



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

**CONTRIBUCIÓN DE LOS
COMPUESTOS VOLÁTILES,
COMPUESTOS FENÓLICOS,
ÉSTERES ETÍLICOS Y
DIACILGLICEROLES A LAS
PROPIEDADES
ORGANOLÉPTICAS DEL ACEITE
DE OLIVA VIRGEN**

Alumno: Natalia Medina Morales

Directores: Dra. Dña. María Luisa Fernández de
Córdova y Dr. D. Eulogio Llorent
Martínez

Dpto.: Química Física y Analítica

Jaén a 18 de junio de 2022



Dra.Dña María Luisa Fernández de Córdoba y Dr. D. Eulogio Llorent Martínez como **Directores** de D^a Natalia Medina Morales, en el Máster Universitario en Olivar y Aceite de Oliva, durante el curso 2021-2022.

INFORMA: Que el presente trabajo fin de máster, *“CONTRIBUCIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES, COMPUESTOS FENÓLICOS, ÉSTERES ETÍLICOS Y DIACILGLICEROLES A LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN ”* ha sido realizado por D./D^a. Natalia Medina Morales, para la obtención del Título de Máster Universitario en Olivar y Aceite de Oliva por la Universidad de Jaén, bajo la dirección de la Dra. Dña. María Luisa Fernández de Córdoba y Dr. D. Eulogio Llorent Martínez.

Jaén, a 18 de junio de 2022

Fdo.: Alumno/a

MEDINA
MORALES
NATALIA -
77373747E

Firmado
digitalmente por
MEDINA MORALES
NATALIA -
77373747E
Fecha: 2022.06.19
14:55:16 +02'00'

INDICE

RESUMEN	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN.....	8
1.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ACEITES DE OLIVA VIRGEN.....	8
1.2. CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.....	10
1.3. COMPUESTOS VOLÁTILES	14
1.3.1. Formación de compuestos fenólicos	14
1.3.1. Métodos de Análisis	19
1.3.1.1. Técnicas de Extracción	19
1.3.1.2. Técnicas de Análisis	22
1.4. COMPUESTOS FENÓLICOS	24
1.4.1. Oleocantal	26
1.4.2. Oleuropeína	27
1.4.3. Formación de los compuestos fenólicos.....	27
1.4.4. Contenido Fenólico total.....	29
1.4.5. K ₂₃₂	29
1.4.6. Técnicas de Extracción	30
1.4.7. Técnicas de análisis	31
1.5. ÉSTERES ETÍLICOS.....	32
1.5.1. Formación de los ésteres etílicos	32
1.5.2. Métodos de análisis	33
1.6. DIACILGLICEROLES.....	33
1.6.1. Formación de diacilglicerole	34
1.6.2. Métodos de análisis	35
2. OBJETIVOS	35
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
3.1. COMPUESTOS VOLÁTILES COMO MARCADORES DE LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.....	36
3.2. CONTRIBUCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS A LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.....	46
3.3. RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE ÉSTERES ETÍLICOS Y LA CALIDAD SENSORIAL DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.	48
3.4. RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO EN DIACILGLICEROLES Y LA CALIDAD SENSORIAL DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.	50
4. CONCLUSIONES	50
5. BIBLIOGRAFÍA.....	52

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Clasificación de los aceites de oliva virgen	9
Tabla 2.	Principales compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen	26
Tabla 3.	Compuestos volátiles encontrados en los aceite de oliva virgen, su OAV y su aroma	41
Tabla 4.	Relación de compuestos volátiles con atributos positivos.....	44
Tabla 5.	Relación de compuestos volátiles con atributos negativos.....	45
Tabla 6.	Relación entre defectos organolépticos y concentración de ésteres etílicos.....	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Características organolépticas del aceite de oliva virgen.....	11
Figura 2.	Árbol de decisión para la comprobación de la conformidad de las características de calidad de muestra de aceite de oliva virgen extra.....	13
Figura 3.	Biogénesis de los compuestos volátiles en el aceite de oliva virgen.....	15
Figura 4.	Ruta de la lipoxigenasa.....	18
Figura 5.	Esquema de la técnica Espacio Dinámico de Cabeza.....	20
Figura 6.	Esquema de la técnica Espacio de Cabeza Estático.....	21
Figura 7.	Técnica Cromatografía de Gases-Olfatometría.....	23
Figura 8.	Estructura química del fenol.....	25
Figura 9.	Rutas implicadas en la formación de compuestos fenólicos.....	28
Figura 10.	Esquema de la técnica Extracción en Fase Sólida.....	31
Figura 11.	Estructura química de 1,2- y 1,3-Diacilglicéridos.....	33
Figura 12.	Ruta de Kennedy.....	34
Figura 13.	Perfiles de compuestos volátiles en aceite de oliva virgen con defecto sensoriales.....	37

RESUMEN

Entre los productos alimenticios, el aceite de oliva virgen posee una metodología estandarizada para su clasificación comercial la cual está basada en atributos sensoriales. La evaluación sensorial junto con varios parámetros químicos, regulados oficialmente por la Legislación Europea, se utiliza para catalogar los aceites de oliva virgen en las subcategorías comerciales siguientes: aceite de oliva virgen extra, aceite de oliva virgen, y aceite de oliva lampante. La valoración organoléptica de los aceites de oliva virgen, es decir, la determinación de sus atributos sensoriales positivos y negativos (defectos), es clave para clasificar un aceite en su categoría correspondiente. Estos atributos vienen determinados obviamente por su composición química, tanto cualitativa como cuantitativa. Por tanto, es estrictamente necesario mantener la composición química que tiene el aceite en el propio fruto y controlar todos aquellos factores que puedan modificarla a lo largo del proceso de elaboración del aceite de oliva virgen a fin de continuar mejorando su calidad, sabor y aroma.

Los componentes volátiles del aceite de oliva virgen son los encargados de los olores agradables o desagradables que se perciben con la nariz o con la boca, es decir, de su aroma y flavor. Por otra parte, los compuestos fenólicos, que se encuentran en el aceite de oliva virgen y no en otros aceites, lo hacen un producto único y, dependiendo de su concentración, son responsables de su sabor amargo y picante. Otros compuestos, como los ésteres etílicos y diacilglicerolés están relacionados con procesos de degradación fermentativa que se producen en el aceite de oliva virgen y que alteran sus propiedades organolépticas.

En el presente trabajo, se ha llevado a cabo una revisión de la relación existente entre todos estos compuestos y las propiedades organolépticas del aceite de oliva virgen, concretando en la identificación de los compuestos responsables de cada atributo sensorial. Se han revisado, además, sus procesos de formación, y las técnicas utilizadas para su extracción y posterior análisis cualitativo y cuantitativo, pieza clave para la caracterización de los aceites de oliva virgen.

ABSTRACT

Among food products, virgin olive oil is the only one that has a standardized methodology for its commercial classification that is based on sensory attributes. Organoleptic assessment together with various chemical parameters, officially regulated by European legislation, is used to classify virgin olive oils into the following commercial subcategories: extra virgin olive oil, virgin olive oil, and lampante olive oil. The organoleptic assessment of virgin olive oil, that is, the determination of its positive and negative sensory attributes (defects), is therefore key when classifying an oil in the corresponding category. These attributes are obviously determined by their chemical composition, both qualitative and quantitative. Therefore, it is strictly necessary to maintain the chemical composition of the oil in the fruit itself and to control all those factors that may modify it throughout the virgin olive oil production process in order to continue improving its quality, flavor and aroma.

The volatile components of virgin olive oil are responsible for the pleasant or unpleasant odors that are perceived by the nose or mouth, that is, its aroma and flavor. On the other hand, the phenolic compounds, which are found in virgin olive oil and not in other oils, make it a unique product and, depending on their concentration, are responsible for its bitter and pungent taste. Other compounds, such as ethyl esters and diacylglycerols, are related to fermentative degradation processes that occur in virgin olive oil and that alter its organoleptic properties.

In the present work, a review of the relationship between all these compounds and the organoleptic properties of virgin olive oil has been carried out, specifying the identification of the compounds responsible for each sensory attribute. In addition, their formation processes and the techniques used for their extraction and subsequent qualitative and quantitative analysis, a key piece for the characterization of virgin olive oils, have been reviewed.

1. INTRODUCCIÓN

Los aceites de oliva virgen son aquellos que han sido obtenidos a base del fruto del olivo (*Olea europaea* L.) exclusivamente por procedimientos mecánicos u otros medios físicos cuyas condiciones no produzcan alteraciones en el aceite y que no hayan sufrido otro tratamiento distinto al del lavado, decantación, centrifugación y filtración (IOOC, 2021).

1.1. CLASIFICACIÓN DE LOS ACEITES DE OLIVA VIRGEN

De acuerdo con la Norma Comercial del Consejo Oleícola Internacional (IOOC) las categorías de aceite de oliva virgen son: *aceite de oliva virgen extra* (AOVE), *aceite de oliva virgen* (AOV), *aceite de oliva virgen corriente* y *aceite de oliva virgen lampante* (IOOC, 2021). El AOVE es el aceite de mayor calidad, que no presenta ningún tipo de defecto organoléptico. Por otro lado, el AOV posee defectos organolépticos aunque de baja intensidad, lo que provoca que presente una clase inferior al AOVE. El *aceite de oliva virgen corriente* es una categoría comercial que sólo se reconoce de acuerdo con la legislación del país en cuestión, y que presenta una calidad inferior debido a su elevada acidez. Por último, existe una categoría de *aceite de oliva virgen lampante*, que es considerado como aceite no apto para el consumo humano debido a que debe someterse a una refinación previa a su consumo.

En la Unión Europea no se reconoce la categoría comercial *aceite de oliva virgen corriente*, estando incluida en el denominado *aceite de oliva lampante* (EC, 2019). Además de la evaluación organoléptica, los aceites de oliva virgen se catalogan en diferentes categorías comerciales en función de los siguientes parámetros químico-físicos: acidez, índice de peróxidos, absorción en ultravioleta (K_{270}/K_{268} , K_{232} y ΔK) y ésteres etílicos. En la tabla 1 se muestran las distintas categorías comerciales de aceites de oliva virgen en función de los parámetros anteriores.

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LOS ACEITES DE OLIVA VIRGEN

Categoría	Acidez	Índice de Peróxidos (meq O₂ activo/Kg)	Absorbancia UV	Mediana de defectos	Mediana de frutado	Ésteres etílicos (mg/kg)
Aceite de Oliva Virgen Extra	≤ 0,80	≤ 20,0	K ₂₃₂ ≤ 2,50 K ₂₇₀ ≤ 0,22 ΔK ≤ 0,01	≤ 0,0	> 0,0	≤ 35
Aceite de Oliva Virgen	≤ 2,0	≤ 20,0	K ₂₃₂ ≤ 2,60 K ₂₇₀ ≤ 0,25 ΔK ≤ 0,01	≤ 3,5	> 0,0	
Aceite de Oliva Lampante	> 2,0				> 3,5	

Fuente: Elaboración propia con datos proporcionados por el IOOC

1.2. CALIDAD DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

La calidad es un concepto difuminado; según la norma UNE-EN ISO 9000:2015 la calidad de un producto es definida como aquella por la que se satisface a los clientes, tanto por el impacto previsto, como no el no previsto sobre las partes interesadas pertinentes (ISO 9000, 2015). Refiriéndose a la calidad del aceite de oliva virgen, vendrá representada por un zumo oleoso obtenido a partir de aceitunas sanas y en su punto óptimo de madurez, evitando la mala manipulación o tratamientos que alteren la naturaleza química de sus componentes, tanto en la extracción como en el trascurso de su almacenamiento (Jiménez-Herrera *et al.*, 2008). Como se ha expuesto anteriormente, las características de calidad de los aceites de oliva virgen incluidas en la Normativa Europea (EC, 2019) incluyen la evaluación organoléptica y parámetros físico-químicos (tabla 1).

La evaluación organoléptica se lleva a cabo por un equipo de catadores preseleccionados y entrenados (panel de cata), valorándose la intensidad de los defectos (atributos negativos) y del frutado (atributo positivo). Existe una elevada cantidad de atributos negativos o defectos, relacionándose a continuación los más comunes:

- Atrojado: es un flavor propio del aceite que se obtiene de aceitunas acumuladas, las cuales han soportado un avanzado grado de fermentación anaeróbica.
- Avinado: flavor característico de algunos aceites que recuerdan al vino. Esa sensación es debida a aceitunas las cuales han sufrido un proceso fermentativo, dando lugar a la formación de ácido acético.
- Rancio: flavor procedentes de los aceites que han soportado un proceso oxidativo.
- Metálico: flavor que recuerda a metales, siendo propio de aquel aceite el cual ha estado en contacto durante un período prolongado con superficies metálicas.

Los atributos positivos que se evalúan son:

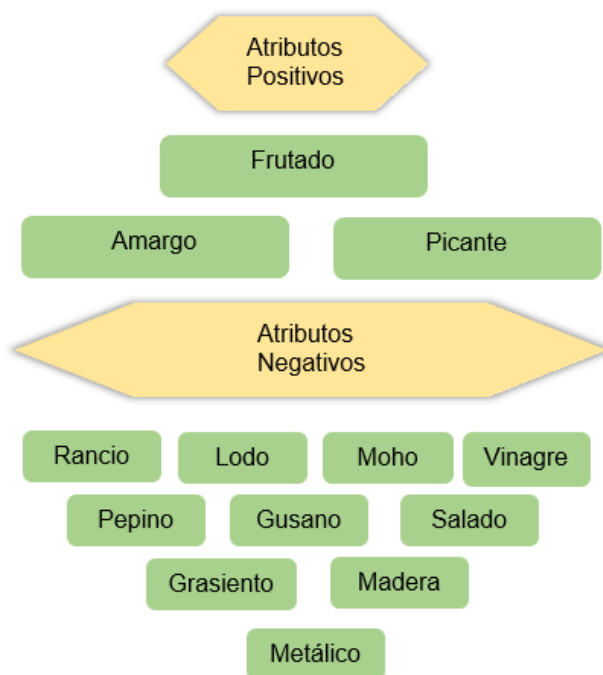
- Frutado: es un grupo de sensaciones olfativas procedente de frutos sanos y frescos. Este atributo es considerado verde cuando las sensaciones olfativas

recuerdan la de los frutos verdes, y por lo contrario, se considera maduro cuando recuerdan a frutos maduros.

- Amargo: es un sabor propio procedente de aceites los cuales han sido elaborados a partir de aceitunas verdes o en envero.
- Picante: es una percepción característica de los aceites los cuales han sido obtenidos a principios de campaña, fundamentalmente, de aceites todavía verdes.

A parte de estos atributos existen otros como son higuera, tomate, cáscara de plátano, etc. A continuación se muestra una figura (Figura 1) que resume los diferentes atributos hallados en los aceites de oliva.

FIGURA 1. CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN



La acidez encontrada en los aceites, proviene de la descomposición de los triglicéridos en glicerina y ácidos grasos libres a consecuencia de la humedad y las enzimas lipasas. Se define como la cantidad de ácidos grasos libres que se encuentran presentes en un aceite, expresada por convenio en % en peso de ácido oleico. La acidez de un aceite que se ha obtenido a partir de aceitunas sanas y del

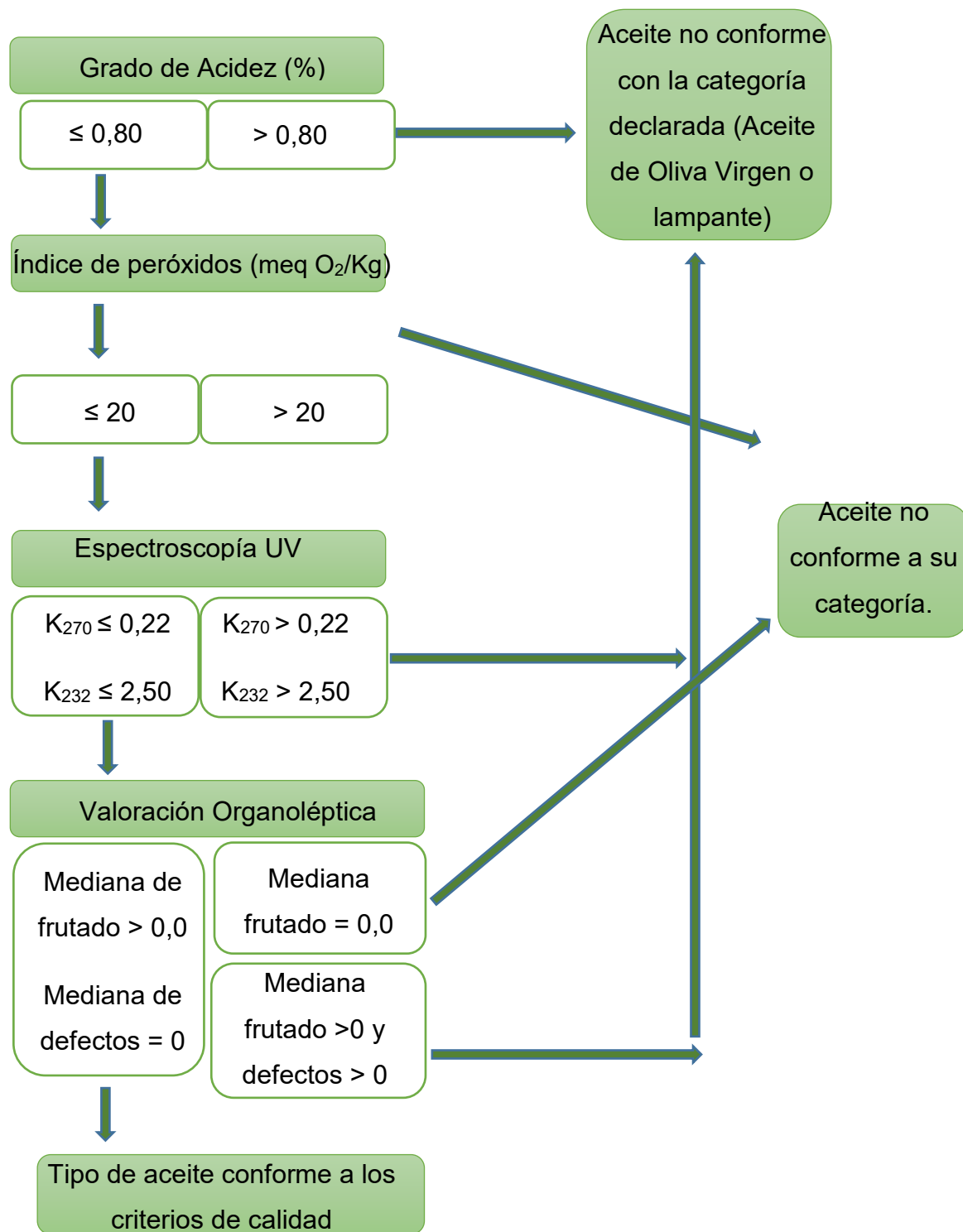
árbol debe ser muy cercana a un 0%, por lo que la presencia de ácidos grasos libres es la consecuencia de frutos en mal estado o mal procesados.

El índice de peróxidos es la cantidad de los mismos en la muestra expresada como miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de muestra. Es una medida del contenido en hidroperóxidos o productos primarios de oxidación. Los ácidos grasos encontrados en el aceite, al estar en contacto con el aire, reaccionan con el oxígeno produciendo como resultado hidroperóxidos. Esta oxidación se ve favorecida cuando la muestra de aceite se encuentra expuesta a la luz, a temperaturas de almacenamiento que no son adecuadas y/o en presencia de metales como Cu y Fe. En un aceite oxidado se desarrollan sabores y olores desagradables, como el atributo “rancio”.

Los **parámetros $K_{270/268}$ y K_{232}** están también relacionados con el estado de oxidación de los aceites, siendo una medida de la absorción en la región ultravioleta. A 232 nm absorben productos primarios de oxidación con estructura de dieno conjugado, mientras que a 270/268 nm absorben productos secundarios de oxidación y otros compuestos con estructura de trienos conjugados.

Los ésteres etílicos son compuestos formado por esterificación de ácidos grasos libres con etanol. Aparecen en el aceite mediante procesos fermentativos anaerobios o en presencia de pequeña cantidad de oxígeno. Este último proviene del transporte hasta la almazara y/o en el tiempo de espera antes de su procesado en meses de recolección con altas temperaturas. Además aparecen en lugares como decantadores o depósitos, ya que en ellos existe un proceso de fermentación de materia orgánica en ausencia de gran cantidad de oxígeno, dando como producto final etanol. Además, la formación de estos ésteres, puede continuar durante el almacenamiento del aceite, pero este fenómeno está estrictamente ligado a la presencia de etanol libre y ácidos grasos formados como consecuencia de la fermentación de las aceitunas (Squeo *et al.*, 2019). Su contenido en los aceites de oliva virgen extra puede servir además como indicador de la adulteración con aceites de baja calidad sometidos a una desodorización suave.

FIGURA 2. ÁRBOL DE DECISIÓN PARA LA COMPROBACIÓN DE LA CONFORMIDAD DE LAS CARÁCTERÍSTICAS DE CALIDAD DE UNA MUESTRA DE ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA.



Fuente: Elaboración propia

La Normativa Europea incluye árboles de decisión para la validación de la conformidad/no conformidad de las características de calidad de los aceites de oliva virgen con los valores establecidos. En la figura 2 se muestra el árbol de decisión para los aceites de oliva virgen extra.

1.3 COMPUESTOS VOLÁTILES

Existe un factor principal que determina la prioridad del aceite de oliva virgen por parte del consumidor, siendo este, la calidad sensorial del mismo. En el aceite de oliva, la calidad sensorial es atribuida a las características organolépticas, las cuales son determinadas principalmente por los compuestos volátiles.

Los principales compuestos involucrados en el flavor de los aceites de oliva vírgenes son los compuestos volátiles (Morales *et al.*, 2000), considerándose como metabolitos los cuales ha sido producidos por siendo considerados como metabolitos producidos por plantas mediante rutas biosintéticas.

1.3.1. Formación de compuestos fenólicos

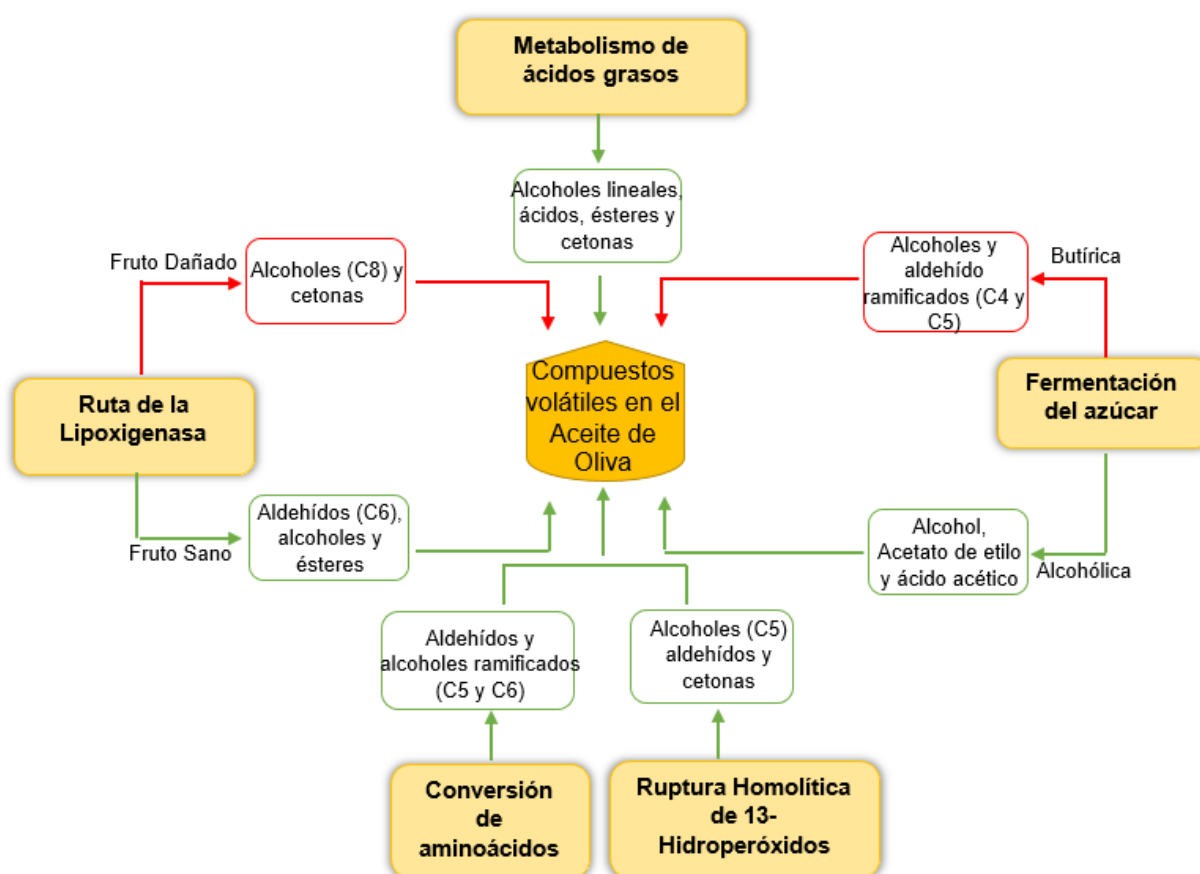
La composición del aroma depende del aceite obtenido y este a su vez, depende del tipo de fruto empleado. Así, en aceites obtenidos a partir de frutos sanos, con un grado de madurez óptimo y seguido de un procedimiento de extracción apropiado, los compuestos que forman su aroma proceden de compuestos volátiles tales como aldehídos de cadena lineal de 6 átomos de carbono (C6), alcoholes y sus ésteres, responsables de los atributos sensoriales positivos, como es el atributo “frutado”. Sin embargo, cuando las condiciones de recolección o extracción no son las adecuadas, el aceite obtenido presenta características sensoriales de menor calidad apareciendo los compuestos volátiles responsables de los atributos negativos, predominando entre ellos aldehídos insaturados de 7 (C7) a 11 (C11) átomos de carbono y alcoholes ramificados (Kalua *et al.*, 2007).

La presencia de compuestos volátiles es imperceptible hasta el inicio climatérico, en donde se produce un aumento en la cantidad de etileno que genera cambios físicos, químicos y bioquímicos en el fruto provocando así un aumento en la actividad de algunas enzimas responsables de su formación (Morales *et al.*, 2013). En el olivar, la fase climatérica corresponde a aquella en la que el aceite extraído de las drupas proporciona un aceite de elevada calidad y rico en compuestos aromáticos (Kalua *et al.*, 2007). Existe una serie de compuestos volátiles que están presentes inicialmente

en el fruto, pero los compuestos principales involucrados en el aroma son metabolitos de estos, cuya formación comienza con la ruptura del fruto y continua en el batido de la pasta. En estos procesos están implicados enzimas, el oxígeno presente, ácidos grasos y aminoácidos como isoleucina, leucina y valina (Gómez-Rico *et al.*, 2008).

La figura 3 muestra las distintas rutas de formación de los compuestos volátiles en el aceite de oliva. Los compuestos volátiles formados por oxidación química, responsables del mal sabor y de atributos negativos como el “rancio” se muestran en las rutas de color rojo. Sin embargo, la oxidación enzimática (en concreto la ruta de la lipoxigenasa) da lugar a la síntesis de compuestos responsables de los atributos positivos del aceite (Rutas de color verde).

FIGURA 3. BIOGÉNESIS DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EN EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.



Fuente: Elaboración propia con datos extraídos de Gomes Da Silva *et al.*, 2014)

- Metabolismo de ácidos grasos: En el proceso de maduración del fruto, se produce la conversión de una cantidad de ácidos grasos en alcoholes, ésteres, cetonas y ácidos lineales que formarán más tarde parte del perfil aromático del aceite de oliva virgen (Luna, 2003).
- Conversión de aminoácidos: Ciertos compuestos volátiles provienen de la estructura ramificada de aminoácidos como la valina, leucina e isoleucina, produciendo aldehídos ramificados como 2-metil propanal, 3-metil butanal y 2 metil butanal y además alcoholes ramificados de 4 o 5 carbonos. En estos, posteriormente, actúan las enzimas alcohol deshidrogenasa y alcohol aciltransferasa formando alcoholes y ésteres ramificados (Gómez-Rico *et al.*, 2008).
- Ruta de la lipoxigenasa (LOX): Consiste en un conjunto de reacciones oxidativas que dan lugar a una variedad de metabolitos con funciones diferentes a partir de ácidos grasos poliinsaturados (linoleico y α - linolénico). Los productos generados reciben el nombre genérico de oxilipinas (Aparicio, 2013). De forma general, en las plantas, la mayoría de los ácidos grasos poliinsaturados forman parte de los lípidos de membrana (fosfolípidos y glicolípidos) o de los lípidos de reserva (triacylglicerols). Para que se pueda hacer uso de ellos estos han de liberarse mediante hidrólisis por la acción de enzimas denominadas acil-hidrolasas (Luna, 2003). Una vez realizado este proceso, comienza la ruta produciéndose 9- y 13-hidroperóxidos a partir de los ácidos linoleico y linolénico, mediada la reacción por la LOX (Morales *et al.*, 2013). La LOX presenta regioselectividad por la posición Δ -13 de ambos ácidos grasos, por lo que su acción da lugar a 13-hidroperóxidos como productos mayoritarios (75-90%) (Kalua *et al.*, 2007).

Estos hidroperóxidos son altamente reactivos, por lo que se degradan rápidamente en metabolitos como pueden ser, aldehídos volátiles, más importantes desde el punto de vista organoléptico (Williams *et al.*, 2000). Las hidroperóxidas liasas (HPL) actúan sobre los hidroperóxidos de manera que catalizan la ruptura de los enlaces del 9- y 13-. Si la ruptura se produce en un 9-hidroperóxido se origina como producto un aldehído volátil de 9 átomos de carbono (C9), mientras que si tiene lugar en un 13-hidroperóxido se forma un

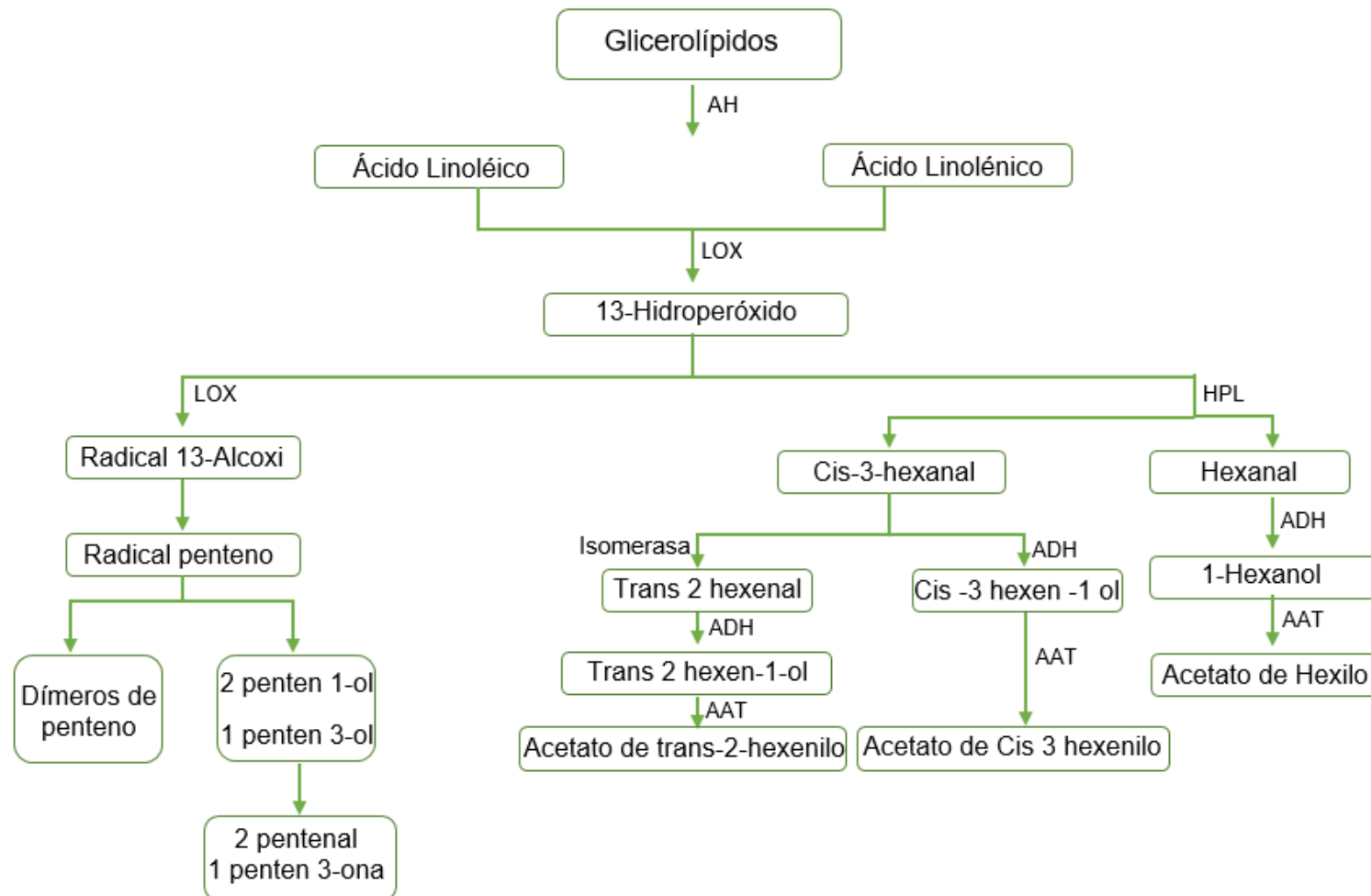
aldehído volátil de 6 átomos de carbono (C6). Como el producto mayoritario es el 13-hidroperóxido, los aldehídos volátiles principales del aroma del aceite de oliva son aldehídos de 6 átomos de carbono (Romero del Río, 2015).

El grupo de compuestos formado por aldehídos de seis carbonos de cadena lineal (C6), alcoholes y sus ésteres, sintetizados a través de la 13-hidroperóxido liasa (13-HPL) en la ruta de la LOX se conocen como "volátiles de hoja verde" (GLV). Su cantidad en tejidos vegetales intactos y sanos es baja, pero se forman rápidamente cuando los tejidos se rompen. Los GLV son moléculas importantes involucradas en la defensa de las plantas contra los microorganismos, en la atracción de depredadores ante el ataque de los herbívoros, y también como compuestos señal dentro y entre plantas para inducir transcripciones de varios genes relacionados con la defensa.

Ruptura homolítica de 13-Hidroperóxidos: Es una reacción suplementaria de la ruta de la LOX usando como sustrato el hidroperóxido Δ -13 del ácido linolénico a través del cual se producen alcoholes de 5 átomos de carbono (C5) como el 1-penten-3-ol y el 2-penten-1-ol. Con posterioridad actúa la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) que es la encargada de la formación de los aldehídos de cinco átomos de carbono (C5) encontradas en los aromas del aceite de oliva (Gómez *et al.*, 2008).

A continuación se muestra con más detalles un esquema de la ruta de la LOX Figura 4.

FIGURA 4. RUTA DE LA LIPOXIGENASA



Fuente: Elaboración propia con datos obtenidos de Aparicio, 2013. Abreviaturas: AH (acil hidrolasa), HPL (Hidroperóxido liasa), ADH (alcohol deshidrogenasa), AAT (alcohol acil transferasa).

1.3.1. Métodos de Análisis

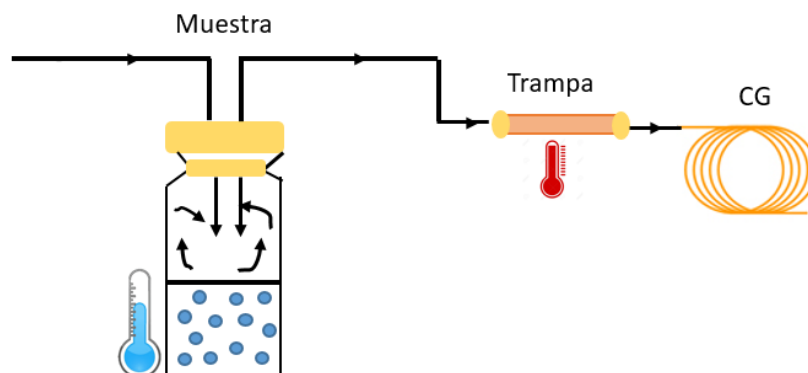
Actualmente, para el análisis organoléptico el único método oficial es el panel de cata del aceite de oliva virgen, aunque desde hace tiempo se ha trabajado en el avance de metodologías que lo complementen. La más usual ha sido la determinación cuantitativa y cualitativa de los compuestos volátiles presentes responsables del aroma. Se han desarrollado una multitud de métodos para dichos análisis, basados generalmente en 4 etapas: preconcentración, aislamiento, separación y cuantificación. La concentración en la que los compuestos volátiles se encuentran en el aceite de oliva virgen es muy baja y por ello es necesario llevar a cabo una preconcentración previa a su análisis. A continuación, se muestra una revisión de las técnicas de extracción y de análisis más empleadas en la determinación de estos compuestos volátiles.

1.3.1.1. Técnicas de Extracción

Las más usuales para la extracción de volátiles del aceite de oliva son las denominadas “*Espacio de Cabeza*” (HS), que se tratan de procedimientos basados en la manipulación del espacio de cabeza que está en contacto con la muestra odorante. Estas técnicas, además de permitir la extracción de los compuestos volátiles, conllevan de forma implícita una preconcentración. Podemos agruparlas en: *Espacio de Cabeza Estático* (SHS) y *Espacio de Cabeza Dinámico* (DHS):

- *Espacio de Cabeza Dinámico (DHS)*: Son técnicas basadas en el transporte mediante un flujo de gas inerte de los compuestos volátiles de la muestra, sometida previamente a una temperatura adecuada, hasta una trampa donde quedan retenidos, para posteriormente son desorbidos y analizados por Cromatografía de Gases (GC) (Figura 5). En esta técnica se diferencian dos formas diferentes de trabajo: el *DHS* propiamente dicho, basado en hacer pasar el gas inerte superficialmente sobre la muestra sometida a agitación y, por otro lado, la conocida como *arrastre por borboteo* o *purga y trampa*, en la que el gas inerte se burbujea a través de la muestra a la vez que esta se agita. Estas técnicas difieren en el tipo de trampa empleada y en la forma de desorción de los analitos.

FIGURA 5. ESQUEMA DE LA TÉCNICA ESPACIO DINÁMICO DE CABEZA



Fuente: Elaboración propia

A continuación, se exponen algunas de las trampas más usuales:

Trampa de adsorción: Es un tubo relleno de un material adsorbente en el que los compuestos volátiles quedan retenidos. Como adsorbentes se usan materiales como carbón activo o Tenax, siendo este último el más utilizado debido a su alto poder de adsorción y su gran estabilidad térmica (Garrido *et al.*, 2011; Oliver *et al.*, 2019; Mascres y Purcaro, 2020).

Trampa criogénica: Es un tubo enfriado, generalmente con nitrógeno líquido, en cuyo interior condensan los compuestos volátiles al pasar a través de él (Neugebauer *et al.*, 2020; Kaziur *et al.*, 2021).

En cuanto a la desorción de los compuestos volátiles a través de la trampa, se lleva a cabo de dos formas:

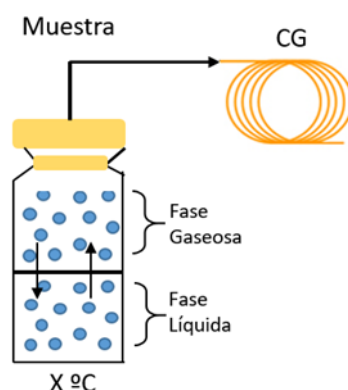
Desorción con disolventes: Se eluyen los compuestos retenidos con un pequeño volumen de un disolvente orgánico. (Rodríguez *et al.*, 2020; Wei *et al.*, 2018)

Desorción térmica: Los compuestos volátiles se desorben calentando la trampa a una temperatura elevada mientras pasa gas inerte a través de ella (Oliver *et al.*, 2019; Mascres y Purcaro, 2020; Spadafora *et al.*, 2022). En la técnica de purga y trampa la desorción de los compuestos retenidos se lleva a cabo de esta forma.

Espacio de Cabeza Estático (SHS): La muestra se calienta en un vial cerrado por un septum durante un período de tiempo determinado a una temperatura determinada y

los volátiles se distribuyen entre la fase gaseosa y la fase de muestra hasta que se alcanza el equilibrio térmico. Una pequeña fracción del espacio de cabeza es luego recogida y analizada directamente mediante GC (Figura 6).

FIGURA 6. ESQUEMA DE LA TÉCNICA ESPACIO DE CABEZA ESTÁTICO



Fuente: Elaboración propia

El muestreo se puede realizar directamente utilizando jeringas de gases (*SHS*) (Oliver *et al.*, 2019; Sales *et al.*, 2019) u otros dispositivos basados en diseños de captura que permitan una mayor concentración de volátiles, como la *Microextracción en Fase Sólida (HS-SPME)* y la *Extracción por Sorción en el Espacio de Cabeza (HSSE)*. La técnica *HS-SPME* integra la extracción y la concentración de la muestra en un solo paso, que puede ser totalmente automatizado. Es una técnica sencilla, barata y eficaz, que consiste en el uso de una fibra de sílice fundida cubierta de un polímero, un sorbente o la combinación de ambos sobre la que se absorben los volátiles tras ser expuesta durante un tiempo determinado al espacio de cabeza del vial que contiene la muestra. Los volátiles son luego desorbidos térmicamente directamente en la cámara de inyección del cromatógrafo (Cecchi *et al.*, 2020; Cecchi *et al.*, 2021). Por otra parte, la técnica *HSSE* es un proceso de enriquecimiento sin disolventes. Se basa en la sorción de los analitos en una película gruesa de polimetilsiloxano que recubre una barra de agitación. En este caso los analitos son desorbidos también térmicamente (Aparicio, 2013; Stilo *et al.*, 2019; Segura *et al.*, 2020).

Cavalli (Cavalli et al., 2003) hizo un estudio en el que comparó las técnicas *SHS*, *HS-SPME* y *HSSE* para la determinación de los volátiles de varios aceites de oliva virgen, encontrando que la técnica *SHS* no era adecuada debido a que no conlleva una preconcentración de la muestra. Sin embargo, las técnicas *HS-SPME* y *HSSE* se aplicaron con éxito permitiendo la caracterización de los compuestos.

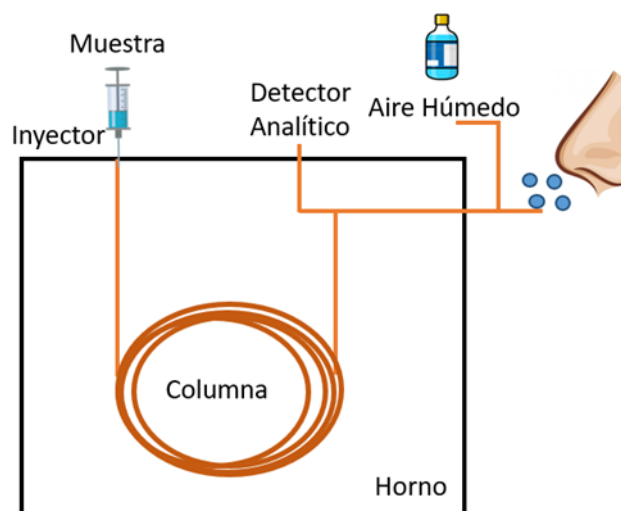
1.3.1.2. Técnicas de Análisis

Existen varias técnicas para el análisis de los compuestos volátiles presentes en el aceite de oliva virgen. A continuación, se describen las técnicas más utilizadas:

- *Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS)*. La GC es una técnica separativa que permite la separación de los componentes de mezclas complejas, siendo la técnica más utilizada para este tipo de análisis. En esta técnica, la fase móvil es un gas inerte que arrastra a los componentes de la muestra a través de la columna cromatográfica donde se separan mediante una combinación de diferentes procesos de interacciones físicas y/o químicas entre los componentes de la muestra y la fase estacionaria.
- La *Espectrometría de Masas (MS)* es una técnica potente, de elevada sensibilidad, que se basa en la ionización de las moléculas de los analitos y la posterior separación y registro de los iones producidos a partir de ellas según su relación masa/carga (m/z) en un sistema a vacío. Ambas técnicas de acoplamiento ofrecen una alta resolución y una gran velocidad analítica proporcionado por la GC y una buena identificación y sensibilidad debido a la MS (Ben Brahim et al., 2018; Reboredo et al., 2012).
- *Cromatografía de gases bidimensional (GC-GC)*. Esta técnica se basa en el uso de dos columnas con selectividades diferentes. Presentan un dispositivo de transferencia, denominado modulador, comprendido entre ambas columnas y que permite el aislamiento y la reinyección de las bandas cromatográficas desde la primera a la segunda columna (Tranchida et al., 2013; Purcaro et al., 2014). Presenta como ventaja un alto poder de selectividad y sensibilidad a diferencia de la GC.
- *Cromatografía de Gases-Olfatometría (GC-O)*. Es una de las técnicas más usadas en el análisis de los compuestos volátiles del aceite de oliva y la más utilizada

para relacionar los compuestos químicos con descriptores sensoriales. En esta técnica se integra la separación de compuestos volátiles mediante GC con la detección de olores mediante un olfatómetro (evaluador humano). Para ello, se utiliza la nariz humana como detector para aquellos compuestos que se eluyen a través de la columna cromatográfica (Figura 7).

FIGURA 7. TÉCNICA CROMATOGRAFÍA DE GASES-OLFATOMETRÍA



Fuente: Elaboración propia

Los alimentos presentan multitud de compuestos volátiles pero solo unos pocos presentan significado sensorial. El perfil obtenido mediante CG-O no refleja necesariamente el perfil del aroma de la muestra ya que no es fácil la asignación de cada compuesto volátil (Blank, 2002). Se han desarrollado varios procedimientos para la obtención de datos y poder estimar la contribución sensorial de los compuestos volátiles al aroma. Los dos procedimientos más utilizados son:

Técnica de tiempo-intensidad: se mide la intensidad del olor que desprende la muestra, se describe y se registra la duración que presenta. La técnica denominada OSME (Gomes Da Silva *et al.*, 2014) se basa en la evaluación del olor por el propio analista en un rango del 0 al 15. Tras esto se compara la intensidad del olor con el tiempo de duración generándose una gráfica denominada “osmeograma”.

Técnica de dilución: Se han desarrollado dos métodos para dicha técnica denominados CHARM (Combined Hedonic Aroma Response Measurements) y AEDA (Aroma Extra Dilution Analysis). En ambos se evalúa la actividad odorífera de los compuestos mediante el análisis de una serie de diluciones del extracto aromático original, normalmente con diluciones 1:1 o 1:2, analizándose posteriormente por GC-O. La información obtenida no es la medida real del aroma de dicho compuesto, ya que dichas técnicas no aseguran que la concentración del compuesto detectado por el analista sea el mismo que cuando se huele directamente la muestra (Aparicio, 2013)

- Cromatografía de Gases-Espectrometría por Movilidad de Iones (GC-IMS). En esta técnica, una vez que los compuestos de una muestra han sido separados por una columna GC, son ionizados y entran consecutivamente en el espectrómetro de movilidad iónica (IMS). Los iones son conducidos a través de un campo magnético en una dirección contraria a un flujo de deriva (nitrógeno, o aire) llegando con distintas velocidades al colector. Debido a que la separación de los iones se hace en función de su movilidad en lugar de su masa, es posible detectar compuestos del mismo peso molecular (Abu y Herbert, 2008).
- *Espectrometría de Masas por Reacción de Transferencia de Protones (PTR-MS)*. Es una técnica utilizada exclusivamente para detectar compuestos orgánicos gaseosos. Se basa en la ionización química por transferencia de protones de una muestra gaseosa dentro de un tubo de deriva. Este proporciona un tiempo de reacción fijo para el paso de los iones denominado tiempo de residencia. Con la combinación de PTR y MS es posible identificar y cuantificar gases a una escala de tiempo relativamente corta con una alta sensibilidad (Blake *et al.*, 2009).

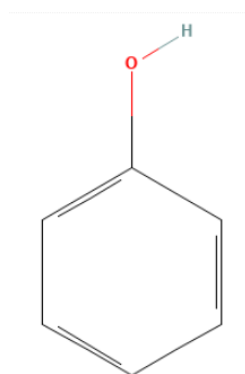
1.4 COMPUESTOS FENÓLICOS

La calidad que distingue a un aceite de oliva virgen de otro se debe a su flavor (aroma y sabor) el cual es muy apreciado por los consumidores. La calidad del aceite de oliva virgen no solo se refiere a la percepción organoléptica, sino también a su relación con la salud. Los beneficios con la salud relacionados al consumo del aceite de oliva virgen están vinculados a la presencia de compuestos fenólicos, ya

que estos confieren propiedades antioxidantes junto con otros compuestos minoritarios también presentes en la matriz lipídica (Aparicio *et al.*, 2016).

Los compuestos fenólicos se encuentran mayoritariamente en la pula (mesocarpio) de la aceituna. Cabe destacar que son solubles en agua y es por ello que gran parte de estos se pierden en las aguas de lavado en la elaboración del aceite. Cuando se habla de compuestos fenólicos, también se usan términos como polifenoles, siendo sustancias que poseen un anillo aromático unido a uno o varios grupos hidroxilo (Figura 8).

FIGURA 8. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL FENOL



Fuente: Elaboración propia

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios provenientes de la ruta del ácido shikímico y del metabolismo de los fenilpropanoides. Los fenoles se pueden agrupar en ácidos fenólicos, fenoles simples, derivados de la oleuropeína, flavonoides, lignanos, secoiridoides e hidroxí-isocromonas (Aparicio, 2013).

Los compuestos secoiridoides, constituyen el grupo fenólico más abundante en la aceituna, proveniente de la familia *Oleaceae*. Son caracterizados por incluir el ácido elenólico en su estructura. Dentro del grupo de los secoiridoides, cabe destacar la oleuropeína, que alcanza hasta un 14% de la materia seca en aceitunas verdes (Gómez-Rico *et al.*, 2008). A continuación, se muestra una tabla con los principales compuestos fenólicos encontrados en el aceite de oliva virgen.

TABLA 2: PRINCIPALES COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

Ácidos fenólicos	Flavonoides	Secoiridoides	Derivados de Oleuropeína
Vainílico	Vainillina	Oleuropeína	(3,4-DPHEA-EA)
Siríngico	Hidroxitirosol	Aglicona de la Oleuropeína	(3,4-DHPEA-EDA)
p- Cumárico	Acetato de Hidroxitirosol	Aglicona Ligustrósido	(p-HPEA-EA)
Gálico	Tirosol	Derivado de p-HPEA	(p-HPEA-EDA)
Cafeico	Acetato de Tirosol		Ácido enólico
Ferúlico	Lignanos		
p- hidroxibenzoico	(+) -1-Acetoxipinorresinol		
Cinámico			
Benzoico			

Fuente: Elaboración propia con datos proporcionado por (Servilli, 2009).

Abreviaturas: (3,4-DPHEA-EA) Forma dialdehídica de aglicona de oleuropeína, (3,4-DHPEA-EDA) Forma hidroxílica oxidada de aglicona de oleuropeína, (p-HPEA-EA) Forma dialdehídica de descarboximetil aglicona de ligustrósido, (p-HPEA-EDA) Forma hidroxílica oxidada de aglicona de ligustrósido

1.4.1. Oleocantal

El Oleocantal (OC) es un compuesto fenólico principal en el aceite de oliva debido a sus propiedades beneficiosas siendo la forma dialdehica del decarboximetiliguistrósido aglicona. Fue identificado por primera vez por Montedoro en el año 1993 (Montedoro *et al.*, 1993) a través de una caracterización espectroscópica. Beauchamp (Beauchamp *et al.*, 2005) identificó dicho compuesto como un antiinflamatorio no esteroideo natural con actividades similares al del ibuprofeno. El oleocantal es el principal agente responsable de la sensación de ardor en la parte posterior de la garganta al ingerir cierta cantidad de AOVE. Dicho

compuesto representa solo el 10% del contenido total de polifenoles (100-300 mg/Kg) aunque la concentración de este se debe a diversos factores como son la región geográfica, el método de extracción, las técnicas agrícolas empleadas y sobre todo la variedad (Vera *et al.*, 2019). A nivel botánico, es un tipo de secoiridoide, producto del metabolito secundario del género (*Olea europaea* L.), que actúa frente a situaciones estresantes de la planta (es por ello por lo que se encuentra en gran cantidad en plantaciones de secano).

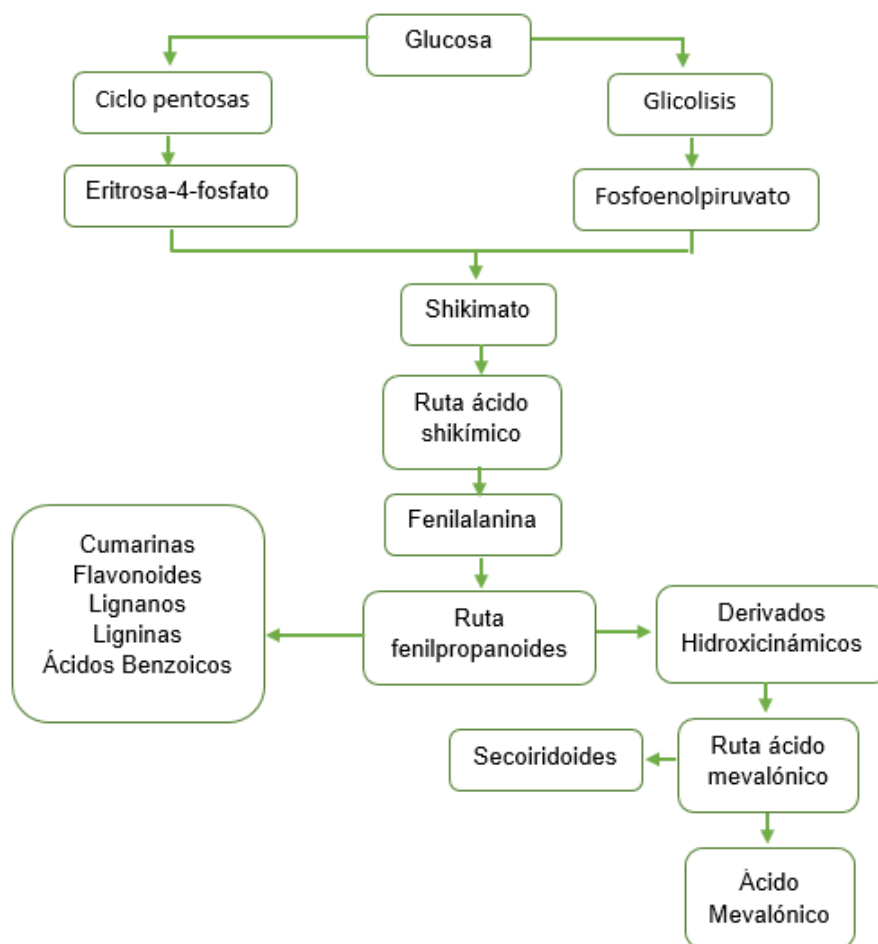
1.4.2. Oleuropeína

La oleuropeína es un compuesto fenólico secoiridoide glicosilado del éster del ácido elenólico con hidroxitirosol (2-(3,4-dihidroxifenil etanol)), siendo la responsable del amargor de los aceites de oliva vírgenes. Se encuentra de forma principal en la hoja del olivo y en el propio fruto, siendo su concentración variada en función del estado de madurez del fruto. La oleuropeína es degradada en el colon dando lugar a la liberación de hidroxitirosol como producto mayoritario (Vissers *et al.*, 2002). Tiene varias propiedades a nivel farmacológico destacando su poder antioxidante, el cual puede llegar a ser superior al de la vitamina E y C (Charoenprasert *et al.*, 2012)

1.4.3. Formación de los compuestos fenólicos

La ruta de la biosíntesis de los compuestos fenólicos comienza con la formación del ácido shikímico, tomando como precursores el fosfoenolpiruvato (proveniente de la glicolisis y eritrosa-4-fosfato) procedentes de las pentosas dando como resultado la fenilalanina. Esta última, se encuentra en la ruta de los fenilpropanoides dando lugar a la formación de compuestos fenólicos como son las cumarinas, los flavonoides, lignanos ácidos benzoicos y derivados hidroxicinámicos. Para su formación es necesaria la ruta del ácido mevalónico donde presenta como compuesto de partida el ácido deoxilogánico, para así formar los compuestos secoiridoide (Figura 9).

FIGURA 9. RUTAS IMPLICADAS EN LA FORMACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS



Fuente: tomado de Romero, 2015.

- Ruta de fenilpropanoides: En esta ruta la fenilalanina se transforma en tioéster p-cumaril-CoA mediante la acción de tres enzimas (fenilalanina amonioliasa, cinamato-4-hidroxilada y p-cumaril-CoA ligasa) a partir de las cuales desencadenan la ruta de la biosíntesis de los monolignoles y los flavonoides (Noel *et al.*, 2005).
- Ruta del ácido mevalónico es una ruta muy compleja que actualmente no se encuentra descrita.

De varios estudios (Damtoft *et al.*, 1993; 1995) se ha deducido que, a partir del ácido mevalónico, se origina una conversión directa del 7-cetologanina a oleósido-11-metil

éster, seguido de una conversión a 7- β -1-D-glucopiranosil-11-metil oleósido y su esterificación con tirosol para formar el ligustrósido, y, finalmente, mediante hidroxilación formar la oleuropeína. Esta se acumula a lo largo de la fase de crecimiento del fruto, decreciendo durante la maduración (Malik y Bradford, 2006). En este proceso, interviene la β -glucosidasa que, en contacto con la oleuropeína, provoca su hidrólisis disminuyendo la percepción de su amargor. Durante el proceso de elaboración del aceite la β -glucosidasa hidroliza los compuestos presentes en el fruto transformándolos en 3-4-DHPEAEA, 3-4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EA y *p*-HPEA-EDA (Gómez *et al.*, 2009)

1.4.4. Contenido Fenólico total

El contenido fenólico total oscila dependiendo de la variedad del fruto, de las condiciones de cultivo, etc. Presentan un rango de entre 50-1000 mg/Kg siendo el rango más habitual el de 100-300 mg/Kg.

El método de elección para determinar el contenido fenólico total es el ensayo de Folin-Ciocalteu. Se basa en la capacidad que tienen los polifenoles de reducir el reactivo de Folin, que contiene sales de molibdeno y tungsteno, para dar lugar a un complejo fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico, reduce el complejo a un óxido de color azul intenso de molibdeno y tungsteno. La intensidad de la coloración azul generada se mide luego por espectrofotometría a 760 nm, utilizando como patrón ácido gálico. Es un método sensible y preciso, aunque sufre de la interferencia de sustancias como aminas aromáticas, ácido ascórbico y otras que reaccionan también con el reactivo (La Cueva *et al.*, 2010).

1.4.5. K₂₃₂

La rancidez oxidativa u oxidación del aceite es el principal parámetro que afecta a su calidad, teniendo lugar en la producción y almacenamiento del aceite. Uno de los parámetros importantes relacionado con el deterioro oxidativo del aceite es la absorbancia a 232 nm, denominado como K₂₃₂, que está relacionado con las etapas iniciales de la oxidación de dicho producto (Guzmán *et al.*, 2011). Según el Reglamento de la Comisión Europea (Reglamento 1604/2019), como ya se ha mencionado anteriormente, el valor de K₂₃₂ no ha de ser superior a 2,50 para que un aceite de oliva pueda clasificarse como aceite de oliva virgen extra o no ser superior a 2,60 para que pueda clasificarse como aceite de oliva virgen.

Si estos aceites presentan valores de K_{232} superiores a los indicados anteriormente, esto indica la presencia de productos primarios de oxidación (hidroperóxidos), con estructura de dienos conjugados, en una cantidad que no es apropiada para su categoría comercial.

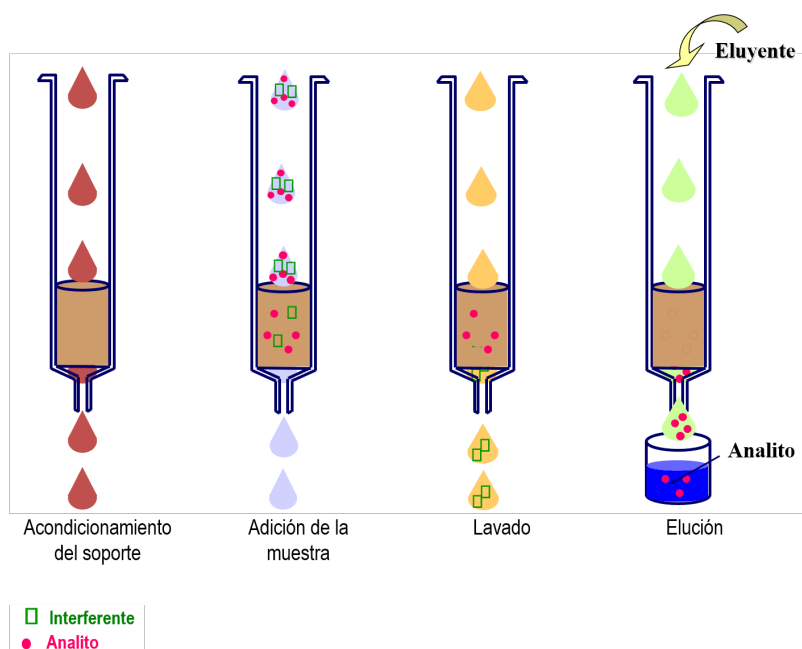
1.4.6. Técnicas de Extracción

Es de gran interés el análisis de los compuestos fenólicos desde el punto de vista de la estabilidad oxidativa y las propiedades saludables que presentan (EFSA, 2011). Existen varios métodos de análisis, pero independientemente de estos, previamente se ha de extraer la fracción fenólica del aceite. Para ello, se utilizan generalmente las técnicas extracción líquido-líquido y extracción en fase sólida.

- Extracción líquido-líquido (LLE). En esta técnica, también denominada como extracción con disolventes, se transfieren las sustancias químicas de una solución a otra basándose en la diferente solubilidad de estas en dos disolventes inmiscibles entre sí (Zhang y Hu, 2013). También se ha propuesto el uso de un extractor de partición centrífugo (*Centrifugal Partition Extractor*, CPE) para mejorar la pureza y rendimiento en la extracción de compuestos fenólicos. Así, Angelis propuso dos métodos de extracción diferentes: una estrategia secuencial que consta de varios ciclos de "extracción-recuperación" y una estrategia continua basada en la elución en contracorriente en fase estacionaria (Angelis *et al.*, 2017). La fracción fenólica total resultante fue luego fraccionada mediante el uso de Cromatografía de Partición Centrífuga (CPC) con elución en gradiente.
- Extracción en fase sólida (SPE): Es una técnica muy utilizada para muestras líquidas donde se consigue purificar y concentrar los analitos de interés mediante la retención de estos en una fase sólida. Presenta ventajas como la baja manipulación de la muestra, alto poder de concentración, bajo consumo de disolventes y además, presenta la posibilidad de ser una técnica automática. Este proceso necesita una preparación de la muestra, mostrado en la Figura 10. La primera etapa es denominada acondicionamiento, donde se hace pasar a través el cartucho un disolvente para así poder eliminar las impurezas e hidratar la fase estacionaria. La segunda etapa es el paso de la muestra donde quedan retenidos los analitos de interés, una tercera etapa es el lavado mediante un disolvente con gran afinidad por las interferencias y por último la elución

mediante disolventes adecuados para la muestra, recuperando de esta manera, el analito (Canosa, 2008).

FIGURA 10. ESQUEMA DE LA TÉCNICA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA



Fuente: Elaboración propia

Los cartuchos más empleados en la determinación de los compuestos fenólicos, son los C18 necesitando la adición de un disolvente orgánico para así eluir la muestra fácilmente sin afectar a la recuperación, de en este caso, los compuestos fenólicos (Romero, 2015). Esta técnica se ha aplicado con éxito para la extracción de compuestos fenólicos en el aceite de oliva virgen (Servili *et al.*, 1999), obteniendo porcentajes de recuperación elevados.

1.4.7. Técnicas de análisis

La determinación de compuestos fenólicos se lleva a cabo usualmente mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC). Esta es una técnica de separación muy apropiada para el análisis de compuestos polares, como son los compuestos fenólicos. La principal diferencia con la GC es que en este caso la fase móvil es líquida. Esta es la técnica utilizada en el método oficial del IOOC para el análisis de biofenoles (IOOC, 2017c). Este método, describe un procedimiento para

la extracción y cuantificación por HPLC de los compuestos biofenólicos polares menores en los aceites de oliva. Los compuestos biofenólicos se extraen en metanol y posteriormente se analizan mediante HPLC en fase inversa con columna de C18 y detector UV (280 nm), utilizando ácido siríngico como patrón interno. Las concentraciones son expresadas en mg/Kg de tirosol, siendo los rangos detectado de 30 a 800 mg/Kg.

También se ha propuesto el uso de la técnica HPLC acoplada a MS para la determinación de compuestos fenólicos, permitiendo en este caso la identificación de cada uno de los componentes de la fracción (Romero, 2015; *Dierkes et al.*, 2012).

1.5. ÉSTERES ETÍLICOS

La determinación de ésteres alquílicos, fue propuesta por el IOOC en 2009 (International Olive Council, 2009) y en el año 2011 se estableció como un método oficial adoptado por la normativa europea (European Commission Regulation, 2011). Los ésteres etílicos de ácidos grasos junto con los ésteres metílicos constituyen los ésteres alquílicos. Estos representan una familia de lípidos neutros naturales que se producen por esterificación de ácidos grasos libres, con alcoholes de bajo peso molecular como son el metanol y el etanol. No representan peligro para la salud humana debido a que son componentes liposolubles naturales del aceite. (Di serio et al., 2016).

El metanol y el etanol provienen de la degradación progresiva de las paredes celulares de la drupa (aceituna), lo que ocurre por ejemplo cuando esta se encuentra sobremadurada o ha sido dañada; también se originan en los procesos fermentativos que ocurren principalmente durante su almacenamiento en condiciones inadecuadas (Squeo et al., 2009). Debido a que el etanol sólo puede producirse mediante fermentación, los ésteres etílicos representan un marcador de calidad más importante que los ésteres metílicos y es por ello que en 2013, en la normativa europea, se sustituyó la determinación de los ésteres alquílicos por la de los ésteres etílicos (European Commission, 2013), estableciendo un límite máximo de 35 mg/Kg para el aceite de oliva virgen extra.

1.5.1. Formación de los ésteres etílicos

Estos compuestos pueden formarse por dos vías, mediante esterificación de los ácidos grasos libres o por trans-esterificación de los triglicéridos con etanol

(Biederman *et al.*, 2008). La esterificación de ácidos grasos libres consiste en una reacción de orden dos, en medio ácido, catalizado por ciertas enzimas. Esta reacción varía en función de la cantidad de ácidos grasos libres, de alcohol presentes y de la temperatura (Pérez *et al.*, 2008), y es ligeramente más rápida que la transesterificación. No obstante, si la cantidad de ácidos grasos esterificados es elevada, la transesterificación será la ruta de formación de los ésteres (Biederman *et al.*, 2008).

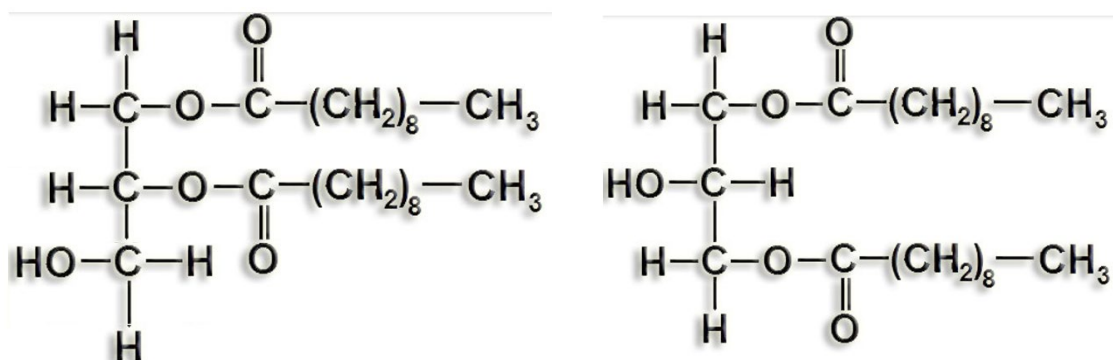
1.5.2. Métodos de análisis

La normativa Europea adoptó como método oficial para la determinación de ésteres etílicos el del IOOC (IOOC, 2017d). Este método permite la determinación de ceras y de ésteres metílicos y etílicos. La extracción de estos compuestos se lleva a cabo mediante Cromatografía en Columna, empaquetada con gel de sílice y utilizando como eluyente una mezcla hexano:éter etílico (99:1). La determinación de los ésteres etílicos se lleva a cabo a continuación en el extracto obtenido haciendo uso de la GC.

1.6. DIACILGLICEROLES

El aceite de oliva contiene acilgliceroles,principalmete como triacilgliceroles y en menos medida diacilgliceroles. Los diacilgliceroles (DAG) son ésteres de glicerol en los que dos de los grupos hidroxilo está unido mediante un enlace éster (esterificado) con ácidos grasos (Figura 11). Se ha afirmado que estos son beneficiosos para la salud humana (Fiametti *et al.*, 2011).

FIGURA 11. ESTRUCTURA QUÍMICA DE 1,2- Y 1,3-DIACILGLICÉRIDOS



Fuente: Elaboración propia

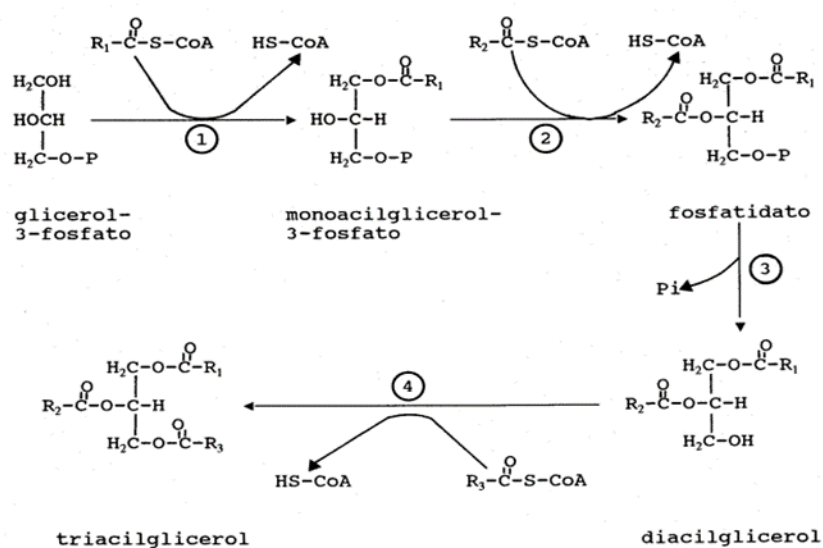
Los DAG se encuentran en los aceites de oliva vírgenes en bajas cantidades (entre un 1 y un 3%) como productos intermediarios de la biosíntesis de triacilglicerol (1,2-DAG) o como productos de hidrólisis enzimática que ocurren antes o después del proceso de extracción del aceite (1,3-DAG). Los aceites de oliva virgen provenientes de frutos sanos contienen en su mayor medida 1,2-DAG mientras que los obtenidos de frutos de mala calidad contienen 1,3-DAG y ácidos grasos libres (Caponio *et al.*, 2013). Durante el almacenamiento del aceite de oliva virgen la cantidad de 1,2-DAG disminuye y por lo contrario aumenta la de 1,3-DAG (Pérez Camino *et al.*, 2001).

1.6.1. Formación de diacilglicerol

La formación de los triacilglicerol, a partir del glicerol 3-fosfato y ácidos grasos, tiene lugar mediante la ruta de Kennedy. En ella se encuentran implicadas enzimas como la aciltransferasa y la fosfatasa, que utilizan acil-CoA como sustrato. La ruta está compuesta por 4 etapas (Figura 12), estando la tercera etapa, que es la que da lugar a la formación de los diacilglicerol, catalizada por la enzima fosfatidato fosfohidrolasa.

Por otro lado, como ya se ha dicho anteriormente, los isómeros 1,3-DAG es formado a través de la hidrólisis enzimática del 1,2-DAG ocurriendo en el proceso posterior o anterior a la extracción del aceite (Acebal., 2015)

FIGURA 12. RUTA DE KENNEDY



Fuente: (Del Cuvillo., 1994)

1.6.2. Métodos de análisis

El método oficial propuesto por el IOOC (IOOC, 2013) permite la determinación paralela de triacilglicerol y DAG, mediante GC, con un contenido de ácido láurico inferior al 1 %. Ambos tipos de compuestos son sometidos previamente a una siliación y posterior extracción con heptano.

Los triacilglicerol son determinados en base al número de átomos de carbono, mientras que los DAG se determinan en función de su número de átomos de carbono y su estructura. De esta manera, los 1,2-DAG presentan menor tiempo de retención que sus isómeros 1,3-DAG. Las estructuras de los diacilglicerol insaturados no interfieren en los tiempos de retención y es por ello que tanto los DAG saturados como los insaturados se eluyen de forma simultánea. Los DAG eluyen según el siguiente orden: 1,2 C32; 1,3 C32; 1,2 C34; 1,3 C34; 1,2 C36 y 1,3 C36. La identificación de 1,2-DAG y 1,3-DAG se basa en la relación de los tiempos de retención con los de mezclas conocidas de DAG. El contenido porcentual de 1,2-DAG se obtiene a través de la relación del área de los picos cromatográficos de dichos isómeros y el área total de los picos cromatográficos de los DAG. De la misma manera, la cuantificación de los DAG totales se realiza mediante la relación entre la suma de las áreas de todos los picos de DAG y el patrón interno (dinonadecanoína).

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este Trabajo Fin de Máster es el estudio de la relación existente entre la calidad del aceite de oliva virgen, definida mediante parámetros organolépticos, y su composición química.

Este objetivo general se desarrolla a través de los siguientes objetivos específicos:

- Revisar las reacciones de formación de los compuestos volátiles, compuestos fenólicos, ésteres etílicos y diacilglicerol en aceites de oliva virgen.
- Revisar las técnicas de extracción y análisis cuantitativo de los compuestos volátiles, compuestos fenólicos, ésteres etílicos y diacilglicerol en aceites de oliva virgen.

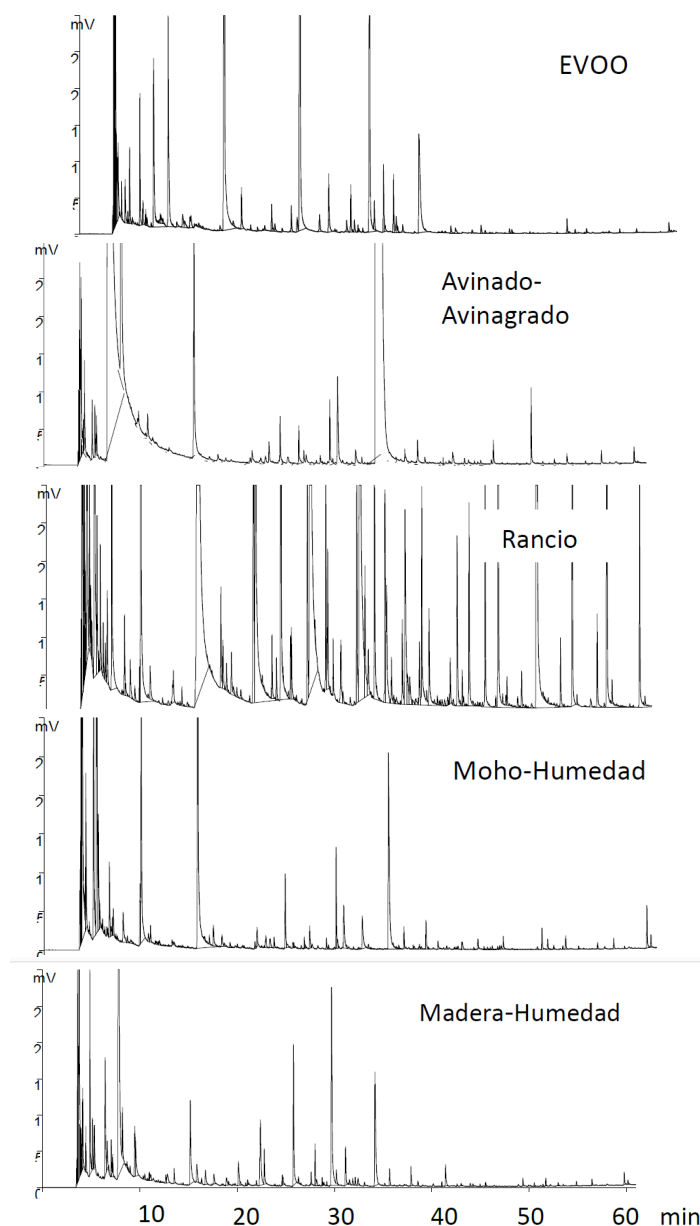
- Estudiar la relación entre los compuestos volátiles del aceite de oliva virgen y sus atributos sensoriales positivos y negativos (aroma).
- Estudiar la relación entre los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen y sus atributos sensoriales positivos (sabor).
- Estudiar la relación entre los ésteres etílicos del aceite de oliva virgen y sus atributos sensoriales negativos (defectos).
- Estudiar la relación entre los diacilgliceroles del aceite de oliva virgen y sus atributos sensoriales negativos (defectos).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. COMPUESTOS VOLÁTILES COMO MARCADORES DE LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el IOOC recoge el análisis sensorial mediante el panel de cata como método oficial de la evaluación de la calidad sensorial del aceite de oliva virgen. El aroma de este, es debido a la presencia de compuestos volátiles donde según su perfil, el IOOC (IOOC, 2018) clasifica los defectos sensoriales más comunes en 6 grupos: Atrojado, Moho-humedad-tierra, Avinado-avinagrado, ácido-agrio, rancio y madera húmeda-aceituna congelada. Este último defecto se debe a la congelación del propio fruto, el defecto de Polvo-barro proviene de una mala recogida del mismo y los demás defectos provienen de la mala conservación del fruto o de la pasta de aceituna. Cada uno de los defectos detectados tiene un perfil de volátiles diferente a los demás. En la Figura 13 se muestran de forma independiente algunos perfiles de los defectos mencionados anteriormente, teniendo como referencia el perfil de un aceite de oliva virgen sin defecto.

FIGURA 13. PERFILES DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN ACEITE DE OLIVA VIRGEN CON DEFECTOS SENSORIALES



Fuente: (Romero del Río, 2015)

Atrojado: Sabor característico de aquel aceite el cual se ha obtenido de aceitunas apiladas en condiciones tales, que hayan sufrido una fase avanzada de fermentación anaeróbica o de aquel aceite el cual ha estado en contacto durante un tiempo prolongado con los sedimentos (IOOC, 2018)

Estudios previos han establecido que en las primeras etapas del almacenamiento de las aceitunas, los microorganismos más abundantes son de los géneros *Aerobacter*

y *Escherichia* junto con mohos y levaduras, mientras que tras un largo periodo destacan los géneros *Clostridium*, *Serratia* y *Pseudomonas*.

Cabe destacar, además, la alta concentración de ésteres, que indica a su vez, una sobremaduración del fruto ya que la capacidad que tiene un fruto de producir ésteres aumenta con el grado de maduración, al igual que las altas actividades enzimáticas (Luna, 2003).

Moho y humedad: Sabor propio de aceites obtenidos de frutos en los que se han desarrollado gran cantidad de hongos y levaduras como consecuencia del almacenamiento en condiciones húmedas o de aceitunas recolectadas con tierra o barro. (IOOC, 2018).

Existen distintos microorganismos que provocan dicho defecto, entre los cuales se encuentran *Penicillium natatum* siendo el más abundante. Presenta como función la oxidación de los ácidos grasos libres presentes en el fruto, produciendo compuestos volátiles como metil-cetona. Otros hongos presentes son los del género *Fusarium*, *Rhizopus* aunque estos se encuentran en menor medida. Con respecto a las levaduras encontradas cabe destacar la del género *Saccharomyces*, *Pichia* o *Candida*. (Cecchi et al., 2021 b).

Avinado: Sabor característico de aquellos aceites que recuerdan al vino o al vinagre (IOOC, 2018).

Es un defecto típico de aceitunas que han sufrido fermentación alcohólica o acética. La razón principal de este defecto es la producción de compuestos volátiles los cuales están asociados a un proceso fermentativo proveniente de bacterias lácticas (*Lactobacillus*) y bacterias acéticas. Estos microorganismos inducen a un proceso fermentativo dando lugar a la producción de etanol, acetato de etilo y ácido acético (Genovese et al., 2021).

Rancio: Sabor característico de los aceites los cuales han sufrido un intenso proceso de oxidación (IOOC, 2018). Este fenómeno es promovido por una exposición prolongado al aire, exposición a la luz y temperaturas relativamente altas. (Genovese et al., 2021) Es el defecto más estudiado debido a su implicación en la pérdida de la calidad. Este proceso afecta de forma fundamental a los ácidos oleicos linoléico y Linolénico. Cuando se estudia la alteración oxidativa, se observa que a

medida que aumenta, disminuyen los ácidos grasos insaturados aumentando los productos secundarios de la oxidación de volátiles.

Madera húmeda: Sabor característico de los aceites extraídos de aceitunas que han sido dañadas por heladas mientras estaban en el árbol.

Por otro lado, según IOOC (IOOC, 2018), define como principales atributos positivos el frutado, amargo y picante donde dentro de estos, el frutado viene provocado principalmente por compuestos volátiles. El frutado de un aceite de oliva virgen viene definido como el conjunto de sensaciones olfativas las cuales dependen de forma principal de la variedad, de frutos sanos y frescos o maduros. Estas sensaciones son captadas mediante vía directa y/o retronasal. Con respecto al frutado maduro este se evalúa mediante inhalación directa. (Fernández, 2010)

La fracción volátil del aceite de oliva virgen está compuesta por numerosos compuestos como pueden ser carbonilos, alcoholes, ésteres e hidrocarburos. Especialmente, los aldehídos lineales saturados e insaturados de seis carbonos representa la fracción más importante desde el punto de vista cuantitativo, pero otros compuestos como pueden ser los aldehídos monoinsaturados de siete y once carbonos, aldehídos y alcoholes ramificados dan lugar, en concentraciones elevadas, a los denominados defectos organolépticos.

Los compuestos de seis átomos de carbono son producidos de forma enzimática, a partir de los ácidos grasos poliinsaturados a través de la denominada vía de la lipoxigenasa (LOX), cuyas concentraciones dependen de la actividad de la enzima implicada en dicha vía.

Generalmente, se asume que la intensidad de los estímulos provocados por los compuestos volátiles está relacionado con su cantidad, por lo que para buscar relaciones entre los compuestos volátiles y las características sensoriales es relacionar la concentración de volátiles con las intensidades de los atributos sensoriales.

Pero no siempre la concentración de cada compuesto volátil es la forma de describir el aroma del aceite. De hecho, no siempre es correcto que los compuestos volátiles

en concentraciones mayores son los principales contribuyentes del aroma, ya que existen otros factores como son la volatilidad, la forma, el tamaño, la posición de los grupos funcionales, etc. Además, cada compuesto volátil contribuye al conjunto del aroma según su propia calidad de olor, la cual está influenciada según el isómero, trans-cis, y por la posición de las instauraciones (Angerosa et al., 2004).

Se han llevado a cabo varias investigaciones para encontrar relaciones entre los compuestos volátiles y las percepciones sensoriales, pero los resultados no son suficientemente completos como para describir todas las sensaciones experimentadas en la cata.

Un inconveniente sobre la evaluación sensorial de los aceites de oliva vírgenes es el hecho de que cada catador juzga las características organolépticas de forma subjetiva, ya que cada persona tiene umbrales sensoriales diferentes. Para paliar estos inconvenientes, se puede evaluar la contribución de cada compuesto volátil al sabor del aceite mediante la relación entre la concentración del compuesto y su umbral de sabor evaluado mediante la vía nasal y retronasal, conocido como valor de actividad de olor (OAV) (Angerosa, 2002).

El OAV es un parámetro que proporciona un patrón aproximado de la importancia sensorial de los olores, permitiendo convertir los datos cuantitativos en información sensorial. De esta manera, los compuestos cuyo OAV sea más alto, contribuirán de manera más fuerte al aroma general (Aceña et al., 2011).

Un estudio realizado en el año 2005 (Morales et al., 2005) analizó los principales defectos del aceite de oliva virgen mediante GC de alta resolución haciendo uso, además, del OAV. Como resultados se obtuvo que el defecto principal fue el de moho-humedad, donde fue detectado con OAVs de 250, 68, 13 y 26 mg/Kg procedentes de los compuestos 1-octen-3-ol, heptanal, 1-octen-3-one, y Hexanal respectivamente. Todos aquellos compuestos donde el OAV era mayor que uno, contribuyen al defecto sensorial mencionado anteriormente.

El OAV puede obtenerse de forma más sencilla utilizando el Análisis de Dilución de Extractos Aromáticos. En esta técnica, el extracto de la fracción volátil se diluye

según una relación volumen. Esta fracción es analizada mediante la técnica GC-olfatometría, realizándose este procedimiento hasta que los evaluadores no perciban ninguna sensación. La relación entre la concentración del extracto inicial y su concentración en el extracto más diluido, donde aún se detectó olor, representa el factor de dilución del olor (FD) el cual es proporcional al OAV pudiendo así calcular su valor de actividad de olor. Esta técnica es la más común para la evaluación de la potencia del olor en extractos alimenticios. (Angerosa et al., 2004).

A continuación, se muestra una TABLA 3 donde se exponen los diferentes compuestos volátiles encontrados en el aceite de oliva, su respectivo OAV y su aroma.

TABLA 3. COMPUESTOS VOLÁTILES ENCONTRADOS EN LOS ACEITES DE OLIVA VÍRGEN, SU OAV Y SU AROMA

Aldehídos			Alcoholes		
Compuesto	OAV (µg/Kg)	Aroma	Compuesto	OAV (µg/Kg)	Aroma
2 metilbutanal	5,2	Malta	Etanol	30000	Alcohol
Trans-2-pentenal	300	Manzana	Pentanol	470	Frutado
Heptanal	500	Madera	Hexanol	400	Banana
2,4-heptadienal	3620	Rancio	Trans-2-hexen-1-ol	5000	Hierba verde
2,4-decadienal	2150	Fuerte	Nonanol	13500	Rancio
Ésteres			Cetonas		
Compuesto	OAV (µg/Kg)	Aroma	Compuesto	OAV (µg/Kg)	Aroma
Hexil acetato	1040	Fruta verde	Butan-2-ona	40000	Frutado
Etil propanoato	100	Frutado	6-metil-5-hepten-2-ona	1000	Punzante
Etil butanoato	30	Dulce	Octan-2-ona	510	Moho
Propil butanoato	150	Piña	1-octen-3-ona	10	Hongos

Ácidos Carboxílicos		
Compuesto	OAV (µg/Kg)	Aroma
Ácido acético	500	Vinagre
Ácido propanoico	720	Agrio
Ácido butanoico	650	Queso Rancio
Ácido octanoico	3000	Aceitoso

Fuente: Elaboración propia con datos proporcionados por (Kalua *et al.*, 2007)

Un estudio realizado por Purcaro, (Purcaro *et al.*, 2014) investigó la aplicabilidad de definir un modelo químico de los compuestos volátiles del aceite de oliva virgen para así relacionarlo con la calidad sensorial del producto utilizando CG x CG dando resultados positivos y fiables.

Recientemente, el uso de un dispositivo electrónico denominado E-lengua potenciométrico ha demostrado ser una herramienta de sensor de sabor práctica y útil para el análisis del aceite de oliva (Veloso *et al.*, 2016 , Veloso *et al.*, 2018 , Slim *et al.*, 2017 , Souayah *et al.*, 2017) donde proporciona respuestas cuantitativas de compuestos de aldehídos, alcoholes y ésteres que imitan los atributos sensoriales positivos del aceite de oliva, como son, 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (sensación de vainilla), acetato de hexilo (dulce, verde, hierba, sensaciones afrutadas o manzana), (Z)-hex-3-en-1-ol (sensaciones hojas verdes o plátano), (E)-hex-2-enal (sensaciones verde, almendras o manzana), (Z)- acetato de hex-3-enilo (sensaciones afrutadas o de hojas verdes), ácidos cítrico y tartárico (sensación ácida), cafeína y quinina (sensaciones amargas) y cloruro de sodio o potasio (sensación salada).

De forma reciente, se ha realizado un estudio por ŽAnetić, (ŽAnetić *et al.*, 2021) donde se observa el perfil sensorial de aceites de oliva vírgenes monovarietales de las cuatro variedades de aceituna más comunes de Dalmacia. Se realizó el estudio mediante la técnica de microextracción en fase sólida con espacio de cabeza en

CG/MS. Se observó que el compuesto volátil más frecuente es el aldehído de 6 carbonos E-2-hexenal donde se observó su relación con el aroma de afrutado intenso a almendra y con notas ligeras a manzana. De igual manera se observó la relación que existía entre un aceite cuya concentración en Z-3-hexen-1-ol era elevada y su aroma a manzana y tomate.

Por otro lado, con respecto a los atributos negativos, Marx et al. (2017) describió al ácido n-butírico (defecto butírico), 2-mercaptoetanol (defecto pútrido) y ácido ciclohexanocarboxílico (defecto de zapatería).

A continuación se expone una tabla donde se muestran diferentes compuestos que pueden encontrarse en el aceite de oliva vírgen relacionado con los atributo positivos y negativos del mismo Tabla 4 y Tabla 5.

TABLA 4. RELACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES CON ATRIBUTOS POSITIVOS

Familia	Compuesto	Atributo	Referencia
Alcoholes	3-metil-butanol	Dulce, afrutado	(Cecchi <i>et al.</i> , 2021)
	Trans-2-hexen-1-ol	Alloza	(Oliver <i>et al.</i> , 2016)
	Z-2-hexen-1-ol	Almendra	(Shake y Azza, 2013)
	6-metil-5-hepten-3-ol	Nuez	(Shake y Azza, 2013)
	Hexanol	Plátano	(Morales <i>et al.</i> , 2005)
	Z-3-hexen-1-ol	Plátano	(ŽAnetić <i>et al.</i> , 2021)
Aldehídos	2-metilbutanal	Dulce	(Shake y Azza, 2013)
	Hexanal	Césped, manzana	(Cecchi <i>et al.</i> , 2021)
	Butanal	Hierba verde	(Lobo <i>et al.</i> , 2020)
	2-hexenal	Plátano	(Shake y Azza, 2013)
	2-metil-2-butenal	Manzana Verde	(Lobo <i>et al.</i> , 2020)
	Benzaldehído	Almendra	(Angerosa <i>et al.</i>, 2004)
	Decanal	Dulce	(Morales <i>et al.</i> , 2005)
	Cis-3-hexenal	Hoja	(Kalua <i>et al.</i> , 2007)
Cetona	Pentan-3-ona	Frutado, Dulce	(Angerosa <i>et al.</i> , 2004)
	6-Metil- hepten-2-ona	Verde	(Lobo <i>et al.</i> , 2020)
Ésteres	Acetato de hexilo	Fruta Verde	(Oliver <i>et al.</i> , 2016)
	Butanoato de etilo	Dulce	(Angerosa <i>et al.</i> , 2004)
	Propil-butanoato	Piña	(Morales <i>et al.</i> , 2005)

TABLA 5. RELACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES CON ATRIBUTOS NEGATIVOS

Familia	Compuesto	Atributo	Referencia
Alcoholes	1-octen-3-ol	Moho	(Shake y Azza, 2013)
	2-heptanol	Tierra	(Lobo <i>et al.</i> , 2020)
	2-metil-butan-1-ol	Avinado	(Morales <i>et al.</i> , 2005)
	Guaiacol	Ahumado	(Morales <i>et al.</i> , 2005)
Aldehídos	2-heptenal	Sebo	(Lobo <i>et al.</i> , 2020)
	trans-2,decanal	Metálico	(Kalua <i>et al.</i>, 2007)
	Acetaldehído	Picante	(Kalua <i>et al.</i> , 2007)
	Cis-3-hexenal	Jabón	(Morales <i>et al.</i>, 2005)
Cetona	1-penten-3-ona	Agrio	(Shake y Azza, 2013)
	1-octen-3-ona	Humedad	(Oliver <i>et al.</i> , 2016)
	Piranona	Quemado	(Morales <i>et al.</i>, 2005)
Ésteres	Acetato de etilo	Viscoso	(Lobo <i>et al.</i> , 2020)
Ácidos Carboxílicos	Ácido hexanoico	Rancio	(Oliver <i>et al.</i> , 2016)
	Ácido heptanoico	Rancio	(Oliver <i>et al.</i> , 2016)
	Ácido pentanoico	Podrido	(Lobo <i>et al.</i> , 2020)
	Ácido acético	Vinagre	(Lobo <i>et al.</i> , 2020)
	Ácido nonanoico	Grasiento	(Kalua <i>et al.</i> , 2007)
	Ácido butanoico	Queso	(Morales <i>et al.</i> , 2005)

3.2. CONTRIBUCIÓN DE LOS COMPUESTOS FENÓLICOS A LAS CARACTERÍSTICAS SENSORIALES DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.

El aceite de oliva virgen presenta, como ya se ha dicho anteriormente, un gran contenido en compuestos fenólicos. Estos compuestos proporcionan a los aceites características a nivel químico, organoléptico y de salud. A nivel químico están relacionados con el efecto antioxidante y con la estabilidad oxidativa del aceite, y a nivel organoléptico se encuentran relacionados con el amargor y el picor del mismo (Beltrán *et al.*, 2000).

Las propiedades de los aceites de oliva virgen se ven afectados, en gran medida, por su composición fenólica. Varios estudios como los realizados por (Servilli *et al.*, 2009) han demostrado la contribución de las fracciones fenólicas de estos con el amargor, la astringencia y el picor. De forma general, el “picante” y “amargo” de los aceites de oliva, están relacionados con los compuestos tirosol, hidroxitirosol y sus derivados.

Los antioxidantes de los aceites de oliva, de forma mayoritaria, son los polifenoles y los carotenos, donde estos últimos incluyen a la luteína como componente principal, violazantina y β -caroteno. Estos últimos compuestos se encuentran en concentraciones de 5 a 24 mg/Kg donde el 90 % de los tocoferoles totales viene representado por α -tocoferol el cual varía en función de los factores agronómicos, el cultivo y la maduración del fruto.

Según (García *et al.*, 2001) se observó que el amargor del aceite de oliva, medido sensorialmente procedente de la suma de los dos derivados de la oleuropeína, disminuye en función de la temperatura. A pesar de todo esto, la relación entre las características sensoriales y los fenoles más hidrofílicos están aún por definir. Además, describió que la intensidad del amargo del aceite de oliva virgen, se ha relacionado con la presencia de compuestos fenólicos derivados de la hidrólisis de la oleuropeína interfiriendo dos tipos de enzimas, como la las glicosidasas y las esterasas. En el caso de las glicosidasas, rompen el enlace glucosídico de la

oleuropeína dando lugar a los derivados secoiridoides de los fenoles, los cuales están implicados en el amargor del aceite.

La aceituna presenta compuestos secoiridoides en forma libre y glucosilados, siendo la oleuropeína el mayoritario. Además también presenta ligustrósido y algunas variedades como la dimetil-oleuropeína donde se le atribuye el amargor característico del fruto verde (Soler, 2009)

Han sido estudiadas las relaciones entre los derivados de los secoiridoides y el amargor, focalizándose previamente, en dos derivados de la oleuropeína y de la dimetil oleuropeína, de igual modo las propiedades sensoriales de amargor y picante con la relación de derivados del ligustrósido. (Carrasco., 2006).

Aunque, actualmente no se han detallado las relaciones entre los compuestos fenólicos y las características sensoriales de los aceites de oliva virgen, varios estudios han evidenciado el gran impacto sensorial producido por los derivados secoiridoides presentes en el mismo. (Uccella *et al.*, 2001).

Se sabe que durante el almacenamiento, la composición en compuestos fenólicos es modificada a partir de enzimas que pueden encontrarse en el propio zumo oleoso. Estas enzimas pueden afectar a las propiedades sensoriales de picante y amargor. Estos a su vez, dependen de forma principal en el contenido de aglicón y secoiridoides provocando a su vez defectos organolépticos como por ejemplo, rancio, pepino o fango. (Inglese *et al.*, 2011)

De esta manera, se ha descrito una elevada correlación entre las formas 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA y p-HPEA-EDA con la intensidad del amargor del aceite de oliva virgen ((García *et al.*, 2001; Gutiérrez-Rosales *et al.*, 2003; Tovar *et al.*, 2001)

Otro estudio realizado por Andrewes (Andrewes *et al.*, 2003), tras aislar e identificar fracciones fenólicas, se observó que el p-HPEA-EDA el cual fue identificado mediante MS y RMN, es el principal contribuyente de las notas sensoriales picantes de los aceites de oliva virgen tras producir una sensación ardiente en la parte

posterior a la garganta, mientras que 3,4-DHPEA-EDA presento una sensación inferior de picor en los catadores.

Un estudio realizado en el año 2012 por Dierkes (Dierkes *et al.*, 2012) observó que el contenido fenólico total no muestra una correlación satisfactoria con el amargor y picante evaluado sensorialmente. Se ha observado además que varias muestras de aceite con alto contenido en compuestos fenólicos presentan una baja intensidad de amargor y picante porque el método que se utilizó no es capaz de predecir si un aceite de oliva virgen va a ser picante o no.

Por otro lado, se estudió la relación directa entre la carboximetil aglicona de oleuropeína con el amargor y el contenido de aglicona descarboximetil ligustrósido con el picante siendo la relación positiva aunque de forma débil. A través de esto, se obtiene como conclusión que para predecir las intensidades de amargor y picante se ha de tener en cuenta todos los secoiridoides y sus derivados.

3.3 RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO DE ÉSTERES ETÍLICOS Y LA CALIDAD SENSORIAL DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.

El contenido en ésteres etílicos es originado por las reacciones producidas en aceitunas de baja calidad y que además presentan una concentración elevada de ácidos grasos libres, metanol presente de una desmetilación del fruto y/o presencia de etanol procedente de la fermentación del azúcar presente en el fruto; originando aceite de oliva de baja calidad.

Un estudio realizado en el año 2012 por Gómez (Gómez *et al.*, 2012) quiso establecer la relación entre la presencia de grandes cantidades de ésteres etílicos y la detección de defectos organolépticos y así proporcionar una herramienta para respaldar las decisiones de los paneles de catadores. En este estudio se obtuvo como resultados que de las muestras analizadas, 6 de ellas contenían defectos organolépticos mostrados en la Tabla 6

**TABLA 6. RELACIÓN ENTRE DEFECTOS ORGANOLÉPTICOS D Y
CONCENTRACIÓN DE ÉSTERES ETÍLICOS**

Nº de muestra	Concentración de ésteres etílicos (mg/Kg)	Defecto organoléptico
1	1853	Rancio
2	430	Vino-vinagre
3	1178	Fangoso
4	723	Rancio
5	88	Rancio
6	11	Aceitunas congeladas

Fuente: Elaboración propia con datos ofrecidos por (Gómez *et al.*, 2012)

De estos datos obtuvieron como conclusiones que los aceites de oliva cuyas concentraciones en ésteres etílicos eran elevados, se clasificaban como aceites de oliva lampantes por defectos fermentativos. Los defectos de aceitunas congeladas no aumentan el contenido de ésteres alquílicos. Por lo tanto, el contenido en ésteres etílicos y los datos organolépticos son criterios complementarios a la hora de clasificar los aceites de oliva.

Por otro lado, los ésteres etílicos también están relacionados con los aceites desodorizados. Estos se pueden usar como marcadores de calidad, sin embargo, cuando se realiza una desodorización a bajas temperaturas no es viable su detección, aunque hay estudios afirman que los ésteres etílicos podrían ser un marcador de detección de fraude, solamente, cuando se emplee una cantidad máxima de un 30% de aceite desodorizado. (Pérez *et al.*, 2008).

3.4. RELACIÓN ENTRE EL CONTENIDO EN DIACILGLICEROL Y LA CALIDAD SENSORIAL DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN.

Los aceites de oliva vírgenes provenientes de aceitunas sanas presentan de forma principal 1,2-DAG mientras que los aceites obtenidos de frutos en mal estado o de baja calidad contiene de forma mayoritaria 1,3-DAG.

El papel de los DAG ha sido estudiado como marcadores con adulteraciones del aceite de oliva virgen (Pérez-camino et al., 2001). En este caso se observó que durante el almacenamiento de los AOV se producía un aumento de 1,3-DAG y una disminución de 1,2-DAG. Este hecho se debe a una isomerización de 1,2-DAG a 1,3-DAG ya que estos últimos son más estables termodinámicamente. Se concluyó que si esta relación (1,3-DAG/1,2-DAG) aumentaba, se debía a la acidez propia del aceite y por tanto esto dependía de la calidad inicial que presentaba dicho aceite de oliva. Es por ello por lo que dicha relación se puede llegar a utilizar como evaluación de tiempo de almacenamiento aunque no es capaz de determinar el tiempo de almacenamiento (Pérez-camino et al., 2001; Fronimaki et al., 2002).

La formación de los isómeros de DAG se ha propuesto como identificador de autenticaciones en los aceites de oliva vírgenes, sin embargo, no se puede relacionar con la calidad organoléptica ya que esta es mera casualidad.

Por otro lado si se ha observado que hay relación con defectos organolépticos mediante procesos hidrolíticos como borras o rancio.

4. CONCLUSIONES

Con respecto al desarrollo realizado en la presente Memoria del Trabajo Fin de Máster pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- La valoración organoléptica de los aceites de oliva virgen, que es clave para poder clasificar estos en sus categorías correspondientes, depende directamente de su composición química y, en concreto, de su contenido en compuestos volátiles, compuestos fenólicos, ésteres etílicos y DAG.

- Los compuestos volátiles presentes en el aceite de oliva virgen, cuya fracción está compuesta por numerosos compuestos de las familias aldehídos, alcoholes, cetonas, ésteres y ácidos carboxílicos, son los principales responsables de los atributos sensoriales positivos y negativos (defectos).

En esta fracción destacan aldehídos de cinco y seis átomos de carbono lineales, como trans-2-pentenal y 2-hexenal, responsables de atributos positivos como los aromas de manzana y plátano, respectivamente. Por otra parte, otros aldehídos como el trans-2-decanal o cis-3-hexenal contribuyen a defectos tales como metálico y jabón, respectivamente.

Se incluyen también en esta fracción alcoholes, ésteres y cetonas de cinco y seis carbonos, que provocan sensaciones positivas tanto olfativas como gustativas. Así por ejemplo el trans-2-hexen-1-ol, el propil-butanoato y la pentan-3-ona dan lugar a sensaciones de alhoza, piña y frutado dulce, respectivamente. Otros como el 1-octen-3-ol, 1-octen-3-ona y el acetato de etilo provocan sensaciones de moho, humedad y viscosidad, respectivamente.

- Los compuestos fenólicos, principalmente el tirosol, hidroxitirosol y sus derivados, además de conferir a los aceites de oliva virgen estabilidad oxidativa, a nivel organoléptico son los responsables de los atributos positivos amargo y picante. En el caso del fruto, el amargor y el picante es atribuible principalmente a la oleuropeína y sus derivados, como 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA y p-HPEA-EDA. La intensidad del atributo amargo en el aceite está directamente relacionada con la extensión de la hidrólisis de la oleuropeína, que origina derivados secoiridoides. En esta fracción destaca también el oleocantal, principal responsable de la sensación de picor en algunos aceites de oliva virgen.

- La presencia de ésteres etílicos en los aceites de oliva virgen se relaciona con reacciones de fermentación en frutos de baja calidad, que dan lugar a la formación de etanol. A estos compuestos se les atribuyen numerosos defectos organolépticos entre los que se encuentran rancio, vinagre-vino o aceituna congelada.

- En la fracción de DAG de los aceites de oliva virgen que han sido elaborados a partir de frutos sanos y mediante procedimientos adecuados predomina el isómero 1,2-DAG. La presencia en cantidad significativa de su isómero 1,3-DAG, responsable en parte del defecto atrojado, se debe a la elaboración del aceite a partir de frutos en mal estado. Por otra parte, el almacenamiento inadecuado de los aceites de oliva virgen también produce un aumento de los isómeros 1,3-DAG por isomerización de los 1,2-DAG.

- La técnica de análisis empleada usualmente para la determinación cuantitativa de las fracciones de compuestos volátiles, ésteres etílicos y DAG es la GC. En el caso de los compuestos fenólicos, y debido a su carácter polar, la técnica de elección es HPLC. En el caso de los compuestos volátiles, debido a la complejidad de la fracción y a la baja concentración de sus componentes, es necesario realizar una previa extracción/preconcentración, siendo las técnicas de Espacio de Cabeza las más utilizadas.

5. BIBLIOGRAFÍA

Abu, B. K., Herbert, H., (2008). Detección de espectrometría de movilidad iónica para cromatografía de gases., 1177(1), 12–27. doi:10.1016/j.chroma.2007.10.110

Acebal, C. (2015): Metabolismo y composición de Glicerolípidos y ácidos grasos en tejidos adultos y fetales de conejo. Tesis Doctoral. Universidad complutense de Madrid.

Aceña, L., Vera, L., Guasch, J., Busto, O., & Mestres, M. (2011). Chemical Characterization of Commercial Sherry Vinegar Aroma by Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Olfactometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(8), 4062–4070. <https://doi.org/10.1021/jf104763u>

Andrewes, P., Busch, J., De Joode, T., Groenewegen, A. & Alexandre, H. (2003). Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: Identification of deacetoxyligstroside aglycone as a key contributor to pungency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1415-1420.

Angelis, A., Hamzaoui, M., Aligiannis, N., Nikou, T., Michailidis, D., Gerolimos, P., Termentzi, A., Hubert, J., Halabalaki, M., Renault, J. H., & Skaltsounis, A. L. (2017). An integrated process for the recovery of high added-value compounds from olive oil using solid support free liquid-liquid extraction and chromatography techniques. *Journal of Chromatography A*, 1491, 126–136. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.046>

Angerosa, F. (2002). Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 104, 639–660.

Angerosa, F., Servilli, M., Selvaggini, R., Taticcichi, A., Esposto, S., & Montedoro, G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, 1054(1–2), 17–31. [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(04\)01298-1](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(04)01298-1)

Aparicio, R., & Harwood, J. (2013). *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties (English Edition)* (2.a ed.). Springer.

Aparicio-Ruiz, R., García-González, D. L., Oliver-Pozo, C., Tena, N., Morales, M. T., & Aparicio, R. (2016). Phenolic profile of virgin olive oils with and without sensory defects: Oils with non-oxidative defects exhibit a considerable concentration of phenols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(2), 299–307. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400337>

Araghipour, N., Colineau, J., Koot, A., ; Akkermans, W., Moreno, JM., Beauchamp, J., Wisthaler, A., Märk, TD., Gerard Downey; Claude Guillou; Luisa Mannina; Saskia van Ruth (2008). Geographical origin classification of olive oils by PTR-MS. , 108(1), 374–383. doi:10.1016/j.foodchem.2007.10.056

Beauchamp, G., Keast, R., Morel, D. et al. Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* 437, 45–46 (2005). <https://doi.org/10.1038/437045a>

Beltrán, G., Jiménez, A., Aguilera, M. P., & Uceda, M. (2000). Phenolic fraction analysis by HPLC of Arbequina virgin olive oils. Relationship with bitterness K225 and oil stability. *Grasas y Aceites*, 51(5). <https://doi.org/10.3989/gya.2000.v51.i5.432>

Ben Brahim, S., Amanpour, A., Chtourou, F., Kelebek, H., Selli, S., Bouaziz, M., (2018). GC-MS-Olfactometric to Control the Aroma Fingerprint of Extra-Virgin Olive Oil from three Tunisian Cultivars at Three Harvest Time. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (), acs.jafc.7b06090—. doi:10.1021/acs.jafc.7b06090

Biedermann, M, Bongartz, A., Mariani, C., Grob, K. (2008). Fatty acid methyl and ethyl esters as well as wax esters for evaluating the quality of olive oils. *European Food Research and Technology* 228, 65-74.

Blank I (2002) Gas chromatography – olfactometry in food aroma analysis. In: Marsili R (ed) *Flavor, fragrance, and odor analysis*. Marcel Dekker, New York, pp 297–332

Blake, R S., Monjes, P S., Ellis, Andrew M. (2009). Espectrometría de masas por reacción de transferencia de protones. *Revisiones químicas*, 109(3), 861–896. doi:10.1021/cr800364q

Canosa,M.P. (2008): Desarrollo de metodología analítica para la determinación de triclosán y parabenos. Aplicación al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales, Tesis Doctoral. Universidad de Santiago de Compostela

Caponio, F., Paradiso, V. M., Bilancia, M. T., Summo, C., Pasqualone, A., & Gomes, T. (2013). Diacylglycerol isomers in extra virgin olive oil: Effect of different storage conditions. *Food Chemistry*, 140(4), 772–776. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.10.120>

Carrasco, A. (2006).Determinación de compuestos fenólicos en aceite de oliva mediante técnicas y metodologías separativas avanzadas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada, España.

Cavalli, J. F., Fernandez, X., Lizzani-Cuvelier, L., & Loiseau, A. M. (2003). Comparison of Static Headspace, Headspace Solid Phase Microextraction, Headspace Sorptive Extraction, and Direct Thermal Desorption Techniques on Chemical Composition of French Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(26), 7709–7716. <https://doi.org/10.1021/jf034834n>

Cecchi, L., Migliorini, M., Giambanelli, E., Cane, A., Mulinacci, N., & Zanoni, B. (2021). Volatile Profile of Two-Phase Olive Pomace (Alperujo) by HS-SPME-GC–MS as a Key to Defining Volatile Markers of Sensory Defects Caused by Biological Phenomena in Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(17), 5155–5166. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c01157>

Cecchi, L., Migliorini, M., Giambanelli, E., Rossetti, A., Cane, A., Mulinacci, N., & Melani, F. (2020). Authentication of the geographical origin of virgin olive oils from the main worldwide producing countries: A new combination of HS-SPME-GC-MS analysis of volatile compounds and chemometrics applied to 1217 samples. *Food Control*, 112, 107156. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107156>

Cecchi, L., Migliorini, M., & Mulinacci, N. (2021). Virgin Olive Oil Volatile Compounds: Composition, Sensory Characteristics, Analytical Approaches, Quality Control, and Authentication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(7), 2013–2040. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07744>

Charoenprasert, S., & Mitchell, A. (2012). Factors Influencing Phenolic Compounds in Table Olives (*Olea europaea*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(29), 7081–7095. <https://doi.org/10.1021/jf3017699>

Damtoft, S., Franzyk, H., Jensen, S.R. (1993). Biosynthesis of secoiridoid glucosides in Oleaceae. *Phytochemistry* 34, 1291-1299.

Damtoft, S., Franzyk, H., Jensen, S.R. (1995). Biosynthesis of iridoids in *Syringa* and *Fraxinus*: Secoiridoid precursors. *Phytochemistry* 40, 773-784

Del cuvillo.(1994):Biosintesis de Glicerolípidos en pulpa de aceituna en desarrollo:Papel de la fotosíntesis del fruto. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

Dierkes, G., Krieger, S., Dück, R., Bongartz, A., Schmitz, O. J., & Hayen, H. (2012). High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Profiling of Phenolic Compounds for Evaluation of Olive Oil Bitterness and Pungency. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(31), 7597–7606. <https://doi.org/10.1021/jf3020574>

Di Serio, M. G., Giansante, L., di Loreto, G., Faberi, A., Ricchetti, L., & di Giacinto, L. (2016). Ethyl esters versus fermentative organoleptic defects in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 219, 33–39. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.109>

EC, European Commission (2019). Commission Regulation (EEC) No 2568/91 of 11 July 1991 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of análisis (consolidated text, 20.20.2019). *Official Journal*, L 248 (5.9.1991), 1 (available on line: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:01991R2568-20191020&from=EN>).

EFSA (2011). European Food Safety Authority. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage. Pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9(4), 2033. www.efsa.europa.eu/efsajournal.

Fernández, A. (2010). El aceite de oliva virgen: tesoro de Andalucía : 13 perspectivas concatenadas. Fundación Unicaja.

Fiametti, K. G., Sychoski, M. M., Cesaro, A. D., Furigo, A., Bretanha, L. C., Pereira, C. M., Treichel, H., Oliveira, D. D., & Oliveira, J. V. (2011). Ultrasound irradiation promoted efficient solvent-free lipase-catalyzed production of mono- and diacylglycerols from olive oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(5), 981–987. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.11.010>

Fronimaki, P., Spyros, A., Christophoridou, S., Dais, P. (2002). Determination of the diglyceride content in Greek virgin olive oils and some commercial olive oils by employing ³¹P NMR spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 2207-2213

García, J M., Yousfi, K., Mateos, R., Olmo, M., Cert, A., (2001). Reducción del amargor por calentamiento de la aceituna (*Olea europaea*), *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49 (9), 4231-4235. Doi:10.1021/jf00130n

Garrido, R., Mercader, F., Arce, L., & Valcárcel, M. (2011). Enhancing sensitivity and selectivity in the determination of aldehydes in olive oil by use of a Tenax TA trap

coupled to a UV-ion mobility spectrometer. *Journal of Chromatography A*, 1218(42), 7543–7549. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.07.099>

Genovese, A., Caporaso, N., & Sacchi, R. (2021). Flavor Chemistry of Virgin Olive Oil: An Overview. *Applied Sciences*, 11(4), 1639. <https://doi.org/10.3390/app11041639>

Gomes da Silva, M., Costa Freitas, AM., Cabrita, M., Garcia, R (2014). Aceite de Oliva - Componentes, Calidad, Propiedades Saludables y Bioconversiones || Composición del Aceite de Oliva: Compuestos Volátiles. , 10.5772/1378 (Capítulo 12), –. doi:10.5772/28512

Gómez-Coca, R. B., Fernandes, G. D., Pérez-Camino, M. D. C., & Moreda, W. (2016). Fatty acid ethyl esters (FAEE) in extra virgin olive oil: A case study of a quality parameter. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 378–383. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.063>

Gómez-Rico, A., Inarejos-García, A. M., Salvador, M. D., Fregapane, G. (2009). Effect of malaxation conditions on phenol and volatile profiles in olive paste and the corresponding virgin olive oils (*Olea europaea* L. cv. Cornicabra). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57, 3587-3595.

Gómez,R., Moreda, W., Pérez, MC., (2012). Presencia deésteres etílicos de ácidos grasos en aceite de oliva vs evaluación organoléptica. 135(3), doi:10.1016/j.foodchem.2012.05.053

Gutiérrez, E., (2019): Detección de Alcaloides Tropánicos en alimentos mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas de Tándem. Trabajo Fin de Grados. Universidad de Jaén

Gutiérrez,M.C., Droguet, M. (2002): La cromatografía de gases y la espectrometría de masas: Identificación de compuestos causantes de mal olor. U.P.C. N°122 Disponible en <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf?sequence=1>

Gutiérrez-Rosales, F., Rios, J.J. & Gomez-Rey, M.L. (2003). Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6021-6025

Guzmán, E., Baeten, V., Fernández Pierna, J. A., & García-Mesa, J. A. (2011). Application of low-resolution Raman spectroscopy for the analysis of oxidized olive oil. *Food Control*, 22(12), 2036–2040. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.05.025>

Inglese, P., Faminai, F., Galuano, F., Servilli, M., Esposito, S., Urbini, S., (2011) Factors affecting extra-virgin olive oil composition. *Horticultural Reviews*, C.38.

IOOC, International Olive Council (2007). Sensory Analysis: General basic vocabulary. COI/T.20/NC No 4/Rev. 1. (september 2007) (<https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/COI-T.20-Doc.-No-4-Rev1-2007-Eng.pdf>).

IOOC, International Olive Council (2013). Determination of composition of triacylglycerols and composition and content of di-acylglycerols by capillary gas chromatography, in vegetable oils. COI/T.20/NC No 32. (november 2013) (available on line in: <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/Method-COI-T.20-Doc.-No-32-2013.pdf>).

IOOC, International Olive Council (2017a). Determination of peroxide value. COI/T.20/NC No 35/Rev. 1. (september 2017) (<https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/Method-COI-T.20-Doc.-No-35-Rev.-1-2017.pdf>).

IOOC, International Olive Council (2017b). Determination of the content of waxes, fatty acid methyl esters and fatty acid ethyl esters by capillary gas chromatography. COI/T.20/NC No 28/Rev. 2. (september 2017) (<https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/Method-COI-T.20-Doc.-No-28-Rev.2-2017.pdf>).

IOOC, International Olive Council (2017c). Determination of biophenols in olive oils by HPLC. COI/T.20/NC No 29/Rev. 1. (september 2017)

(<https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/COI-T.20-Doc.-No-29-Rev-1-2017.pdf>).

IOOC, International Olive Council (2017d). Determination of the content of waxes, fatty acid methyl esters and fatty acid ethyl esters by capillary gas chromatography. COI/T.20/NC No 28/Rev. 2. (september 2017) (<https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/Method-COI-T.20-Doc.-No-28-Rev.2-2017.pdf>).

IOOC, International Olive Council (2018). Method for the organoleptic assessment of virgin olive oil. COI/T.15/NC No 15/Rev. 10 (available on line in: <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/COI-T20-Doc.-15-REV-10-2018-Eng.pdf>)

IOOC, International Olive Council (2019). Spectrophotometric investigation in the ultraviolet. COI/T.20/NC No 19/Rev. 5. (november 2019) (<https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/11/Method-COI-T.20-Doc.-No-19-Rev.-5-2019-2.pdf>).

IOOC, International Olive Council (2019). Trade standard applying to olive oils and olive pomace oils. COI/T.15/NC No 3/Rev. 13 (available on line in: <https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2019/12/trade-standard-REV-14-Eng.pdf>)

IOOC, International Olive Council (2021). Trade standard applying to olive oils and olive pomace oils. COI/T.15/NC No 3/Rev. 17 (november 2021) (available on line in: https://www.internationaloliveoil.org/wp-content/uploads/2021/11/COI-T15-NC3-REV-17_ENK.pdf).

ISO 9000. Sistemas de gestión de la calidad. Fundamentos y vocabulario, 2015. <https://saf.uas.edu.mx/pdf/Certificacion/NORMA%20ISO%209000%202015.pdf>

Jiménez, B., Carpio, A. La cata de aceites: Aceite de oliva virgen. Características organolépticas y análisis sensorial. (2008). Junta de Andalucía. Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera.

Kalua, C., Allen, M., Bedgood, D., Bishop, A., Prenzler, P., & Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, 100(1), 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.059>

Kaziur, W., Wykowski, L., Jochmann, M., Molt, K., Bruchmann, A., & Schmidt, T. (2021). In-tube dynamic extraction a green solventless alternative for a sensitive headspace analysis of volatile organic compounds in olive oils. *Advances in Sample Preparation*, 1, 100002. <https://doi.org/10.1016/j.sampre.2021.100002>

Lacueva, C., Medina-Remon, A., Llorach, R., Urpi-Sarda, M., Khan, N., Chiva-Blanch, G., Zamora-Ros, R., Rotches-Ribalta, M., & Lamuela-Raventós, R. M. (2010). Phenolic Compounds: Chemistry and Occurrence in Fruits and Vegetables. *Fruit and Vegetable Phytochemicals*, 53–88. <https://doi.org/10.1002/9780813809397.ch2>

Luna, G. (2003). Caracterización de aceites de olive vírgenes europeos: implicaciones del análisis sensorial y la actitud de los consumidores. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla, España.

Lobo, A., Tena, N., Aparicio, R., Morales, M. T., & García, D. L. (2020). Tracking Sensory Characteristics of Virgin Olive Oils During Storage: Interpretation of Their Changes from a Multiparametric Perspective. *Molecules*, 25(7), 1686. <https://doi.org/10.3390/molecules25071686>

Magariños, C., Bauzá M. Colour determination of virgin olive oils. *FCA UNCuyo*. (2003), 2, 71-76.

Malik, N.S.A., Bradford, J.M. (2006). Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in ‘Arbequina’ olives. *Scientia Horticulturae* 110, 274-278.

Marx, T., Rodrigues, N., Dias, L. G., Veloso, A. C., Pereira, J. A., Drunkler, D. A., & Peres, A. M. (2017). Sensory classification of table olives using an electronic tongue: Analysis of aqueous pastes and brines. *Talanta*, 162, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.10.028>

Mascrez, S., & Purcaro, G. (2020). Exploring multiple-cumulative trapping solid-phase microextraction for olive oil aroma profiling. *Journal of Separation Science*, 43(9–10), 1934–1941. <https://doi.org/10.1002/jssc.202000098>

Montedoro, G. ; Servilli, M. ; Baldioli, M. ; Selvaggini, R. ; Miniati, E. ; Macchioni, A. Compuestos simples e hidrolizables en aceite de oliva virgen. Caracterizaciones espectroscópicas de los derivados secoiridoides *J. Agric. Química alimentaria* 1993 , 41 , 2228 – 2234

Morales, M., Luna, G., & Aparicio, R. (2005). Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chemistry*, 91(2), 293–301. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.011>

Morales, M.T., Aparicio-Ruiz, R., Aparicio, R. (2013). Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Odor Issues. En: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*, pp. 261-311. Aparicio R. y Harwood J. (Editores). 2° Edición, Springer, New York.

Morales, M. T.; Tsimidoou, M. The role of volatile compounds and polyphenols in olive oil sensory quality. In *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties*; Harwood, J., Aparicio, R., Eds.; Aspen Publishing: Gaithersburg, MD, 2000; pp 393-458.

Neugebauer, A., Granvogl, M., & Schieberle, P. (2020). Characterization of the Key Odorants in High-Quality Extra Virgin Olive Oils and Certified Off-Flavor Oils to Elucidate Aroma Compounds Causing a Rancid Off-Flavor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(21), 5927–5937. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01674>

Noel, J.P., Austin, M.B., Bomati, E.K. (2005). Structure–function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 249-253.

Oliver, C., Aparicio, R., Romero, I., & García, D. L. (2016). Analysis of Volatile Markers for Virgin Olive Oil Aroma Defects by SPME-GC/FID: Possible Sources of Incorrect Data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(48), 10477–10483. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b03986>

Oliver, C., Trypidis, D., Aparicio, R., García, D. L., & Aparicio, R. (2019). Implementing Dynamic Headspace With SPME Sampling of Virgin Olive Oil Volatiles: Optimization, Quality Analytical Study, and Performance Testing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(7), 2086–2097. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b00477>

Pedan, V., Popp, M., Rohn, S., Nyfeler, M., & Bongartz, A. (2019). Characterization of Phenolic Compounds and Their Contribution to Sensory Properties of Olive Oil. *Molecules*, 24(11), 2041. <https://doi.org/10.3390/molecules24112041>

Pérez-Camino, M. C., Moreda, W., & Cert, A. (2001). Effects of Olive Fruit Quality and Oil Storage Practices on the Diacylglycerol Content of Virgin Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 699–704. <https://doi.org/10.1021/jf001064w>

Pérez, M.C., Cert, A., Romero, A., Cert, R., Moreda, W. (2008). Alkyl esters of fatty acids a useful tool to detect soft deodorized olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 6740-6744.

Purcaro, G., Cordero, C., Liberto, E., Bicchi, C., Conte, L. S., (2014). Toward a definition of blueprint of virgin olive oil by comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1334(), 101–111. [doi:10.1016/j.chroma.2014.01.067](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.067)

Reboredo, P., González, C., Cancho, B., Simal, J., (2012). Dynamic headspace/GC–MS to control the aroma fingerprint of extra-virgin olive oil from the same and different olive varieties. , 25(2), 0–695. [doi:10.1016/j.foodcont.2011.12.005](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.12.005)

Rodríguez, E., Rodríguez, C., Fernández, J., Florido, M. C., & Garcia, A. (2020). Phenolic compounds from virgin olive oil obtained by natural deep eutectic solvent (NADES): effect of the extraction and recovery conditions. *Journal of Food Science and Technology*, 58(2), 552–561. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04567-3>

Rodríguez, G., Villanueva, E., Glorio, P., Baquerizo, M. (2015). Oxidative stability and estimate of the shelf life of sachá inchi (*Plukenetia volubilis* L.) oil. *Scientia agropecuaria*, 155–163. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2015.03.02>

Reglamento 1604/2019 27 de septiembre de 2019 por el que se modifica el Reglamento (CEE) n ° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis

Romero del Río (2015) valoración de indicadores de la calidad del aceite de oliva virgen: Fortalezas, debilidades y oportunidades (Tesis Doctoral). Sevilla

Sales, C., Portolés, T., Johnsen, L., Danielsen, M., & Beltran, J. (2019). Olive oil quality classification and measurement of its organoleptic attributes by untargeted GC–MS and multivariate statistical-based approach. *Food Chemistry*, 271, 488–496. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.07.200>

Segura, M. P., Ríos, R., Ubeda, C., Callejón, R. M., & Morales, M. L. (2020). Comparison of the Novel Thin Film-Solid Phase Microextraction and Sorptive Extraction Methods for Picual and Hojiblanca Olive Oil Volatile Fraction Analysis in Headspace. *Foods*, 9(6), 748. <https://doi.org/10.3390/foods9060748>

Servili, M., Baldioli, M., Selvaggini, R., Miniati, E., Macchioni, A., & Montedoro, G. (1999). High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in olive fruit, virgin olive oil, vegetation waters, and pomace and 1D- and 2D-nuclear magnetic resonance characterization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(7), 873–882. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0079-2>

Servili, M., Esposito, S., Fabiani, R., Urbani, S., Taticchi, A., Mariucci, F., Selvaggini, R., & Montedoro, G. F. (2009). Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology*, 17(2), 76–84. <https://doi.org/10.1007/s10787-008-8014-y>

Shake, M. A., Azza, A. A. (2013). Relationship between volatile compounds of olive oil and sensory attributes. *Food Chemistry*, 140, 197–204.

Sinesio, F., Moneta, E., Esti, M. (2005). La evaluación sensorial dinámica de amargor y picante en aceite de oliva virgen. *Food Chemistry*, 96(6), 558–564.

Slim, S., Rodrigues, N., Dias, L. G., Veloso, A. C., Pereira, J., Oueslati, S., & Peres, A. M. (2017). Application of an electronic tongue for Tunisian olive oils' classification

according to olive cultivar or physicochemical parameters. *European Food Research and Technology*, 243(8), 1459–1470. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2856->

Soler, A., (2009). Estudio de la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Primeras etapas en el desarrollo de un aceite de oliva funcional. Tesis Doctoral. Universidad de Lleida

Souayah, F., Rodrigues, N., Veloso, A. C., Dias, L. G., Pereira, J. A., Oueslati, S., & Peres, A. M. (2017). Discrimination of Olive Oil by Cultivar, Geographical Origin and Quality Using Potentiometric Electronic Tongue Fingerprints. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94(12), 1417–1429. <https://doi.org/10.1007/s11746-017-3051-6>

Spadafora, N. D., Mascrez, S., McGregor, L., & Purcaro, G. (2022). Exploring multiple-cumulative trapping solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–mass spectrometry for quality and authenticity assessment of olive oil. *Food Chemistry*, 383, 132438. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132438>

Squeo, G., Grassi, S., Paradiso, V. M., Alamprese, C., & Caponio, F. (2019). FT-IR extra virgin olive oil classification based on ethyl ester content. *Food Control*, 102, 149–156. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.03.027>

Stilo, F., Cordero, C., Sgorbini, B., Bicchi, C., & Liberto, E. (2019). Highly Informative Fingerprinting of Extra-Virgin Olive Oil Volatiles: The Role of High Concentration-Capacity Sampling in Combination with Comprehensive Two-Dimensional Gas Chromatography. *Separations*, 6(3), 34. <https://doi.org/10.3390/separations6030034>

Tovar, M.J., Romero M.P., J. & 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. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5502-5508

Tranchida, Peter Q.; Donato, P., Cacciola, F., Beccaria, M., Dugo, P., Mondello, L., (2013). Potential of comprehensive chromatography in food analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 52(), 186–205. doi:10.1016/j.trac.2013.07.008

Uccella, N. (2001). En Food Flavours and Chemistry: Advances of the New Millennium, Eds. A.H. Spanier, F. Shahidi, T.H. Parliment, C.J. Mussinan, C.T. Ho. The Royal Society of Chemistry Publishers, Cambridge, UK, pp. 253.

Veloso, A., Dias, L., Rodrigues, N., Pereira, J., & Peres, A. (2016). Sensory intensity assessment of olive oils using an electronic tongue. *Talanta*, 146, 585–593. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.08.071>

Veloso, A., Silva, L., Rodrigues, N., Rebello, L., Dias, L., Pereira, J., & Peres, A. (2018). Perception of olive oils sensory defects using a potentiometric taste device. *Talanta*, 176, 610–618. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.08.066>

Vera, F., Ruiz, C., Lahera, V., Lago, F., Pino, J., Skaltsounis, L., González, M. A., Mobasher, A., Gómez, R., Scotece, M., & Gualillo, O. (2019). Natural Molecules for Healthy Lifestyles: Oleocanthal from Extra Virgin Olive Oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 67(14), 3845–3853. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06723>

Vissers, M., Zock, P., Roodenburg, A., Leenen, R., & Katan, M. (2002). Olive Oil Phenols Are Absorbed in Humans. *The Journal of Nutrition*, 132(3), 409–417. <https://doi.org/10.1093/jn/132.3.409>

Wang, S., Chen, H., Sun, B (2020). Recent progress in food flavor analysis using gas chromatography–ion mobility spectrometry (GC–IMS). *Food Chemistry*, (), 126158–. [doi:10.1016/j.foodchem.2019.126158](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.126158)

Wei, L., Qiu, Y., Ze, L., Li, W., & Peng, G. (2018). Rapid Characterization of Triacylglycerols in Edible Oils by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 46(3), 393–399. [https://doi.org/10.1016/s1872-2040\(17\)61073-9](https://doi.org/10.1016/s1872-2040(17)61073-9)

Williams, M., Salas, J.J., Sánchez, J., Harwood, J.L. (2000) Lipoxygenase pathway in olive callus culture (*Olea europaea*). *Phytochemistry* 53, 13-19.

ŽAnetić, M., Jukić ŠPika, M., Ožić, M. M., & Brkić Bubola, K. (2021). Comparative Study of Volatile Compounds and Sensory Characteristics of Dalmatian Monovarietal Virgin Olive Oils. *Plants*, 10(10), 1995. <https://doi.org/10.3390/plants10101995>

Zhang, J., & Hu, B. (2013). Liquid-Liquid Extraction (LLE). Separation and Purification Technologies in Biorefineries, 61–78. <https://doi.org/10.1002/9781118493441.ch3>