunas ‘Manzanilla’, se aplicó una solución inversa a la tomada en el experimento anterior; se redujo la temperatura de ensayo a 57 °C, pero se amplió el tiempo de inmersión en agua caliente hasta un total de 5 minutos. Como en el caso del ensayo industrial de la variedad ‘Picual’ en la pasada campaña, se estudió de nuevo el efecto de una demora de 24 horas en el procesamiento de los frutos previamente tratados térmicamente. Lamentablemente, también se produjo la emulsión del aceite cuando se procesaron estos últimos frutos, dejando claro que la

demora en el procesado intensificaba la intensidad del tratamiento, no sólo en la reducción de componentes fenólicos, sino también determinando una desnaturalización de las estructuras fisiológicas internas de la aceituna, que induciría la emulsión del aceite durante su extracción. Finalmente, se repitió el experimento con las mismas condiciones un mes más tarde con un fruto más maduro.



Foto 8.- Emulsión aparecida durante la extracción del aceite a escala industrial de aceitunas ‘Manzanilla’ de Villarrasa, tras su inmersión en agua a 65 °C durante 3 minutos.

Los tratamientos aplicados a escala industrial a las aceitunas ‘Manzanilla’ y a las ‘Verdial’ más inmaduras redujeron significativamente la intensidad del amargor de los aceites extraídos, que pasaron de un nivel entre “fuerte” y “extremo” a otro entre “medio” y “fuerte” (**Tabla 51**). Las aceitunas ‘Verdial’ con mayor grado de maduración ofrecieron un aceite con un amargor “fuerte”, que tras su inmersión en agua se redujo hasta un nivel “medio”. En consecuencia, de nuevo el tratamiento consiguió el efecto buscado, pudiendo ser aplicado por la industria de manera extraordinariamente fácil. Además, el rendimiento en la extracción de aceite fue mejorado en todos los ensayos realizados en los que no hubo problemas de emulsión. Es de destacar el alto rendimiento alcanzado en esta campaña por las aceitunas ‘Manzanilla’ en comparación con el conseguido la campaña anterior, pareciéndose esta vez a los exhibidos por las aceitunas de la misma variedad de Dos Hermanas. Como en anteriores ensayos, ya sea a escala industrial o de laboratorio, el empleo del tratamiento térmico no determinó una pérdida de categoría de calidad en los aceites posteriormente extraídos en cualquiera de las variedades estudiadas. Así, el grado de acidez de los aceites no experimentó ningún cambio significativo a consecuencia de la inmersión previa del fruto y la absorbancia en la región ultravioleta incluso llegó a disminuir, especialmente en los valores de K_{270} de los procedentes de la variedad ‘Verdial’, en donde esta reducción resultó ser estadísticamente

significativa. En cambio, el índice de peróxidos siempre fue mayor en los aceites procedentes del tratamiento, llegando a ser este incremento significativo en el caso del aceite de ‘Manzanilla’. El análisis sensorial global mostró un hecho curioso en los aceites de la variedad ‘Manzanilla’. El control fue valorado significativamente peor que el obtenido tras el tratamiento, porque presentaba un cierto olor identificado como a “queso”, que no apareció en este último. Además, la rapidez del tratamiento, aunque redujo menos la intensidad de amargor que en otros ensayos, también afectó en menor medida a los componentes aromáticos asociados a los atributos “verde” o “hierba”. En los ensayos realizados con la variedad ‘Verdial’ se repitió lo ya observado, los aceites obtenidos tras el tratamiento fueron peor valorados que los utilizados como control, debido a la pérdida de los atributos de “frescura” citados anteriormente.

Tabla 51- *Parámetros de calidad físico-químicos y sensoriales de los aceites obtenidos a partir de aceitunas ‘Manzanilla’ y ‘Verdial’ de Villarrasa con diferentes índices de maduración, no tratadas (Control) o previamente sumergidas en agua a diferentes temperaturas durante 1 minuto (‘Manzanilla’) o 5 minutos (‘Verdial’) en la campaña 2005/06. Los aceites fueron extraídos inmediatamente tras el tratamiento. Cada valor representa la media de tres determinaciones recogidas al inicio, en el intermedio y al final del proceso de extracción industrial, salvo los valores de rendimiento que carecen de replicado. En cada parámetro de calidad los valores de los tratamientos seguidos por diferente letra minúscula son diferentes significativamente de acuerdo al test de múltiple rango de Duncan. La ausencia de letra minúscula indica la ausencia de efecto significativo del tratamiento ($p \leq 0,05$) sobre el parámetro estudiado según ANOVA.*

Variedad (Índice de Maduración)	‘Manzanilla’ (0,5)		‘Verdial’ (0,5)		‘Verdial’ (1,5)	
	Control	65 °C	Control	57 °C	Control	57 °C
Intensidad de amargor (0 ausencia – 5 máxima)	4,4 a	3,6 b	4,5 a	3,5 b	4,1 a	3,1 b
Rendimiento %	15,9	16,9	18,5	19,7	21,8	23,0
Acidez (% Oleico)	0,26	0,25	0,26	0,27	0,32	0,30
I. Peróxidos (meqO/kg)	10,75 b	12,84 a	11,33	12,80	12,70	12,91
K₂₃₂	1,87	1,85	1,87	1,73	1,93 a	1,66 b
K₂₇₀	0,20	0,18	0,22 a	0,17 b	0,21 a	0,15 b
Análisis sensorial global (1 pésima – 9 óptima)	6,5 b	7,0 a	8,0 a	7,0 b	8,0 a	7,0 b
Carotenos (mg/kg)	14,34 b	26,46 a	17,90 b	36,18 a	21,12 b	25,49 a
Clorofilas (mg/kg)	25,65 b	60,56 a	31,79 b	81,57 a	36,76 b	56,14 a
Tocoferoles (mg/kg)	201,4 a	185,5 b	211,5	209,4	208,5	218,7
Estabilidad (horas)	155 a	127 b	80 a	61 b	82 a	63 b

El efecto del tratamiento sobre otros parámetros de calidad como el contenido en pigmentos y la estabilidad respondió al comportamiento observado anteriormente, aumentando en el primer caso y disminuyendo en el segundo. Si bien este aumento de carotenos y clorofilas, aunque siempre fue significativo, no alcanzó la magnitud de anteriores

ensayos, especialmente en los procedentes de las aceitunas menos inmaduras de la variedad ‘Verdial’. En cambio, sólo disminuyó significativamente el contenido en tocoferoles a consecuencia del tratamiento en los aceites procedentes de la variedad ‘Manzanilla’, pues en los aceites de la variedad ‘Verdial’ no se observó este fenómeno. La respuesta del contenido en los principales grupos fenólicos del aceite extraído al tratamiento térmico aplicado al fruto fue similar a la ya observada en anteriores ensayos (**Tabla 52**). Tanto el contenido total en fenoles, como el de los ortodifenoles o de los derivados secoiridoideos se redujeron significativamente a consecuencia del tratamiento, debiéndose sobre todo a los descensos de contenido registrados en todos estos ensayos principalmente en los dos derivados aldehídico y dialdehídico de la aglucona de la oleuropeína (FAAO y FDAO). En general, se observó una reducción sistemática de todos los compuestos fenólicos analizados debida al tratamiento térmico. Solamente en el ensayo realizado con las aceitunas ‘Verdial’ más inmaduras se observó un aumento de contenido en hidroxitirosol y tirosol en el aceite que se extrajo tras el tratamiento.

En resumen, los tratamientos térmicos realizados a escala industrial con las tres variedades empleadas, indistintamente de su procedencia, permitieron conseguir el objetivo principal propuesto, modular la intensidad del atributo amargo de los aceites hasta un nivel admisible para el paladar de cualquier posible consumidor, sin que se afectasen sensiblemente los parámetros físico-químicos establecidos para medir su categoría de calidad. El sistema empleado sería fácilmente adaptable a las actuales líneas de procesado de aceite de oliva virgen y, en principio, no requiere el desarrollo de nueva tecnología ajena a la industria olivarera, pues bastaría con acoplar las pasteurizadoras en continuo de aceitunas de mesa entre el lavado y el molturado del fruto. Sin embargo, no ha sido posible establecer unas condiciones determinadas de tratamiento que logren este objetivo, utilizando cualquier tipo de fruto, independientemente de su grado de maduración, procedencia, variedad o circunstancias de cultivo. En cada caso será necesario precisar previamente a pequeña escala los tiempos y temperaturas más adecuados para este propósito, teniendo en cuenta que la demora en el procesado incrementa la severidad del tratamiento y que la realización del ensayo a gran escala puede desarrollar un efecto más drástico que el obtenido a escala de laboratorio.

Tabla 52.- Contenido en los diferentes compuestos fenólicos de los aceites obtenidos a escala industrial a partir de aceitunas ‘Manzanilla’ y ‘Verdial’ de Villarrasa con diferentes índices de maduración, no tratadas (Control) o previamente sumergidas en agua a diferentes temperaturas durante 1 minuto (‘Manzanilla’) o 5 minutos (‘Verdial’) en la campaña 2005/06. Cada valor representa la media de tres determinaciones recogidas al inicio, en el intermedio y al final del proceso de extracción industrial. En cada compuesto y escala los valores de los tratamientos seguidos por diferente letra minúscula son diferentes significativamente de acuerdo al test de múltiple rango de Duncan. La ausencia de letra minúscula indica la ausencia de efecto significativo del tratamiento ($p \leq 0,05$) sobre el parámetro estudiado según ANOVA.

Variedad (Índice de Maduración)	‘Manzanilla’ (0,4)		‘Verdial’ (0,5)		‘Verdial’ (1,5)	
	Control	65 °C	Control	57 °C	Control	57 °C
Compuestos fenólicos (mmol/kg)						
Hidroxitirozol	0,121 a	0,059 b	0,062	0,075	0,128 a	0,042 b
Tirosol	0,062 a	0,043 b	0,061 b	0,140 a	0,113 a	0,074 b
Ac. Vanílico	0,001	0,000	0,001	0,001	0,001	0,000
Vanillina	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,002
Ac. p-Cumárico	0,004	0,002	0,003	0,002	0,002	0,002
Acetato Hidroxitirosol	0,017	0,018	0,010	0,015	0,009	0,011
FDAO	0,889 a	0,739 b	0,460 a	0,289 b	0,445 a	0,282 b
Acetato Tirosol	0,044 a	0,024 b	0,013	0,011	0,029 a	0,012 b
FDAL	0,757	0,749	0,650	0,620	0,571 a	0,416 b
Pinoresinol	0,039 a	0,011 b	0,008	0,005	0,010	0,006
Ac. Cinámico	0,005	0,005	0,006	0,004	0,003	0,003
Acetoxy-pinoresinol	0,063 a	0,044 b	0,100 a	0,043 b	0,081 a	0,032 b
FAAO	1,097 a	0,523 b	0,657 a	0,355 b	0,499 a	0,274 b
FAAL	0,360	0,346	0,323 a	0,255 b	0,261 a	0,156 b
Ac. Ferúlico	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Luteolina	0,006	0,002	0,004	0,001	0,005	0,001
Apigenina	0,004	0,001	0,002	0,001	0,002	0,001
Total Fenoles	3,470 a	2,568 b	2,360 a	1,818 b	2,160 a	1,315 b
Total Ortodifenoles	2,128 a	1,340 b	1,191 a	0,735 b	1,083 a	0,610 b
Total Secoiridoideos	3,103 a	2,357 b	2,090 a	1,519 b	1,776 a	1,128 b

(FDAO) Forma dialdehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FDAL) Forma dialdehídica de aglucona del ligustrósido. (FAAO) Forma aldehídica de la aglucona de la oleuropeína. (FAAL) Forma aldehídica de la aglucona del ligustrósido.

IV. CONCLUSIONES

La medida objetiva del color de la epidermis de las variedades de aceituna ‘Picual’ y ‘Arbequina’ permitió evaluar con más precisión que el índice de madurez el grado de maduración de las aceitunas hasta el momento en que estas adquieren una tonalidad púrpura.

La medida de la dureza de las aceitunas ‘Picual’ y ‘Arbequina’ permitió evaluar de una manera objetiva, no destructiva y continua el progreso de toda su maduración.

El progreso de la maduración de las aceitunas ‘Picual’ y ‘Arbequina’ no determinó que se redujera la calidad comercial de los aceites extraídos en ninguna de las dos campañas estudiadas. En cambio, el amargor de éstos disminuyó con el proceso, aunque en los de ‘Arbequina’ siempre mereció una valoración muy baja. De la misma forma, a partir de Noviembre los grupos de derivados fenólicos (totales, derivados secoiridoideos y ortodifenoles) disminuyeron en los aceites obtenidos de las aceitunas ‘Picual’.

El aumento en la precipitación durante el desarrollo de la aceituna ‘Arbequina’ y ‘Picual’ provocó un retraso de los parámetros que determinan el progreso de su maduración, e indujo en sus aceites una reducción de la estabilidad ante la oxidación, una disminución del contenido en grupos de derivados fenólicos (totales, derivados secoiridoideos y ortodifenoles) y una reducción en la intensidad de amargor a partir de Diciembre en los de la variedad ‘Picual’.

El aceite extraído químicamente con solventes orgánicos de la aceituna no presentó intensidad de amargor alguna, mientras que el obtenido por extracción física presentó una intensidad “fuerte”. De ello se desprende, que los componentes responsables del amargor no se hallan presentes en el aceite de oliva contenido en el fruto antes de su extracción física. Estos deben ser conferidos durante la molturación y el batido de la pasta de aceituna.

El mantenimiento del fruto en una estufa a 80 °C durante 12 horas indujo una práctica eliminación del amargor en el aceite extraído. Sin embargo, el nivel de amargor del propio fruto apenas se modificó. La incorporación del amargor al aceite, por tanto, se inhibió por la

aplicación previa de calor a la aceituna, indicando la intervención de al menos una actividad enzimática termolábil.

La intensidad de amargor de los aceites extraídos fue paulatinamente disminuyendo conforme progresaba el tiempo de almacenamiento a 5 °C de las aceitunas, sin que se afectase su categoría comercial. Sin embargo, este descenso no ocurrió de forma similar en las distintas variedades estudiadas, aunque siempre respondió a un mismo tipo de curva de segundo grado, requiriéndose al menos un mes de conservación para reducir la intensidad de amargor hasta un nivel medio.

El tratamiento a 40 °C mediante transmisión del calor por aire durante un tiempo ≥ 24 horas, aplicado sobre aceitunas de las variedades ‘Lechín’, ‘Manzanilla’ y ‘Verdial’ (IM $\leq 2,0$) provocó una disminución significativa de la intensidad de amargor en los aceites extraídos a continuación, que coincidió linealmente con la reducción en el conjunto de compuestos fenólicos derivados del hidroxitirosol (hidroxitirosol, acetato de hidroxitirosol, FDAO y FAAO), sin que se disminuyera su categoría comercial (“extra”). También indujo una reducción de su estabilidad ante la oxidación.

El mantenimiento a 20 °C durante 72 horas de aceitunas de la variedad ‘Lechín’ (IM ‘1,5’) en un recipiente herméticamente cerrado indujo la formación de una atmósfera modificada con un contenido mayor de CO₂ e inferior de O₂ que la del aire. Estas condiciones propiciaron el desarrollo de olores y sabores extraños en el aceite que se extrajo posteriormente. La intensidad de estos atributos sensoriales negativos aumentó cuando se añadieron 30 ppm de etileno a la atmósfera y/o cuando el tratamiento se realizó a 40 °C.

Los tratamientos térmicos por inmersión de aceitunas de las variedades ‘Manzanilla’, ‘Pico Limón’, ‘Picual’ y ‘Verdial’ (IM $\leq 2,0$) en agua a temperaturas entre 45 y 72 °C durante tiempos entre 1 y 120 minutos indujeron una reducción significativa del amargor presente en el aceite obtenido posteriormente, sin afectar a su categoría comercial. El tratamiento también indujo una pérdida de estabilidad ante la oxidación, una pérdida en el contenido en los diferentes grupos fenólicos y un considerable aumento de la presencia de clorofilas y carotenos en los aceites.

En un ensayo a escala industrial con aceitunas ‘Manzanilla’ (IM ‘0,5’), aplicando una inmersión de 68 °C durante 3 minutos en una pasteurizadora de aceitunas de mesa, se consiguió un resultado análogo al experimentado bajo las mismas condiciones a escala de laboratorio, tanto en la reducción del amargor, de la estabilidad y del contenido en fenoles del aceite, como en el mantenimiento de sus parámetros de calidad dentro de los límites requeridos para la categoría “extra”, obteniéndose, además, un aumento del rendimiento en la obtención de aceite. Este tratamiento térmico no indujo un aumento de las concentraciones de componentes mayoritarios o minoritarios en los aceites que pudiera suponer la pérdida de la condición de aceite virgen de oliva. Así, ni la composición en ácidos grasos de los aceites extraídos, ni el contenido total en la composición de sus esteroides; ni de sus alcoholes lineales o triterpénicos; ni del contenido en eritrodiol + uvaol, ni el contenido en ceras sobrepasaron los límites establecidos a consecuencia del tratamiento. Este tratamiento indujo una disminución del número y contenido de componentes volátiles, no registrándose la aparición de ningún componente nuevo ajeno al control, que pudiera indicar el desarrollo de cualquier olor extraño al propio del aceite de oliva virgen.

Las condiciones idóneas de tratamiento por inmersión de frutos en agua caliente dependen de las condiciones de cada campaña, en que se haya desarrollado el fruto, y de la variedad empleada. Sería muy arriesgado el empleo a ciegas de las mismas condiciones de tratamiento de una campaña a otra, sin realizar previamente un tanteo a pequeña escala, puesto que la aplicación de temperaturas excesivas y/o tiempos de inmersión demasiado prolongados pueden inducir la emulsión del aceite durante su proceso de extracción.

La demora durante 24 horas del procesamiento del fruto después del tratamiento determinó un aumento de la severidad de sus efectos, induciendo una mayor reducción de las concentraciones de derivados fenólicos presentes en el aceite o determinando la emulsión de éste durante su extracción, de la misma forma que si se hubiera empleado un tratamiento más prolongado y/o a mayor temperatura.

Los tratamientos a escala industrial con una pasteurizadora de aceitunas de mesa pueden desarrollar un efecto más drástico que los obtenidos a escala de laboratorio, lo que debe de ser tenido en cuenta para la selección de las condiciones de tratamiento.

Los tratamientos térmicos por inmersión en agua caliente pueden realizarse a escala industrial, siendo perfectamente compatibles con las habituales líneas de procesado de la aceituna de molino.

V. BIBLIOGRAFÍA

AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación). (1992a). Norma UNE 55.011-64. Determinación de la acidez libre.

AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación). (1992b). Norma UNE 55.023-73. Índice de peróxidos.

AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación). (1992c). Norma UNE 55.047-73. Medidas espectrofotométricas de la absorción en la región ultravioleta.

AKASBI, M.; SHOEMAN, D. W.; SAARI CSALLANY, A. (1993). High- performance liquid chromatography of selected phenolic compounds in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70: 367- 370.

ALBA-MENDOZA, J.; MUÑOZ-ARANDA, E.; MARTÍNEZ-SUÁREZ, J. M. (1982). Obtención del aceite de oliva: Empleo de productos que facilitan su extracción. *Alimentaria.* 138: 25–55

ALBA- MENDOZA, J. (1998). Capítulo 17, Elaboración de aceite de Oliva virgen; *En: El Cultivo del Olivo.* Ed. Barranco, D.; Fernández Escobar, R.; Rallo, L. (1998). Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. España. pp. 519-544.

ALCUDIA, F.; CERT, A.; ESPARTERO, J. L.; MATEOS, R.; TRUJILLO, M. (2003). Procedimiento para la preparación de ésteres de hidroxitirosol, ésteres obtenidos y utilización. *ES03700327, 2-7.* Consejo Superior de Investigaciones Científicas y Universidad de Sevilla.

ALEGRE, S. (2001). Efecto de diferentes estrategias de riego deficitario controlado durante la época estival sobre la producción del olivo (*Olea europaea* L.) cv Arbequina. Tesis doctoral. Universidad de Lleida.

AMIOT, M. J.; FLEURIET, A.; MACHEIX, J. J. (1986). Importance and Evolution of Phenolic Compounds in Olive During Growth and Maturation. *J. Agric. Food Chem.* 34: 823-826.

AMIOT, M. J.; FLEURIET, A.; MACHEIX, J. J. (1989). Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, 28: 67- 69.

ANDREWES, P.; JOHANNEKE, L.; BUSCH, H. C.; DE JOODE, T.; GROENEWEGEN, A.; ALEXANDRE, H. (2003). Sensory Properties of Virgin Olive Oil Polyphenols: Identification of Deacetoxy-ligstroside Aglycon as a Key Contributor to Pungency. *J. Agric. Food Chem.* 51: 1414-1420

ANGEROSA, F.; D' ALESSANDRO, N.; CORANA, F.; MELLERIO, G. (1996). Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatography A.* 736: 195-203.
ANGEROSA, F.; D'ALESSANDRO, N.; KONSTANTINOU, P.; DIGIACINTO, L. (1995). GC-MS evolution of phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1802-1807.

BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. (1997). *El cultivo del olivo*. (1ª Edición). Coedición, Junta de Andalucía: Conserjería de Agricultura y Pesca. Edición Mundi-Prensa, Madrid. 620 pp.

BARRANCO, D.; FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R.; RALLO, L. (1998). *El cultivo del olivo*. (2ª Edición). Coedición, Junta de Andalucía: Conserjería de Agricultura y Pesca. Edición Mundi-Prensa, Madrid. 651 pp.

BELTRÁN, G.; HERMOSO, M.; UCEDA, M.; FRÍAS, L. (2004). Capítulo 6: Maduración. En: *El cultivo del olivo*. Ed. Barranco, D; Fernández Escobar, R; Rallo, L. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Ed. Mundi-Prensa. España, pp. 158-183.

BELTRÁN, G.; DEL RÍO, C.; SÁNCHEZ, S.; MARTÍNEZ, L. (2004). Seasonal changes in olive fruit characteristics and oil accumulation during ripening process. *J. Sci. Food Agric.* 84: 1783-1790.

BELTRÁN, G.; AGUILERA, M. P.; DEL RIO, C.; SANCHEZ, S.; MARTINEZ, L. (2005). Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chemistry.* 89: 207-215

BOSCHELLE, O.; MOZZON, M.; GIONO, A. (1994). Aceite virgen extra típico. ¿Cuáles son sus perspectivas en Fiuli-Venezia Giulia? (Typical virgin olive oil. Which are its perspectives in Fiuli-Venezia Giulia?). *Olivae* 50: 31-35.

BOSKOU, D. (1996). Olive Oil. In *Olive Oil Chemistry and Technology*. D. Boskou (Ed.). AOCS. Press. Champaign, Illinois, USA, pp.101.

BOSKOU, D. (1998). Química y tecnología del aceite de oliva. A. Madrid Vicente, Ediciones. Madrid. 67-147.

BRENES, M.; GARCÍA, A.; GARCÍA, P.; RIOS, J. J.; GARRIDO, A. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 47: 3535-3540.

BRENES, M.; HIDALGO, F. J.; GARCÍA, A.; RIOS, J. J.; GARCÍA, P.; ZAMORA, R.; GARRIDO, A. (2000b). Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 715-720.

CANET, M.; GARCÍA, J. M. (1999). Repercusión de la frigoconservación de la aceituna de molino en el proceso de producción de aceite de oliva virgen. *Grasas y Aceites.* 50(3): 181-184.

CAPONIO, F.; GOMES, T.; PASQUALONE, A. (2001). Phenolic compounds in virgin olive oils. Influence of the degree of olive ripeness on organoleptic characteristics and Shelf-life. *Eur. Food Res. Technol.* 212: 329- 333.

CASTELLANO, J. M.; GARCÍA, J. M.; MORILLA, A.; PERDIGUERO, S.; GUTIERREZ, F. (1993). Quality of Picual Olive Fruits Stored Under Controlled Atmospheres. *J. Agric. Food Chemistry.* 41: 537- 539.

CASTRO, P.; MIRANDA, J. L.; GOMEZ, P.; ESCALANTE, D. M.; SEGURA, F. L.; MARTIN, A.; FUENTES, F.; BLANCO, A.; ORDOVAS, J. M.; JIMÉNEZ, F. P. (2000). Comparison of an Oleic acid enriched-diet vs NCP-I diet on LDL susceptibility to oxidative modifications. *Eur. J. Clin. Nutr.* 54: 61-67.

CATALANO, M.; SCIANCALEPORE, V. (1965). Il Lipide totale Della drupa e degli organi fotosintetizzanti dell'oliva. Ricerche preliminari. *Rev. It. Sost. Grasse.* 50: 114-116.

CERT, A.; ALBA, J.; LEÓN-CAMACHO, M.; MOREDA, W.; PÉREZ-CAMINO, M. C. (1996). Effects of talc addition and operating mode on the quality and oxidative stability of virgin olive oils obtained by centrifugation. *J. Agric. Food Chem.* 44: 3930-3934.

CERT, A. (1998). Componentes del aceite de oliva con interés farmacológico y nutricional. En: *La alimentación mediterránea: una apuesta científica y empresarial.* Ed. Fernández-Llóbreg y del Rey, P.; Becerra Ratia, J. Universidad de Málaga.

CHOI, K.; LEE, G.; HAN, Y. J.; BUNN, J. M. (1995). Tomato maturity evaluation using color image analysis. *Transactions ASAE* 38: 171-176.

CIMATO, A.; MATTEI, A.; OSTI, M. (1990). Variation of polyphenol composition with harvesting period. *Acta Horticulturae*, 286: 453-456.

CIVANTOS, L.; CONTERAS, R.; GRANA, R. (1992). Obtención del Aceite de Oliva virgen. *Editorial Agrícola Española*, S.A. Madrid.

CIVANTOS, L. (1996) Capítulo 4. En: *Enciclopedia mundial del olivo.* Consejo Oleícola Internacional. Plaza y Janes Editores S.A. Barcelona. España. pp. 147-193.

CODEX ALIMENTARIUS (2002). Report of the Thirty-Fourth Session of the Codex Committee on Food Hygiene (ALINORM 03/13). *FAO/WHO*, Rome, Italy.

COMISIÓN DEL CODEX ALIMENTARIUS (1993). Normas revisadas para los aceites de oliva. CL 1993/15 FO.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). (1997). El aceite de oliva y la salud. Ed. Mundi-Prensa. Madrid. pp. 13-23.

CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (2004). El mercado mundial del aceite de oliva. <http://www.internationaloliveoil.org/downloads/consommation1.PDF>

CONSEJO OLÉICOLA INTERNACIONAL (2006). Cifras clave del mercado mundial del aceite de oliva. Datos aprobados en la 94ª Reunión del COI (Madrid, España). <http://www.internationaloliveoil.org/downloads/Balolive06.PDF>

CORTESI, N.; AZZOLINI, M.; ROVELLINI, P.; FEDELI, E. (1995a). I. Componenti minori polari degli oli vergini di oliva: ipotesi di struttura mediante LC-MS. *Riv. Ital. Sost. Grasse.* 72: 241-244.

CORTESI, N.; AZZOLINI, M.; ROVELLINI, P. (1995b). Dosaggio dei componenti minori polari (CMP) in oli vergini di oliva. *Riv. Ital. Sost. Grasse.* 72: 333-337.

DEL CARLO, M.; SACCHETTI, G.; COMPAGNONE, D.; MASTROCOLA, D.; LIBERTORE, L.; CICHELLI, C. (2004). Contribution of the phenolic fraction to oxidant activity and oxidative stability of olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 52: 4072- 4079.

DIARIO OFICIAL DE LA UNIÓN EUROPEA 13.11.2003: “Reglamento (CE) nº 1989/2003, que modifica el reglamento (CEE) nº 2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

DIXON, R. A.; PAIVA, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The Plant Cell.* 7: 1085-1097.

DONAIRE, J. P.; SÁNCHEZ, A. J.; LOPEZ GORGÉ, J.; RECALDE, L. (1975). Metabolic changes in fruit and leaf during ripening in the olive. *Phytochemistry* 14: 1167-1169.

EMMONS, E. W.; FEDELI, E.; FIRESTONE. (1996). Olive Oil Introduction and History, in Bailey`s Industrial Oil and Fat Products, 5 th edn.; *vol. 2: Oils and Oilseeds*, edited by Y. H. Hui, A wiley- Interscience Publication, John Wiley & Sons, Inc., New York, pp.241-269.

FALDER-RIVERO, A. (2003). Enciclopedia de los alimentos: Aceite de oliva y aceituna de mesa. Revista “Distribución y Consumo”. Universidad Jaime I. ISSN 1132-0176, Año nº 13, Nº 72, 2003, pags. 87-107

FAO (1995). Fruit and vegetable processing, por M. Enachescu Dauthy. *FAO Agricultural Services Bulletin* No. 119. Roma.

FARAG, R. S.; EL BAROTY, G.; ABD EL AZIZ, N.; BASUNY, A. M. (1997). Stabilization of olive oil by microwave heating. *International Journal of Food Sciences and Nutrition.* 48 (6): 365- 371

FEDELI, E. (1993). Tecnología del Aceite de Oliva. *Olivae.* 45: 20-23.

FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J.; HEREDIA, A.; VIOQUE, B.; CASTELLANO, J. M.; GUILLÉN, R. (1997). Changes in cell-wall-degrading enzymes activities in stored olives in relation to respiration and ethylene production. Influence of exogenous ethylene. *Zeitung Lebensm. Unters. Forsch. A .* 204: 293-299

FERGUSON, L. (2006). Trends in Olive Harvesting. *Grasas y Aceites.* 57 (1): 9-15

FITO, M.; COVAS, M. I.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; VILA, J.; TORRENTS, J.; DE LA TORRE, C.; MARRUGAT, J. (2000). Protective effect of olive oil and its phenolic compounds against low density lipoprotein oxidation. *Lipids.* 35: 633-638.

FORCADELL, M. L.; COMAS, M.; MIQUEL, X.; de la TORRE, M. C. (1987). Determination de tyrosol et de l` hydroxy-tyrosol dans des huiles vierges d`olive. *Rev. Fr. Corps Gras.* 34: 547- 549

FOOTE, C. F.; CHANG, Y. C.; DENNY, R. W. (1970). Chemistry of singlet oxygen. Carotenoids quenching parallels biological protection. *J. Am. Chem. Soc.* 92: 5216-5219.

FRIAS, L.; GARCÍA-ORTIZ, A.; HERMOSO, M; JIMÍNEZ, A.; LLAVERO DEL POZO, M. P.; MORALES, J.; RUANO, T.; UCEDA, M. (1991). Analistas de laboratorio de almazara, *Informaciones Técnicas 6/91*, Junta de Andalucía, Sevilla. Spain. 107-114.

GARCÍA, J. M.; QUINTERO, L. C.; MANCHA, M. (1988). Oil bodies and lipid synthesis in developing soybean seeds. *Phytochemistry.* 27: 3083-3087.

GARCÍA, J. M. (1988). Biosíntesis y acumulación de lípidos de reserva en las plantas oleaginosas. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.

GARCÍA, J. M.; STREIF, J. (1991). The effect of Controlled Atmosphere Storage on Fruit and Oil Quality of Gordal Olives. *Revista Gartenbauwissenschaft.* 56: 233-238.

GARCÍA, J. M.; STREIF, J. (1993). Qualität und Haltbarkeit von Biren I. Einfluss von CA- and ULO- Lagerbedingungen. *Revista Gartenbauwissenschaft.* 58: 36- 41

GARCÍA, J. M.; MANCHA, M. (1992). Evolución de la Biosíntesis de Lípidos durante la Maduración de las Variedades de aceituna Picual y Gordal. *Grasas y Aceites.* 43: 277- 280.

GARCÍA, J. M. (1993a). "Efecto del CO₂ en la atmósfera de almacenamiento sobre la fisiología de la aceituna de molino". *Grasas y Aceites.* 44:81-84.

GARCÍA, J. M. (1993b). "Efecto del CO₂ en la atmósfera de almacenamiento del fruto sobre la calidad del aceite de oliva". *Grasas y Aceites.* 44: 169-174.

GARCÍA, J. M.; CASTELLANO, J. M.; PÉREZ-CAMINO, M. C. (1994a). "Quantitative determination of monoglycerides and diglycerides in virgin oils extracted from stored fruits". *Acta Horticulturae.* 356: 351-353.

GARCÍA, J. M.; GUTIÉRREZ, F.; CASTELLANO, J. M.; PERDIGUERO, S.; MORILLA, A.; ALBI, M. A. (1996a). Influence of Storage Temperature on Fruit Ripening and Olive Oil Quality. *J. Agri. Food Chem.* 44: 264-267.

GARCÍA, J. M.; GUTIÉRREZ, F.; BARRERA, M. J.; ALBI, M. A. (1996b). Storage of Mill Olives on an Industrial Scale. *J. Agric. Food Chem.* 44(2): 590-593,

GARCÍA, J. M.; SELLER, S.; PEREZ-CAMINO, M. C. (1996c). Influence of Fruit Repeping on Olive Oil Quality. *J. Agric. Food chem.* 44: 3516-3520.

GARCÍA, J. M.; YOUSFI, K.; MATEOS, R.; OLMO, M.; CERT, A. (2001). Reduction of Oil Bitterness by Heating of Olive (*Olea europaea*) Fruits. *J. Agric. Food Chem.* 49: 4231-4235.

GARCÍA, J. M.; YOUSFI, K. (2005). Non-destructive and objective methods for the evaluation of the maturation level of olive fruit. *Eur Food Res Technol.* 221: 538–541.

GARCÍA, J. M.; YOUSFI, K.; OLIVA, J.; GARCÍA-DIAZ, M. T.; PEREZ-CAMINO, M. C. (2005). Hot Water Dipping of Olives (*Olea europaea*) for Virgin Oil Debittering. *J. Agric. Food Chem.* 53: 8248-8252.

GARCÍA, J. M.; YOUSFI, K. (2006). The postharvest of mill olives. *Grasas y Aceites.* 57:(1) 16-24.

GARCÍA-OLMEDO, R.; VALLS-PALLES, C.; COLL-HELLIN, L. (1989). El aceite de oliva y los otros aceites comestibles. 1^{er} Simposium Nacional del Aceite de Oliva. *Expoliva-89*, Jaén.

GARIBOLDI, P.; JOMMI, G.; VEROTTA, L. (1986). Secoiridoids from *Olea europaea*. *Phytochemistry.* 25: 865-869.

GAZIT, S.; LEVY, Y. (1963). Astringency and removal in persimmons. *The Israel Journal of Agricultural Research.* 13: 125-132.

GAZIT, S.; ADATO, I. (1972). Effect of carbon dioxide atmosphere on the course of astringency disappearance of persimmon (*Diospyros kaki* Linn.) fruits. *J. Food Sci.* 37: 815-817.

GUTIÉRREZ, F. (1989). Determinación de la estabilidad oxidativa de aceites de oliva vírgenes: comparación entre el método del Oxígeno Activo (A.O.M.) y el método "Rancimat". *Grasas y Aceites.* 40: 1-5.

GUTIÉRREZ, F.; ALBI, M. A.; PALMA, R.; RIOS, J. J.; OLIAS, J. M. (1989). Bitter Taste of Virgin Olive Oil: Correlation of Sensory Evaluation and Instrumental HPLC Analysis. *Journal of Food Science.* 54: 68-70.

GUTIÉRREZ, F.; PERDIGUERO, S.; GUTIÉRREZ, R.; OLIAS, J. M. (1992). Evaluation of the Bitter Taste in Virgin Olive Oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69: 394-395.

GUTIÉRREZ, F.; PERDIGUERO, S.; GARCÍA, J. M.; CASTELLANO, J. M. (1992). Quality of Oils from Olives Stored Under Controlled Atmosphere. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69: 1215-1218.

GUTIÉRREZ, F.; JIMÉNEZ, B.; RUÍZ, A.; ALBI, M. A. (1999). Effect of Olive Ripeness on the Oxidative Stability of Virgin Olive Oil Extracted from the Varieties Picual and Hojiblanca and on the Different Components Involved. *J. Agric. Food Chem.* 47: 121-127.

GUTIÉRREZ-ROSALES, F.; RÍOS, J. J.; GÓMEZ-REY, M. L. (2003). Main Polyphenols in the Bitter Taste of Virgin Olive Oil. Structural Confirmation by On-line High Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 51: 6021-6025.

HARA, A.; RADIN, N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal. Biochem.* 90: 420-426.

HARBORNE, J. B. (1989). General procedures and measurement of total phenolics. In P. M. Dey & J. B. Harborne (Eds.), *Methods in plant phenolics* (pp. 2- 9). London: Academic Press.

HERMOSO, M.; UCEDA, M.; FRIAS, L.; BELTRAN, G. (1998). Maduración. En «El cultivo del olivo», 2ª Ed. Barranco, D.; Fernández-Escobar y Rallo, L. Junta de Andalucía. Conserjería de Agricultura y pesca. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. España. pp. 145-161.

INTERNATION UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC) (1992). Método 2.432 para la determinación de tocoferoles en aceites vegetales por cromatografía líquida de alta eficacia, Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives, 1st Supplement to 7th edition , Pergamon Press, Oxford,UK.

INTERNATION UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC) (1992). Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 7th Rev. edn., 1st Suppl., Blackwell, Oxford, UK.

JIMÉNEZ-CUESTA, M.; CUQUERELLA, J.; MARTÍNEZ-JAVEGA, J. M. (1981). Determination of a color index for citrus degreening. *Proc. Int. Soc. Citriculture. 2:* 750-753.

JIMÉNEZ, J.; RONDÓN, D.; MARTINEZ, L.; MATAIX, J. (2001). Composición química de los aceites de oliva. En aceite de oliva virgen: Nuestro patrimonio alimentario, Ed. Universidad de Granada - Puleva Food. pp. 115-136.

KADER, A.; NANOS, G. D.; KERBEL, E. L. (1989). Responses of ‘Manzanillo’ olives to controlled atmosphere storage, *Proceedings of the 5th international controlled atmosphere research conference 2*, Washington State University, Wenatchee, WA. pp. 119–125.

KIRITSAKIS, A.; MARKAKIS, P. (1987). Olive Oil: A Review. *Advances in Food Research.* Academic Press. 31: 453- 482.

KIRITSAKIS, A. K. (1991). Olive Oil. *American Oil Chemists Society.* Champaign, Illinois. 192 pp.

KIRITSAKIS, A. K. (1998). Flavor Components of Olive Oil. A Review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75: 673- 681.

LANG, G. A.; MARTIN, G. C. (1989). Olive organ abscisión: Fruit and leaf response to applied ethylene. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 114: 134-138.

LAÜBLI, M.; BRUTTEL, P. A. (1986). Determination of the oxidative stability of fats and oils: comparison between the Active Oxygen method and the Rancimat method. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 63: 792-795.

LAVEE, S.; WODNER, M. (1991). Factors affecting the nature of oil accumulation in fruit of olive (*Olea europaea* L.) Cultivars. *Journal of Horticultural Science.* 66: 583-591.

LAVEE, S. (2006). Biennial bearing in olive (*Olea europaea* L.). *Oleae.* 25: 5-13.

LEÓN-CAMACHO, M.; CERT, A. (1994). Recomendaciones para la aplicación de algunos métodos analíticos incluidos en el Reglamento CEE 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de orujo de oliva. *Grasas y Aceites.* 47: 395-401.

LEONE, A. M.; VITAGLIANO, M. (1975). Estudio sobre la composición del aceite de oliva en función del medio, de la variedad y de la época de recolección de las aceitunas. *Grasas y Aceites*. 26(1): 40.

LUACES, P.; PÉREZ, A. G.; GARCÍA, J. M.; SANZ, C. (2005). Effects of heat-treatments of olive fruit on pigment composition of virgin olive oil. *Food Chemistry*. 90: 169-174.

LUCHSINGER, L. E.; WALSH, C. S. (1998). Development of an objective and non-destructive harvest maturity index for peaches and nectarines. *Acta Horticulturae*. 465: 679-687.

LUXIA, A. S.; MONICA, S.; ORNELLA, C.; PLIZZALA, B.; LAURA, R.; LIVIA, B.; ANIO, M.; ENNIO, P. (1996). Effect of Beta-carotene on cell cycle progression of human fibroblasts. *Mutagenesis*, 17: 2395-2401.

MAESTRO-DURÁN, R.; BORJA PADILLA, R. (1990). La Calidad del Aceite de Oliva en relación con la composición y maduración de la aceituna. *Grasas y Aceites*. 41: 171-178.

MAESTRO-DURÁN, R.; LÉON-CABELLO, M. R.; RUIZ-GUTIÉRREZ, V. (1993). Los compuestos fenólicos en la autodefensa de los vegetales. *Grasas y Aceites*. 44: 365-369.

MARTIN, G. C. (1994). Mechanical olive Harvest: use of fruit loosening agents. *Acta Horticulturae*. 356: 284-291.

MARTÍNEZ-MORENO, J. M.; PEREDA, J.; GÓMEZ-HERRERA, C.; JANER DEL VALLE, C. (1964). Estudios físico-químicos sobre las pastas de aceituna molidas. XX. Viscosidades de los alpechines. *Grasas y Aceites* 15: 226-232.

MARTÍNEZ, J. M.; MUÑOZ, E.; ALBA, J. M.; LANZÓN, A. (1975). Informe sobre la utilización del analizador de rendimientos "Abencor". *Grasas y Aceites* 26, 379- 385.

MATAIX-VERDÚ, F. J.; MARTINEZ DE VICTORIA, E. (1988). El aceite de Oliva (Bases para el futuro). Edit. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca, Sevilla, 127 pp.

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 oil by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode-array ultraviolet detection. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2185-2192.

MATEOS, R. (2002). Caracterización de componentes fenólicos del aceite de oliva y su relación con la estabilidad oxidativa y el amargor. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

MATEOS, R.; DOMINGUEZ, M. M.; ESPARTERO, J. L.; CERT, A. (2003). Antioxidant effect of phenolic compounds, R-tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7170-7175.

MATEOS, R.; CERT, A.; PÉREZ-CAMINO, M. C.; GARCÍA, J. M. (2004). Evaluation of Virgin Olive Oil Bitterness by Quantification of Secoiridoid Derivatives. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81: 71-75.

MATSUO, T.; SHINOHARA, J. E.; E ITO, S. (1976). An improvement on removing astringency in persimmon fruits by carbon dioxide gas. *Agr. Biol. Chem.* 40: 215-220.

MATSUO, T.; E ITO, S. (1982). A model experiment for the astringency of persimmon fruit with high carbon dioxide treatment: in vitro gelation of kaki-tanin by reacting with acetaldehyde. *Agric. Biol. Chem.* 46: 683-689.

MAXIE, E. C.; CATLIN, P. B.; HARTMANN, H. T. (1960). Respiration and ripening of olive fruits. *Proceedings of the American Society for Horticultural Science* 75: 275-291.

MERCADO-SILVA, E.; BENITO-BAUTISTA, P.; GARCÍA-VELASCO, M. A. (1998). Fruit development, Harvest index and ripening changes of guavas produced in central Mexico. *Postharvest Biology and Technology*. 13: 143-150.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; CANDUL-ROJAS, B.; GARRIDO-FERNÁNDEZ, J.; GALLARDO-GERRERO, L. (1990). Pigments present in virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 67: 192-196.

MÍNGUEZ-MOSQUERA, M. I.; CANDUL-ROJAS, B.; GALLARDO-GERRERO, L. (1994). Measurement of chlorophyllase activity in olive fruit (*Olea europaea* L.). *Journal of biochemistry*. 116: 263-268.

MICKELBART, M. V.; DALE, JAMES (2003). Development of a dry matter maturity index for olive (*Olea europaea*). Short communication. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*. 31: 269-276.

MONTEDORO, G.; BERTUCCIOLI, M.; ANICHINI, F. (1978). Aroma analysis of virgin olive oil by headspace volatiles extraction techniques. En: Flavour of foods and beverages. Charalampous, G. and Inglet, G. Eds. Academic Press. New York. 247-281.

MONTEDORO, G. F.; GAROFOLO, L. (1984). The qualitative characteristics of virgin olive oil .The influence of variables such as variety, environment, preservation, conditioning of the finished product. *Riv. Ital. Sost. Grasse*. 61: 157-168.

MONTEDORO, G.; SERVILI, M.; BALDIOLI, B.; MINIATI, E. (1992a). Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 1 Their Extraction, Separation, and Quantitative and Semiquantitative Evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1571-1576.

MONTEDORO, G.; SERVILI, M.; BALDIOLI, B.; MINIATI, E. (1992b). Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 2 Initial characterization of the Hydrolyzable Fraction. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1577-1580.

MONTEDORO, G. F.; SERVILI, M. (1992). Tradizione ed innovazioni tecnologiche nell'estrazione degli olii extravergini di oliva. *Proceeding of the International Congress "Olive Oil Quality"*, Firenze (Italy) 1-3 December 1992, pp. 97-108.

MONTEDORO, G.; SERVILI, M.; BALDIOLI, B.; SELVAGGINI, R.; MINIATI, E.; MACCHIONI, A. (1993). Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil.3. Spectroscopic Characterizations of the secoiridoid Derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 41: 2228-2234.

MORELLO, J. R.; VUORELA, S.; ROMERO, M. P.; MOTILVA, M. J.; HEINONE, M. (2005). Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the Arbequina cultivar. *J. Agric. Food Chem.* 53: 2002-2008.

MOTILVA, M. J.; ROMERO, M. P.; ALEGRE, S.; GIRONA, J. (1999). Effect of regulated deficit irrigation in olive oil production and quality. *Acta Horticulturae* 474: 377–380.

MOTILVA, M. J.; TOVAR, M. J.; ROMERO, M. P.; ALEGRE, S.; GIRONA, J. G. (2000). Influence of regulated deficit irrigation strategies applied to olive trees (Arbequina cultivar) on oil yield and oil composition during the fruit ripening period. *J. Sci. Food Agric.* 80: 2037-2043.

MURAMATSU, N.; KIYOHIDE, K.; TATSUSHI, O. (1996a). Relationship between texture and cell wall polysaccharides of fruit flesh in various species of citrus. *HortScience.* 31(1): 114-116.

NANOS G. D.; KIRITSAKIS A. K.; SFAKIOTAKIS, E. M. (2002). Preprocessing storage conditions for green *Conservolea* and *Chondrolia* table olives. *Postharvest Biology and Technology.* 25(1): 109-116.

NERGIZ, C.; ÜÑAL, K. (1991a). Effect of method of extraction on the total polyphenol, 1,2-diphenol content and stability of virgin olive oil. *J. Sci. Food Agric.* 56: 79-84.

NERGIZ, C.; ÜÑAL, K. (1991b). Determination of phenolic acids in virgin olive oil. *Food Chem.* 39: 237-240.

OLÍAS-JIMÉNEZ, J. M.; GUTIÉRREZ-ROSALES, F.; DOBARGANES, M. C. (1980). Componentes volátiles en el aroma del aceite de oliva. IV. Su evolución e influencia en el aroma durante el proceso de maduración de los frutos en las variedades ‘picual’ y ‘hojiblanca’. *Grasas y Aceites.* 31: 91-96.

OLMO, M.; NADAS, A.; GARCÍA, J. M. (2000). Nondestructive Methods to Evaluate Maturity Level of Oranges. *Journal of Food Science.* 65(2): 365-369.

ORTEGA, D.; BELTRÁN, G.; UCEDA, M. (2001). Influencia del riego en la lipogénesis del cv “Arbequina”. In: *Proceedings on the Symposium Científico-tecnico Expoliva 2001*, Jaén, pp 63–71

OWEN, R. W.; MIER, W.; GIACOSA, A.; HULL, W. E.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. (2000). Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical toxicology.* 38: 647-659.

PANNELLI, G.; SERVILI, M.; SELVAGGINI, M.; BALDIOLI, M.; MONTEDORO, G. (1994). Effect of agronomic and seasonal factor on olive (*Olea europaea* L.) production and on the qualitative characteristics of the oil. *Acta Horticulturae*. 356: 239-243.

PARR, A. J.; BOLWELL, G. P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.* 80: 985-1012.

PATUMI, M.; D' ANDRIA, R.; FONTANAZZA, G.; MORELLI, G.; GIORIO, P.; SORRENTINO, G. (1999). Yield and oil quality of intensively trained trees of three cultivars of olive (*Olea europaea* L.) under different irrigation regimes. *J. Hort. Science & Biotech.* 74: 729-737.

PÉREZ, A. G.; OLÍAS, R.; ESPADA, J.; OLÍAS, J. M.; SANZ, C. (1997). Rapid determination of sugars, non-volatiles acids, and ascorbic acid in strawberry and other fruits. *J. Agric. Food Chem.* 45: 3545- 3549.

PÉREZ-CAMINO, M. C.; GARCÍA, J. M.; CASTELLANO, J. M. (1992). Polar compound concentrations in virgin oils from stored cultivar 'Picual' olive fruits. *J. Agric. Food Chem.* 40: 2260- 2262

PEREZ-CAMINO, M. C.; CERT, A. (1999). Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils. *J. Agric. Food Chem.* 47: 1558- 1562.

PÉREZ-RUBIO, A. G.; GARCIA, J. M.; SANZ, C. (2004). Tratamientos postcosecha de la aceituna y calidad del aceite de oliva virgen. *Horticom. News* 13-10. 2004

PERRIN, J. L. (1992). Les composés mineurs et les antioxygènes naturels de l'olive et de son huile. *Riv. Franc. Corps Gras.* 39: 25-29.

PORRAS, A. (1997). Capítulo 13 En: El cultivo del olivo. Ed. Barranco, D.; Fernández Escobar, R.; Rallo, L. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. España. 1997. pp. 339-363.

RAGAZZI, E.; VERONESE, G. (1973). Indagine sui componenti fenolici degli oli di oliva. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 50: 443-452.

RAGAZZINI, D. (1985). El kaki. Mundi-Prensa. Madrid. España. 176 pp

RALLO, L.; CUEVAS, J. (2004). Capítulo 5: Fructificación y Producción. En: El cultivo del olivo. Ed. Barranco, D; Fernández Escobar, R; Rallo, L. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Ed. Mundi-Prensa. España, pp. 125-158.

RANALLI, A.; DE MATTIA, G.; FERRANTE, M. L.; GIANANTE, L. (1997). Incidence of olive cultivation area on the analytical characteristics of the oil. Note 1. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 74: 501-508.

RANALLI, A.; TOMBESI, A.; FERRANTE, M. L.; DE MATTIA, G. (1998). Respiratory rate of olive drupes during their ripening cycle and quality of oil extracted. *Journal of Science and Food in Agriculture*. 77: 359-367.

ROGER-AMAT, S. (1988). Defectos y alteraciones de los frutos Cítricos en su comercialización. "Su identificación, causas y control". Ed. *Comité de gestión para la exportación de frutos cítricos*. 153 pp.

ROTONDI, A.; BENDINI, A.; CERRETANI, L.; MARI, M.; LERCKER, G.; TOSCHI, T. G. (2004). Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of Cv. Nostrana di Brisighella extra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3649-3654.

ROY, S. K.; KHURDIYA, D. S.; WASKAR, D. P. (1995). Other Subtropical Fruits. En "Handbook of Fruit Science and Technology". Editado por: Salunkhe, D. K. y Kadam, S. S. *Marcel Dekker Inc.* New York. USA, pp. 539-561.

RUGINI, E.; BONGI, G.; FONTANAZZA, G. (1982). Effects of ethephon on olive ripening. *J. Am. Soc. Am. Hortic. Sci.* 107: 835-838.

SACCHI, R.; DELLA MEDAGLIA, D.; MUSSO SPAGNA, S.; ADDEO, F. (1995). Effetto della filtrazione sulla composizione polifenolica degli oli vergini di oliva. *Atti del 2° Congresso nazionale di chimica degli alimenti*. Giardini Naxos. May 24-27. 515.

SACCHI, R.; PATUMI, M.; FONTANAZZA, G.; BARONE, P.; FIORDIPONTI, P.; MANNINA, L.; ROSSI, E.; SEGRE, A. L. (1996). A High-Field 1H Nuclear Magnetic Resonance study of the minor components in virgin olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73: 747-758.

SALVADOR, M. D.; ARANDA, F.; GOMEZ-ALONSO, S.; FREGAPANE, G. (2001). Cornicabra virgin olive oil: A study of five crop seasons. *Food Chem.* 73: 45-53.

SCHÄFER-SCHUCHARDT, H. (1996). Capítulo 1: Evolución e historia. En: Enciclopedia mundial del olivo. Consejo Oleícola Internacional. Plaza y Janes Editores S.A. Barcelona. España, pp. 21-26.

SCHULTZ, J. M.; HERRMAN, K. (1980). Analysis of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in plant material. *J. Chromatogr.* 195: 95-104.

SCIANCELEPORE, V. (1985). Enzymatic browning in five olive varieties. *J. Food Sci.* 50: 1194-1195.

SERVILI, M.; BALDIOLI, M.; SELVAGGINI, R.; MARIOTTI, F.; FEDERICI, F.; MONTEDORO, G. F. (1998). Effect of malaxation under N₂ flush on phenolic and volatile compounds of virgin olive oil. *13th International Symposium on Plant Lipids*, Siviglia (Spain). 307-310

SERVILI, M.; BALDIOLI, M.; MARIOTTI, F.; MONTEDORO, G. F. (1999). Phenolic composition of olive fruit and virgin olive oil: distribution in the constitutive parts of fruit and evolution during oil mechanical extraction process. *Acta Horticulturae*. 474: 609- 619.

SHIMOMURA, M.; KATAOKA, T.; FURUKAWA, Y.; YUKINAGA, H. Y SUGIURA, A. (1990). Enhancement of efficiency of CO₂ - Deastringency by ethanol addition and temperature control in persimmon fruits. *Proceedings of XXIII. International Horticultural Congress*. Firenze (Italy). August 27-September 1, pp. 3313.

SKEVIN, D.; RADE, D.; STRUCELJ, D.; MOKROVCAK, Z.; NEDERAL, S.; BENCIC, D. (2003). The influence of variety and harvest time on the bitterness and phenolic compounds of olive oil. *Eur. J. Food Res. Technol.* 105: 536–541.

SMITH, T. J. (2000). Squalene: potencial chemopreventive agent. *Expert. Opin. Investig. Drugs.* 9: 1841- 1848.

SODA, I.; HASEGAWA, T.; SUZUKI, T. (1987). Changes in hemicellulose during after ripening of kiwi fruit. *J. Agr. Sci.* 31: 261-264.

SOLINAS, M.; CICHELLI, A. (1982). Il dosaggio per GLC-HPLC delle sostanze fenoliche dell'olio di oliva: ruolo ipotetico del tirosolo nell'accertamento della quantità di olio vergine nelle miscele con i rettificati. *Riv. Ital. Sci. Alim.* 11: 22- 30.

SOLINAS, M. (1990). Caratteristiche analitiche degli vergini di oliva e marchio di qualità. *L'informatore Agrario.* 47: 19-25.

SPENCER, C. M.; CAI, Y.; RUSSEL, M.; GAFFNEY, S. H.; GOULDING, P.; MAGNOLATO, D.; LILLEY, T. H.; HASLAM, E. (1998). Polyphenol complexation: Some thoughts and observation. *Phytochemistry.* 27: 2397-2409.

SRINIVASAN, C.; IAH, D. P. R.; SHANMUGAVELU, K. G.; RAO, V. N. M. (1974). Effect of ethephon (2-chloroethylphosphonic acid) on the ripening of persimmons (*Diospyros* sp.). *Indian J. of Hort.* 31: 47-53.

THE COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. (1991). Regulation No.2568/91. On the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. *Official Journal of the European Communities.* No. L248.

TISCORNIA, E.; FORINA, M. y EVANGELISTI, F. (1982). Composizione chimica dell'olio di oliva e sue variazioni indotte dal processo di rettificazione. *Riv. Ital. Sost. Grasse,* 59: 519-556.

TRAPERO, A.; BLANCO, A. M. (1997). Capítulo 16 En: El cultivo del olivo. Ed. Barranco, D.; Fernández Escobar, R.; Rallo, L. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. España. pp. 463-507.

TSIMIDOU, M.; PAPADOPOULOS, G.; BOSKOU, D. (1992). Determination of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil by reversed-phase HPLC With emphasis on UV detection. *Food Chemistry,* 44 Analytical Methods Section, pp. 53-60.

TOUS, J.; ROMERO, A. (1993). Variedades de Olivo. Ed. Fundación la Caixa, Barcelona, 172 pp.

TOVAR, M. J.; ROMERO, M. P.; MOTILVA, M. J. (2001). Changes in the phenolic composition of olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under linear irrigation strategies. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5502-5508.

TOVAR, M. J.; ROMERO, M. P.; GIRONA, L.; MOTILVA, M. J. (2002). L-Phenylalanine ammonia-lyase activity and concentration of phenolics in developing olive (*Olea europaea* L cv Arbequina) fruit grown under different irrigation regimes. *J. Sci. Food Agric.* 82: 892- 898.

TUSET, J. J.; HINAREJOS, C.; MIRA, J. L.; MARTÍNEZ-JÁVEGA, J. M. (1996). Tratamientos térmicos a los frutos cítricos para el control de las enfermedades de la post-recolección. *Levante Agrícola.* 337: 342-347.

UCCELLA, N. (2001). Olive biophenols: novel ethnic and technological approach, *Trends in Food Science and Technology.* 11: 328–339.

UCEDA, M.; FRÍAS, L. (1975). Proceeding of II Seminario Oleícola Internacional; *International Olive-Oil Council:* Córdoba, Spain.

UCEDA, M.; HERMOSO, M. (1998) Capítulo 18, *La Calidad del Aceite En: El cultivo del olivo.* Ed. Barranco, D.; Fernández Escobar, R.; Rallo, L. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Ediciones Mundi Prensa. Madrid. España. pp. 548-571.

VAN-BRUGGEN, P. C.; QUADT, J. F. A.; L'HERMINEZ, P. C.; VANDEGINSTE, B. G. M. (1995). Robust Sensory Evaluation of Olive Oil by a non- Parametric Scoring System. *J. Sci. Food Agric.* 67: 53-59.

VÁZQUEZ-RONCERO, A.; MAESTRO DURÁN, R.; GRACIANI CONSTANTE, E. (1971). Cambios en los polifenoles de la aceituna durante la maduración. *Grasas y Aceites.* 22: 366-370.

VÁZQUEZ-RONCERO, A.; GRACIANI, E. y MAESTRO-DURÁN, R. (1974). Componentes fenólicos de la aceituna. I. Polifenoles de la pulpa. *Grasas y Aceites.* 25: 269-274.

VAZQUEZ-RONCERO, A.; JANER, C.; JANER, M. L. (1975). Polifenoles naturales y estabilidad del aceite de oliva. *Grasas y Aceites.* 26: 14-18.

VÁZQUEZ-RONCERO, A. (1978). Evolución de los polifenoles durante el aderezo de aceitunas verdes. II. Cambios en los polifenoles totales. *Grasas y aceites.* 29: 23-27.

VIERHUIS, E.; SERVILI, M.; BALDIOLI, M.; SCHOLS, S. H.; VORAGEN, A. G.; MONTEDORO, G. F. (2001). Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds and polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 49: 1218-1223.

VIOQUE, A.; ALBI, M. A. (1975). Elementos Trazas y Abscisión de la Aceituna. *Grasas y Aceites.* 26(2): 73-78.

VLAHOV, G. (1976). Organic acids of olives: malic acid/citric acid ratio as a maturation index. *Ann. Ist Sper. Elaiot.* 6: 93-110.

WILLS, R.; McGLASSON, B.; GRAHAM, D.; JOYCE, D. (1998). Postharvest: An introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals, 4 th Edition. *CAB international Adelaide*, South Australia, 257 pp.

WOSKOW, M.; MAXIE, E. C. (1965). Cold storage studies with olives. In *The Annual Technical Report of the California Olive Association*; California Olive Association: Davis, CA. pp: 6-11.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M. T.; NEWMARK, H. L. (2001). Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu. Rev. Nutr.* 21(1): 381-406.

YOUSFI, K.; CERT, R. M.; GARCÍA, J. M. (2006). Changes in quality and phenolic compounds of virgin olive oils during objectively described fruit maturation. *Eur. Food Res. Technol.* 223: 117-124.

ZARROUK, M.; MARZOUK, B.; BEN MILED, DAUD, D.; CHERIF, A. (1996). Acumulación de la materia grasa del olivo y efecto del suelo en su composición. *Olivae* 61: 41-45.