Centro de Estudios de Postgrado
Máster Universitario en Olivar y Aceite de Oliva

UNIVERSIDAD DE JAÉN
Centro de Estudios de Postgrado

Trabajo Fin de Máster

TIPOS DE CULTIVOS EN EL OLIVAR. SUS INFLUENCIAS EN LOS PARÁMETROS DE CALIDAD Y CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES DEL ACEITE DE OLIVA

Alumno/a: **GÓMEZ AMATE, LUCÍA**

Tutora: Prof.Dña. Natividad Ramos Martos
Dpto: Química Analítica
Co-Tutora: Dña. Antonia Fernández Hernández
Dpto.: IFAPA Venta del Llano

Julio, 2016

TIPOS DE CULTIVOS EN EL OLIVAR. SUS INFLUENCIAS EN LOS PARÁMETROS DE CALIDAD Y CARACTERÍSTICAS NUTRICIONALES DEL ACEITE DE OLIVA

Esta memoria constituye el Trabajo Fin de Máster y se presenta a la Comisión Evaluadora en Jaén a 6 de julio del año 2016.

Fdo. Lucía Gómez Amate

NATIVIDAD RAMOS MARTOS, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y ANALÍTICA.

Como **TUTORA** de D. Lucía Gómez Amate, en el Máster Universitario en Olivar y Aceite de Oliva, durante el curso 2015-2016

INFORMA: Que el presente trabajo fin de máster, ***Tipos de cultivo en el olivar. Sus influencias en los parámetros de calidad y características nutricionales del aceite de oliva,*** ha sido realizado en los Laboratorios de la Universidad de Jaén y Centro IFAPA de Mengíbar por la Licenciada Lucía Gómez Amate, para la obtención del Título de Máster Universitario en Olivar y Aceite de Oliva por la Universidad de Jaén, bajo la dirección de los Dres. Dña. Antonia Fernández Hernández y Dña. Natividad Ramos Martos

Jaén, julio de 2016

Fdo.: Antonia Fernández Fdo.: Natividad Ramos

AGRADECIMIENTOS

Quiero aprovechar estas líneas para expresar mi sincero agradecimiento a todas esas personas que gracias a su colaboración han contribuido en la realización de este Trabajo Fin de Máster.

En primer lugar, agradecer a Antonia Fernández Hernández y Natividad Ramos Martos tutoras de este Trabajo Fin de Máster por sus consejos, ayuda y dedicación durante el desarrollo de este trabajo.

Agradecer también al Departamento de Química-Física y Analítica de la Universidad de Jaén, así como al IFAPA Centro Venta del Llano de Mengíbar (Jaén), por dejar sus instalaciones para poder desarrollar este trabajo.

A mi familia, en especial a mi novio por estar ahí siempre y ayudarme en todo momento en el desarrollo de este trabajo, y a mi abuelo que tan orgulloso estaba de mí por mi carrera académica.

No olvido a todos mis compañeros del Máster, con los que he pasado tanto tiempo durante este año, y nos hemos ayudado mucho los unos a los otros, siempre os llevaré conmigo.

ÍNDICE

1. RESUMEN…..…… 3
2. INTRODUCCIÓN…… 6
2.1. El olivar…… 7
2.1.1. Origen e historia del olivo…… 7
2.1.2. Descripción botánica del olivo…… 8
2.1.3. El olivar en el mundo…… 9
2.1.4. El olivar en España…….. 10
2.1.5. El olivar en Andalucía…… 15
2.2. El aceite de oliva virgen extra (AOVE)……... 18
2.2.1. Proceso de obtención del AOVE…….. 19
2.2.2. Criterios de calidad y pureza……. 24
2.2.3. Composición del AOVE…….. 25
2.2.4. Aspectos nutricionales del AOVE……. 31
2.3. Sistemas de cultivo y prácticas agrícolas en el olivar…… 32
2.3.1. Tratamientos fitosanitarios……... 34
2.3.2. Olivar ecológico…….. 38
2.3.3. Reglamentación en el olivar……. 39
3. OBJETIVOS……. 42
4. MATERIAL Y MÉTODOS…….. 44
4.1. Instrumentación científico-técnica……. 45
4.2. Reactivos……... 45
4.3. Equipos e instrumentación……. 46
4.3.1. Espectrofotometría UV-Vis……... 47
4.3.2. Cromatografía de gases……... 48

4.3.3. Cromatografía de líquidos…… 51
4.3.4. Cromatografía de ultra-alta resolución (UPLC)…… 54
4.4. Muestras…… 54
4.5. Métodos analíticos…… 54
4.5.1. Determinación de la Acidez…… 55
4.5.2. Determinación del índice de peróxidos…… 55
4.5.3. Medida espectrofotométrica de absorción en la región ultravioleta (K_{232} y K_{270})…… 56
4.5.4. Pigmentos clorofílicos y carotenoides…… 57
4.5.5. Determinación de los tocoferoles…… 58
4.5.6. Determinación de los triterpenos…… 59
4.5.7. Polifenoles cualitativos…… 60
4.5.8. Determinación de plaguicidas…… 62
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN…… 63
6. CONCLUSIONES…… 78
7. BIBLIOGRAFÍA…… 80

1. RESUMEN

RESUMEN

En el presente Trabajo Fin de Máster, se plantea la influencia del sistema de cultivo, convencional y ecológico, sobre la calidad y composición del Aceite de Oliva Virgen Extra.

Para llevar a cabo dicho objetivo, se seleccionaron diferentes muestras procedentes de parcelas de olivar tradicional adulto de la variedad ‘Picual’ bajo sistema convencional (finca experimental del IFAPA Centro Venta del Llano) y ecológico (muestras comerciales y procedentes de la finca experimental del IFAPA Centro Venta del Llano). Las muestras de Aceites de Oliva Virgen fueron seleccionas las de recolección temprana para evitar el efecto de maduración y condiciones climatológicas y de elaboración, sobre los parámetros a analizar.

Sobre las muestras de aceite seleccionadas, se determinó su calidad reglamentada (índice de acidez, índice de peróxidos y coeficientes ultravioleta K_{232} y K_{270}), calidad nutricional y terapéutica (pigmentos carotenoides y clorofílicos, tocoferoles, ácidos y alcoholes triterpénicos, y composición fenólica) y calidad en seguridad alimentaria (plaguicidas).

Una vez analizados los resultados obtenidos en los aceites, respecto a la calidad reglamentada, se comprobó que se encontraban todos dentro de la categoría “Aceite de Oliva Virgen Extra” y los parámetros de composición se situaban dentro de los niveles establecidos para un aceite de la variedad ‘Picual’ bajo condiciones controladas y en el momento óptimo de maduración.

A partir de los datos obtenidos, se considera que el sistema de cultivo no afecta negativamente ni a la calidad ni a la composición nutricional y terapéutica del Aceite de Oliva Virgen.

ABSTRACT

In this Master´s Thesis research, there appears the influence of the system of culture, conventional and ecologically, on the quality and composition of the Virgin Olive oil Extra.

For it, we select different samples, these samples proceed from plots of conventional olive of the variety 'Picual' (experimental estate of the IFAPA) and ecologically (samples commercial and samples proceeding from the experimental estate of the IFAPA). The samples of Virgen Olive Oil are of early compilation to avoid the effect of ripeness and climatological conditions and of production, on the parameters to analyzing.

In de samples, we analyze his regulation quality (acid value, peroxide value and K_{232} and K_{270}), nutritional and therapeutic quality (pigments carotenoides and chlorophyll, tocoferoles, acids and alcohols triterpénicos, and phenolic composition) and quality in food safety (pesticides).

We have verified that all the samples were “Virgen Olive oil Extra” and the parameters of composition were inside the levels established for oil of the variety 'Picual' and in the ideal moment of ripeness.

We think that the system of culture concerns negatively neither the quality nor to the nutritional and therapeutic composition of the Virgin Olive oil

2. INTRODUCCIÓN

2.1. EL OLIVAR

2.1.1. Origen e historia del olivo

El olivo es el árbol más extendido en toda la Cuenca Mediterránea. Es un elemento de gran importancia para el medio ambiente, para parte de la fauna ibérica, y por su función contra la erosión y desertización.

Algunos historiadores, como el caso de De Candolle, consideraron que el olivo silvestre es originario de Asia Menor meridional, pero su cultivo para la obtención de aceite comenzó en la época paleolítica y neolítica (5000 a 3500 a.C.) en Creta. También se creía la existencia de olivos salvajes en España, Norte de África y Grecia, por lo que no hay un origen exacto del olivo. Los pueblos de Siria se encargaron de transformar el olivo silvestre en un olivo cultivado, entrando en Europa por el Sureste del Mediterráneo (Picornell y Melero, 2013). El olivo pasó del Asia Menor a Grecia y a las islas del Archipiélago. Siendo cultivado mucho más tarde en la Grecia continental. Se extendió el cultivo a Chipre, Argelia, Marruecos, Túnez y otros lugares. Se cree que fue por los navegantes fenicios.

Posteriormente, los romanos extendieron el cultivo por los territorios de las costas mediterráneas. En España, se introdujo su cultivo con los fenicios (1050 a.C), que aportaron procedimientos para la obtención del aceite, desarrollándose con el dominio de Roma (45 a.C.). Los árabes influyeron en la difusión del cultivo, hasta llegar al punto de introducir vocablos como aceite (zeit), aceituna o acebuche.

En el siglo X a.C. el olivo se introdujo en Andalucía. Con el imperio romano alcanzó su mayor esplendor. La zona de gran producción y comercio del Aceite de Oliva fue en el sur de la península (Ávida y Fernández, 2009).

El olivo en los tiempos más modernos ha continuado su expansión más allá de la cuenca Mediterránea, llegándose a cultivar en lugares muy alejados de su origen, como es Australia, Japón o China (Consejo Oleícola Internacional, 2016). En la Figura 2.1 se puede ver la expansión del olivo por el mediterráneo.

Figura 2.1. Expansión del olivo por el mediterráneo. Fuente: FAO, 2010

2.1.2. Descripción botánica del olivo

El olivo "*Olea europaea L*." es de la familia botánica *Oleaceae*. La especie de plantas de esta familia está distribuida por las regiones templadas y tropicales del mundo. Es del género *Olea L*. y especie *Olea europaea L*., se considera que los olivos cultivados vienen de la subespecie *"sativa"* y los silvestres de la subespecie *"sylvestris".* La especie *Olea europaea L.*, es la única de la familia *Oleaceae* con fruto comestible (F. Rapoport, 2008).

La aceituna (Figura 2.2) fruto del olivo, tiene coloración verdosa oscura una vez madura. Está compuesta por endocarpo (20-30%), hueso leñoso cuyo interior se encuentra la semilla, mesocarpo (68-86%), la pulpa, exocarpo (1-2%), y la capa exterior o piel. En cuanto a su composición, el componente mayoritario es el agua (50%), seguido del aceite (22%), azúcares (19%), celulosa (1,6%), vitaminas y compuestos fenólicos en menor proporción.

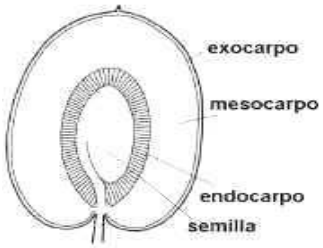

Figura 2.2 Partes de la aceituna. Fuente: www.biologia.edu.ar

Hay varios factores de los que depende la maduración del olivo (Barranco y cols., 1997), los cuales son:

- Edad (la maduración de un fruto de un árbol joven es antes por tener un metabolismo más rápido)
- Variedad
- Estado (si está enfermo puede tener problemas de maduración)
- Técnicas de cultivo
- Factores ecológicos
- Humedad (en épocas secas se retrasa la maduración del fruto)
- Luz (a mayor luz antes madura)

2.1.3. El olivar en el mundo

El olivo se concentra en regiones climáticas tipo Mediterráneo, con un verano seco y caluroso. Se estima que existen 1000 millones de olivos, los cuales ocupan una superficie de 10 millones de hectáreas. De estas, el 98% se sitúan en la Cuenca Mediterránea, el 1.2% en el continente americano, 0.4% en Oceanía y el otro 0.4% en Asia Oriental (Civantos, 2008). En la Figura 2.3 se puede ver la producción mundial del Aceite de Oliva.

Figura 2.3. Producción mundial del aceite de oliva. COI, 2013-2014

En la Figura 2.4 se puede comparar la cosecha de la campaña anterior (2013-2014) con otra más actualizada (2014-2015).

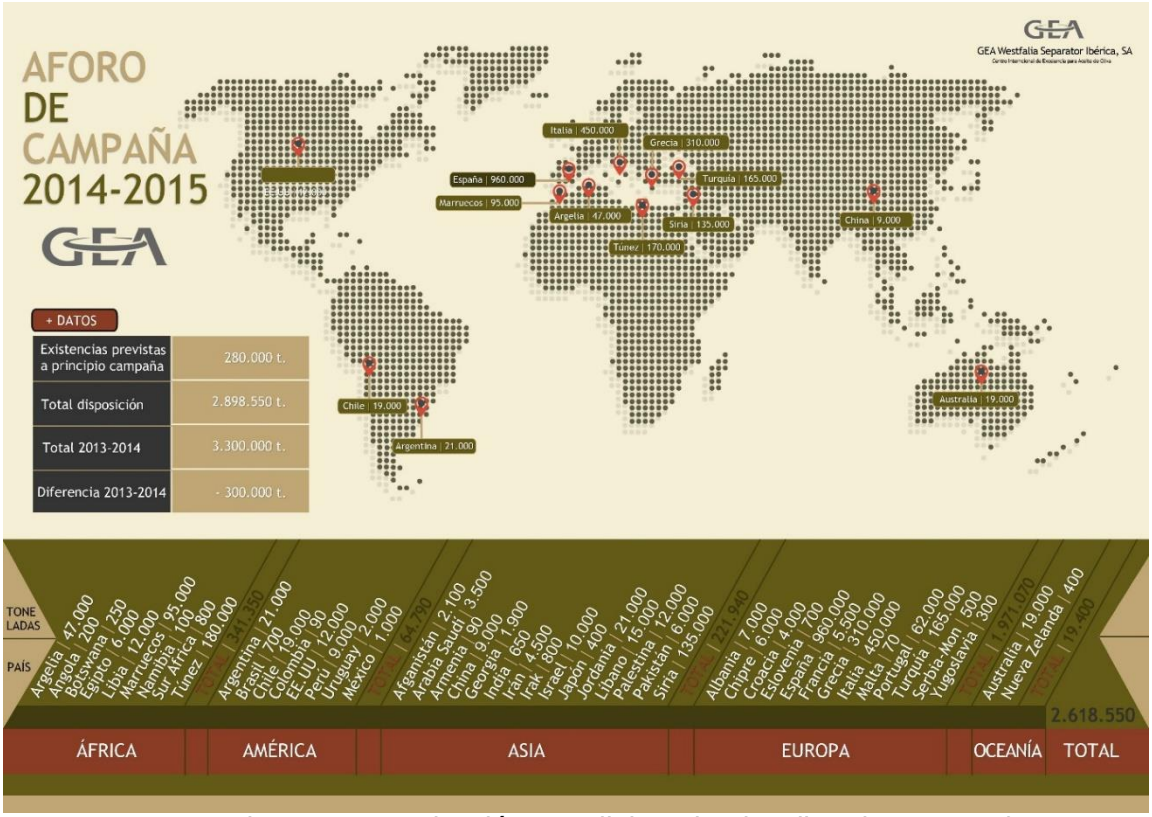

Figura 2.4. Producción mundial Aceite de Oliva. (2014-2015)

En cuanto a la producción, se alcanza una media anual de 16 millones de toneladas de aceitunas, el 90% de estas son destinadas a aceite, mientras que el 10% se destinan a aceitunas de mesa (Civantos, 2008).

2.1.4. El olivar en España

España es el territorio con mayor producción de aceitunas a escala mundial. Las únicas no productoras son la Comunidad Autónoma de Galicia, Asturias y Cantabria (Civantos, 2008). En la Figura 2.5 se representa el % de la distribución provincial de la superficie de olivar en España, en el año 2015.

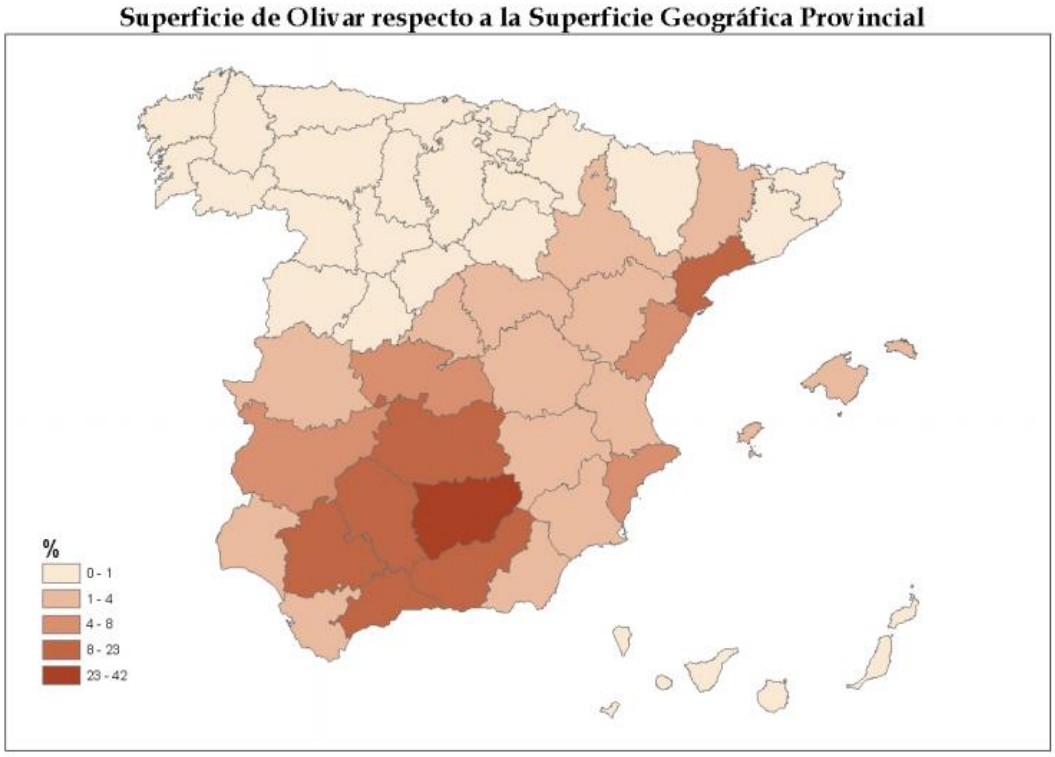

Figura 2.5. Superficie de Olivar en España. Fuente: ESYRCE (MAGRAMA, 2015)

Como se puede ver en la Figura 2.5, las Comunidades Autónomas de Extremadura y Andalucía con respecto al cultivo de olivar total, se encuentran en cabeza. Andalucía es la primera Comunidad Autónoma con mayor superficie de olivar en España, el 43.9% de las tierras de cultivo, representa al olivar. Seguida de Castilla la Mancha, pero esta solo supone un 11% de su superficie agrícola. En cuanto a la superficie geográfica provincial, Jaén con un 43.4% de la superficie provincial está ocupada por cultivo de olivar. Seguida de Córdoba, Málaga y Granada con un 15% y Sevilla que está próxima a ese 15% (MAGRAMA, 2015).

España es el primer lugar mundial en cuanto a superficie y producción de Aceite de Oliva. De la producción de la Unión Europea, España representa un 60% y de la producción en el mundo, representa el 45%.

Hay una superficie de 2.584.564 ha dedicadas a este cultivo, en la Tabla 2.1 se puede ver la producción y superficie del olivar de España en diferentes campañas según los datos aportados por el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), y los datos proporcionados por el Consejo Oleícola Internacional (COI).

Tabla 2.1. Superficie y producción del olivar. Fuente: elaboración propia, (MAGRAMA, 2013; COI, 2015)

AÑO DE LA CAMPAÑA	MAGRAMA	MAGRAMA	COI
	Superficie cultivo (x 1000ha)	Producción cultivo (x 1000t)	Producción cultivo (x 1000t)
2010/2011	2468.1	1392.3	1391.9
2011/2012	2471.5	1615.2	1615.0
2012/2013	2473.2	618.1	618.2
2013/2014	-	-	1781.5
2014/2015 (prov)	-	-	841.2
2015/2016 (prév)	-	-	1300.0

El Ministerio de Agricultura en 1972 dividió a España según la producción oleícola en las siguientes regiones (Figura 2.6):

- Picual. El predominio de la variedad 'Picual', ocupa la provincia de Jaén en su totalidad, el norte de Granada y el este de Córdoba. Tiene una extensión de 700000 ha destinadas a la producción de Aceite de Oliva, caracterizado por su alto contenido en polifenoles y ácido oleico.
- Hojiblanca. Zona con la mayor parte de la variedad 'Hojiblanca', 430000 ha, son ocupadas por la provincia de Córdoba, comarca de Estepa en Sevilla, comarca de Loja en Granada y comarca de Antequera en Málaga. Es una variedad cuyo fruto presenta características peculiares, ya que es una variedad de doble aptitud, se puede elaborar aceitunas de mesa, especialmente negra, pero también se obtiene aceites de muy buena calidad, apreciados para el mercado español.

- Andalucía Occidental. Se extiende por las provincias de Huelva, Cádiz, Sevilla y por la comarca de La Carlota en Córdoba, con unas 230000 ha. Son productoras de aceite o aceitunas de mesa. Predominan para la obtención de aceite las variedades 'Lechín de Sevilla', 'Hojiblanca', 'Verdial de Huévar' y 'Manzanilla Serrana'. En cuanto a la obtención de aceitunas de mesa, predomina la variedad 'Manzanillo' y 'Gordal Sevillana'.

- Andalucía Oriental. Incluye Almería, Granada y Málaga. Las variedades principales destinados a aceite son 'Lechín de Granada', 'Verdial de Vélez-Málaga', 'Aloreña' y 'Picual de Almería'. La superficie de olivar es de 120000 ha.

- Oeste. Incluye las zonas de Ávila, Salamanca, Zamora y las provincias extremeñas, Cáceres y Badajoz. Tiene una extensión de 270000 ha, y destacan las variedades: 'Manzanilla Cacereña', 'Manzanilla', 'Carrasqueña de Badajoz', 'Morisca', 'Verdial de Badajoz' y 'Cornicabra'. La variedad 'Manzanilla Cacereña' es adecuada para la elaboración de aceituna de mesa negra, y para aceituna de mesa verde la más adecuada es la 'Carrasqueña'. La demás variedades suelen usarse para aceite.

- Centro. Pertenece a las Comunidades Autónomas de Castilla- La Mancha y de Madrid, con 360000 ha. Predominan las variedades: 'Cornicabra', 'Castellana', 'Alfafara' y 'Gordal de Hellín'. Estas suelen ser destinadas para aceite, destacando los aceites de 'Cornicabra', que tienen gran prestigio.

- Levante. Comprende las provincias de Murcia, Alicante y Valencia. Tiene unas 90000 ha de olivar. Sus variedades son 'Blanqueta', 'Villalonga', 'Changlot Real', 'Lechín de Granada', 'Cornicabra'.

- Valle del Ebro. Abarca Aragón, La Rioja, Navarra y Álava. La variedad predominante es la 'Empeltre', seguida de 'Verdeña', 'Farga', 'Royal de Catayud'. Tiene una extensión de olivar de 65000 ha. Se producen aceites de alta calidad.

- Tortosa - Castellón. Comprende Tarragona, y la provincia de Castellón, con unas 85000 ha de olivar. Las variedades son 'Farga', 'Morrut', 'Sevillenca', 'Empeltre'. Se destinan a la obtención de aceites, que utilizando técnicas adecuadas, son de buena calidad.

- Arbequina. Ocupada por Cataluña, Bajo Ebro-Montsiá, y Baleares. Tiene una extensión de 80000 ha de olivar. Predominan las variedades 'Arbequina', 'Verdiell', 'Empeltre', 'Argudell', etc. Sus aceites son de alta calidad, son frutados al inicial la campaña y dulces después de las primeras heladas (Civantos, 2008).

Figura 2.6. Zonas olivareras de España. Fuente: www.esenciadeolivo.es

En España, existen 172390 ha dedicadas a olivar ecológico, siendo 172093 ha pertenecientes a olivar destinado a aceite y 297 ha a olivar destinado a aceitunas de mesa. De las 172390 ha, 150397 ha corresponde a la categoría Calificada como Agricultura Ecológica, 11969 ha corresponden a agricultura Calificada en Conversión y el resto, 10024 ha se califica como Primer Año de Prácticas (Tabla 2.2) (MAGRAMA, 2014).

Tabla 2.2. Superficie de cultivo olivar ecológico España. Fuente: elaboración propia (MAGRAMA, 2014)

DESTINO	SUPERFICIE CULTIVADA INSCRITA (HA)				PRODUCCIÓN ECOLÓGICA ESTIMADA (TM)
	En primer año de prácticas	En conversión	En agricultura ecológica	Superficie total	
Olivar	10024	11969	150397	172390	162593
Olivar para aceitunas de mesa	24	8	265	297	553
Olivar para aceite	10000	11961	150132	172093	162040

En caso de comunidades autónomas, destaca Castilla-La Mancha y Andalucía, siendo las comunidades autónomas con mayor número de hectáreas dedicadas a olivar ecológico (Tabla 2.3).

Tabla 2.3. Hectáreas dedicadas a olivar ecológico por Comunidades Autónomas (MAGRAMA, 2015).

COMUNIDADES AUTÓNOMAS	SUPERFICIE DE OLIVAR (HA)
Castilla la Mancha	62222
Andalucía	58004
Extremadura	31537
Cataluña	6624
Comunidad Valenciana	3401
Madrid	3322
Murcia	3006
Aragón	2348
La Rioja	639
Baleares	573
Navarra	469
Castilla y León	168
Canarias	53
País Vasco	16
Galicia	2

2.1.5. El olivar en Andalucía

El cultivo de olivar en la Comunidad Autónoma de Andalucía ocupo algo más del 30% de superficie agraria, con unas 1.52 millones de hectáreas, destacando su importancia en la provincia de Jaén, Córdoba, noroeste de Granada, norte de Málaga y sudeste de Sevilla. Jaén y Córdoba son la principales provincias, con un 60% de la superficie de olivar de Andalucía. Seguidas de las provincias de Sevilla, Granada y Málaga. Ocupando solamente el 5.1% las provincias de Cádiz, Huelva y Almería del olivar andaluz (Figura 2.7).

Figura 2.7. Superficie de olivar en Andalucía. Fuente: Junta de Andalucía (2015).

En la siguiente tabla se puede ver la superficie de olivar de España y Andalucía, comparando el uso de olivar destinado para aceitunas de mesa, doble actitud o aceituna para almazara (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Superficie olivar (ha). Fuente: Elaboración propio con datos de ESYRCE, MAGRAMA (2015)

PROCEDENCIA	OLIVAR ACEITUNA DE MESA	OLIVAR DOBLE ACTITUD	OLIVAR ACEITUNA ALMAZARA	OLIVAR TOTAL
Andalucía	55	70	1443	1568
España	75	75	2455	2605

En cuanto a las variedades predominantes en Andalucía, la dominante sería ‘Picual’, con 59,6% del olivar andaluz, ‘Hojiblanca’ representa el 17,8 % de la superficie total y ‘Manzanilla de Sevilla’ el 4,9%. En cuanto a uso de estas variedades, la variedad ‘Picual’ se destina a la producción de Aceite de Oliva, la ‘Manzanilla de Sevilla’ es destinada a producción de aceitunas de mesa y la ‘Hojiblanca’, tiene doble aptitud, se destina normalmente a mesa el 15% y el 20% de su producción. Otra variedad importante sería la ‘Gordal Sevillana’, la cual su destino es principalmente a aceituna de mesa. La ‘Gordal Sevillana’ representa solo el 1% de la superficie de olivar andaluz. Pero la superficie de esta, como de la ‘Manzanilla de Sevilla’ se ha ido reduciendo poco a poco.

También habría que destacar, que a finales de los años noventa se fue introduciendo en Andalucía las plantaciones de olivar superintensivo, en estas plantaciones se utiliza principalmente la variedad 'Arbequina', por su adaptación a este sistema de cultivo (Figura 2.8). También se está poniendo en valor en determinadas zonas las variedades 'Royal', 'Picudo' o 'Aloreña' según el Plan director del olivar andaluz (Plan Director del Olivar Andaluz, 2011). Y otras variedades para combatir ciertos factores como que sean resistentes a enfermedades como el caso de la verticilosis.

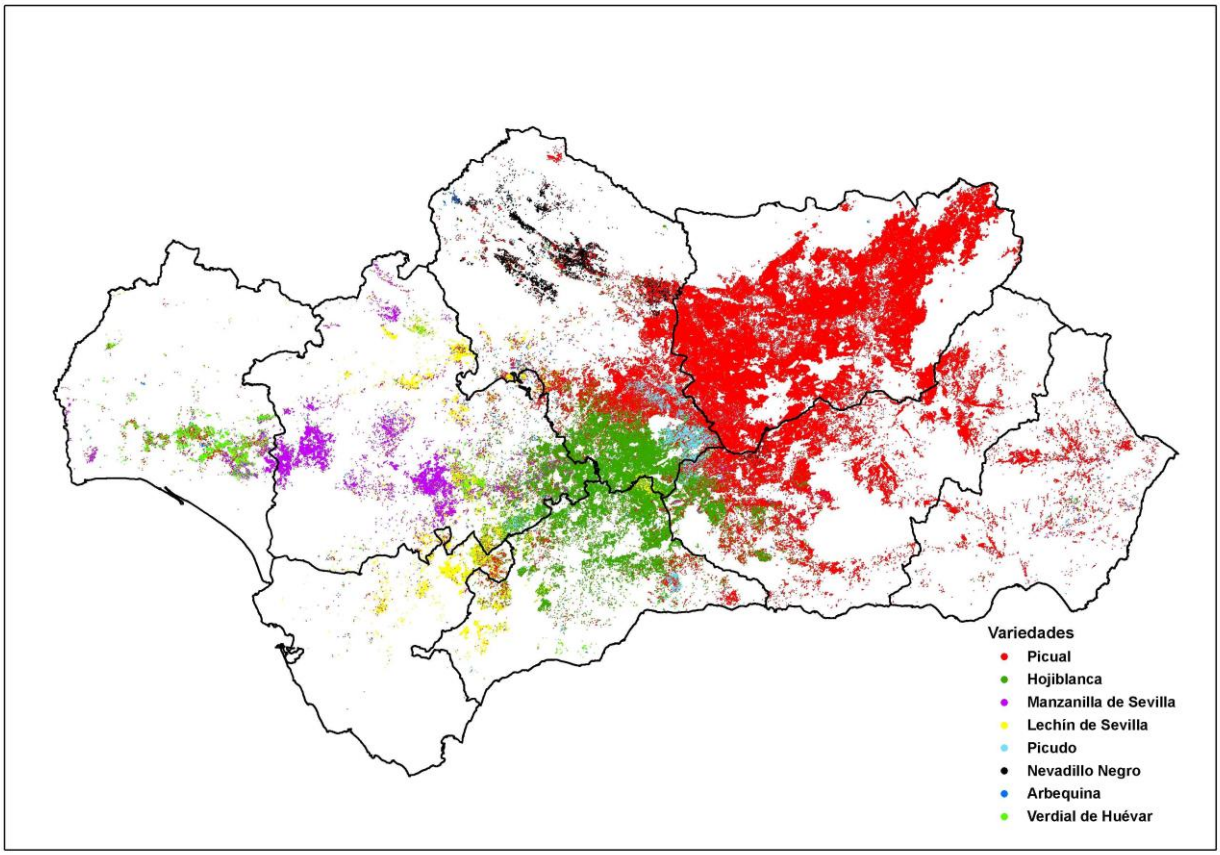

Figura 2.8. Principales variedades de olivar en Andalucía. Fuente: Junta de Andalucía (2011).

En Andalucía, hay 58004 ha dedicadas a olivar ecológico, siendo 57736 ha pertenecientes a olivar destinado a aceite y solo 268 ha de olivar destinado a aceitunas de mesa. De las 58004 ha, 50298 ha corresponde a la categoría Calificada como Agricultura Ecológica, 3552 ha corresponden a agricultura Calificada en Conversión y el resto, 4154 ha se califica como Primer Año de Prácticas (Tabla 2.5) (MAGRAMA, 2014).

Tabla 2.5. Superficie de cultivo olivar ecológico Andalucía. Fuente: elaboración propia proporcionada por MAGRAMA (2014)

TIPO OLIVAR	SUPERFICIE CULTIVADA INSCRITA (HA)				PRODUCCIÓN ECOLÓGICA ESTIMADA (TM)
	En primer año de prácticas	En conversión	En agricultura ecológica	Superficie total	
Olivar	**4154**	**3552**	**50298**	**58004**	**69469**
Olivar para aceitunas de mesa	**12.32**	**4.81**	**251**	**268**	**504**
Olivar para aceite	**4142**	**3547**	**50047**	**57736**	**68965**

2.2. EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

Los aceites de oliva vírgenes son los obtenidos del fruto del olivo (*Olea europaea L*.), se obtienen solamente por procedimientos mecánicos o físicos, con unas condiciones térmica, las cuales no alteren el aceite, sin tener tratamientos más que el lavado, decantación, centrifugación y filtración (Consejo Oleícola Internacional, 2016).

Los Aceites de Oliva se clasifican según el Reglamento (CE) nº 1989/2003 de la Comisión de 6 de noviembre de 2003. En cada categoría se establece unos niveles para sus características físico-químicas. Para determinar las distintas categorías, se emplean unos métodos de análisis y parámetros físico-químicos recogidos en el Reglamento (CEE) Nº 2568/91 de la comisión de 11 de julio de 1991, relativo a las características de los Aceites de Oliva Virgen, Aceites de Oliva y Aceites de Orujo de Oliva.

El Aceite de Oliva Virgen Extra (AOVE) es el aceite de mayor calidad. Es obtenido con normas muy estrictas en su tratamiento y su elaboración. La aceituna, recogida en el punto óptimo de madurez y perfectamente sana, se extrae su aceite en condiciones controladas y solamente por mecanismos físicos y a bajas temperaturas (COI, 2016).

2.2.1. Proceso de obtención del Aceite de Oliva Virgen (AOV)

El esquema del proceso de obtención del Aceite de Oliva Virgen se puede ver en la Figura 2.9.

Figura 2.9. Proceso de obtención de Aceite de Oliva virgen. Fuente: elaboración propia.

- Recogida

Uno de los procesos más importantes sería el de la recolección, este paso es muy importante para la calidad del aceite procesado. Para realizar este proceso, el agricultor puede hacer la recogida de la aceituna de forma manual (vareo o por ordeño) o mecanizada. Con el índice de madurez de la aceituna se puede saber cuándo está la aceituna en un grado idóneo de recogida. Hay evidencias científicas que afirman que los antioxidantes del fruto disminuyen con la maduración de la aceituna, por eso motivo, se hacen cada vez aceites más verdes, con un índice de madurez más bajo, para la obtención de Aceite de Oliva Virgen de mayor calidad, los cuales tienen mayor contenido en antioxidantes (Cerretani y cols., 2009) (Figura 2.10)

Figura 2.10. Proceso de recolección aceituna. Fuente: Revista “Cosas de comé” (2016).

- Molienda

El objetivo de la molienda es romper la pulpa, para así también romper, las células del parénquima las cuales contienen las vacuolas con pequeñas gotitas de aceite. Actualmente, para ello se usan molinos mecánicos de martillo, los más habituales, de discos dentados o de cilindros estriados, todos producen la rotura celular y así salida de la grasa. Lo difícil del proceso sería intentar que las gotas de aceite no se emulsionen en el líquido acuoso y deben de formar grandes masas por la atracción de su tensión superficial. El producto obtenido es la pasta, formada por agua de vegetación, aceite y materia sólida procedente de la piel y del hueso de la aceituna (Del Castillo y cols., 2007).

- Batido

La pasta que se obtuvo anteriormente en el proceso de molienda, se bate para así poder favorecer la salida del aceite. Las gotas de aceite se juntan formando una fase oleosa separable de la fase acuosa (alpechín o aguas de proceso) y la fase de sólidos (orujo o alperujo). Para que no se pierdan los compuestos aromáticos y no

se acelere la oxidación, es muy importante no sobrepasar los 30ºC en el batido (Del Castillo y cols., 2007).

- Extracción

Se distinguen dos métodos de extracción: discontinuo y tradicional de prensas, y el continuo de extracción por centrifugación que fue adoptado en las últimas décadas por la industria oleícola (Kapellakis y cols., 2008).

Existen dos sistemas distintos de centrifugación: sistema de centrifugación de tres salidas o fases y sistema de centrifugación de dos salidas o fases. Se sustituyó el sistema de tres salidas, y actualmente, más del 90% de las industrias trabajan con el sistema de extracción de aceite de oliva de dos salidas (Roig y cols., 2006). Esta sustitución fue debida a razones medioambientales más que tecnológicas, pero en otros países productores no se llevó a cabo, debido a un nuevo residuo producido, el alperujo.

a) Sistema de extracción de prensa

Este sistema de prensa hidráulica (Figura 2.11), se utilizaba en España para la extracción de Aceite de Oliva hasta finales de la década de los sesenta. La pasta obtenida de la aceituna una vez lavada, molida y batida, se deposita sobre un material filtrante o capacho, y se somete a la acción de una prensa, que mediante presión, se separan las fases presentes en la pasta. La fase líquida está formada por una mezcla de aceite con el agua residual y una fase sólida llamada orujo de aceituna (García-Frías y Ortiz, 1995).

Para separar estas fracciones líquidas, agua y aceite, se hace a través de la centrifugación o decantación, o incluso combinando las dos técnicas. Como resultado se obtiene el aceite y dos subproductos, uno sólido conocido como orujo seco y otro líquido, alpechín.

Este proceso al ser discontinuo, precisa de mayor mano de obra, consigue unos rendimientos horarios bajos, y se producen problemas de fermentaciones, alterando la calidad del aceite obtenido (Tardáguila y cols., 1996).

Figura 2.11. Sistema de prensas para la extracción de aceite de oliva.

b) Sistema continuo de centrifugación de tres salidas

El sistema de extracción de tres salidas (Figura 2.12) se introdujo en España a partir de los años 70 del pasado siglo, introduciendo una importante modificación en la tecnología de la extracción del aceite de oliva virgen (Garcia-Ortiz y cols., 1993).

La principal ventaja fue el incremento de la productividad, y al ser un proceso de extracción continuo, habrá un menos coste de producción y se obtiene un aceite de mejor calidad.

La centrifuga horizontal o decanter, lleva a cabo una separación entre el aceite, orujo y agua residual por diferencias de densidades. Se obtienen tres elementos diferenciados. Pero este sistema genera mayor cantidad de alpechín que el sistema de prensa.

Figura 2.12. Decanter de tres salidas.

Actualmente se han ido sustituyendo casi todos los decánter de tres salidas por los de dos salidas, debido a que en los de tres salidas se necesita mayor de consumo de agua y así hay una mayor producción de alpechín (Cerratani y cols., 2009).

c) Sistema continuo de centrifugación de dos salidas

En este proceso no hay una adición de agua del exterior, por ese motivo, el volumen de la fase acuosa o alpechín es exclusivamente del agua de vegetación del propio fruto.

En la centrifugación se obtiene una fase oleosa (aceite con agua y partículas sólidas finas), una fase sólida, caracterizada por tener una gran humedad (orujo con una cantidad mayor de agua que en el sistema continuo de tres fases, con algo de aceite) denominado alperujo o alpeorujo.

La gran diferencia entre el sistema continuo de centrifugación de dos y tres salidas es el subproducto obtenido y el agua añadida. La adición de agua afecta al contenido en compuestos fenólicos del aceite, disminuyendo al añadir mayor cantidad de agua, y a la calidad del aceite (Cerratani y cols., 2009).

2.2.2. Criterios de calidad y pureza

El Aceite de Oliva Virgen es un producto totalmente natural, por eso en su elaboración es muy importante tener en cuenta una serie de factores para poder mantener su calidad. El aceite puede tener un deterioro debido a la hidrólisis, la reacción entre el agua y los triglicéridos del aceite, dando lugar a la formación de ácidos grasos libres, o a las reacciones de oxidación, las cuales rompen los ácidos grasos, originan alcoholes, cetonas, aldehídos determinando el enranciamiento del aceite (Lorenzo y cols., 2009).

En el presente trabajo se ha estudiado la calidad de aceites procedentes de diferentes técnicas de cultivo, tradicional y ecológico. La calidad de un Aceite de Oliva depende de factores agronómicos (técnicas de cultivo), factores ambientales (clima y suelo), y genéticos (variedad de aceituna). La calidad de un Aceite de Oliva Virgen se analiza aplicando la normativa vigente (Reglamento CEE 1348/2013) caracterizándolo según sus parámetros químicos y análisis sensorial, recogido en la misma. De aquí surge la clasificación en: Aceite de Oliva Virgen Extra, Aceite de Oliva Virgen y Aceite de Oliva Lampante.

El Consejo Oleícola Internacional ha ido elaborando esos métodos de análisis fisicoquímicos de los Aceites de Oliva para poder diferenciar cada denominación y comprobar la autenticidad (COI, 2016).

Para sus análisis fisicoquímicos, se emplean métodos oficiales ya validados, se basan en técnicas clásicas como las valoraciones volumétricas, cromatografía de gases y líquida y la espectrofotometría (Lozano y cols., 2009). Las técnicas empleadas para los análisis de calidad y pureza del aceite de oliva, así como los contaminantes con sus parámetros objeto de análisis se recogen en la Tabla 2.6 (Lozano y cols., 2009). La explicación de estas técnicas se puede ver en el Capítulo 4.5 del presente trabajo.

Tabla 2.6. Determinaciones que se llevan a cabo para el análisis de Aceite de Oliva. (Quirantes y cols., 2009)

	PARÁMETROS	TÉCNICA DE ANÁLISIS
Calidad	Acidez	Valoración ácido-base
	Índice de peróxidos	Valoración redox
	Absorbancia a 270 y 232 nm	Espectrofotometría
	Humedad y materias volátiles	Calorimetría diferencial
	Impurezas insolubles en éter de petróleo	
Pureza	Triglicéridos	Cromatografía líquida
	Ácidos grasos	Cromatografía de gases con detector de ionización de llama
	Ceras	
	Esteroles	
	Eritrodiol + Uvaol	
	Alcoholes alifáticos	
	Estigmastadienos	
	2-monopalmitato	
Contaminantes	Disolventes halogenados	Cromatografía de gases de captura electrónica
	Plaguicidas	Cromatografía de gases y cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas
	Benzopireno	Cromatografía líquida con detector de fluorescencia

2.2.3. Composición del Aceite de Oliva Virgen

La composición del Aceite de Oliva Virgen se divide en dos fracciones (Figura 2.13): una fracción mayoritaria que forma parte del 98-99% del peso total del aceite (fracción saponificable) y una minoritaria que representa solo el 2% del peso del Aceite de Oliva Virgen (fracción insaponificable), en la que se incluyen los compuestos polares y volátiles.

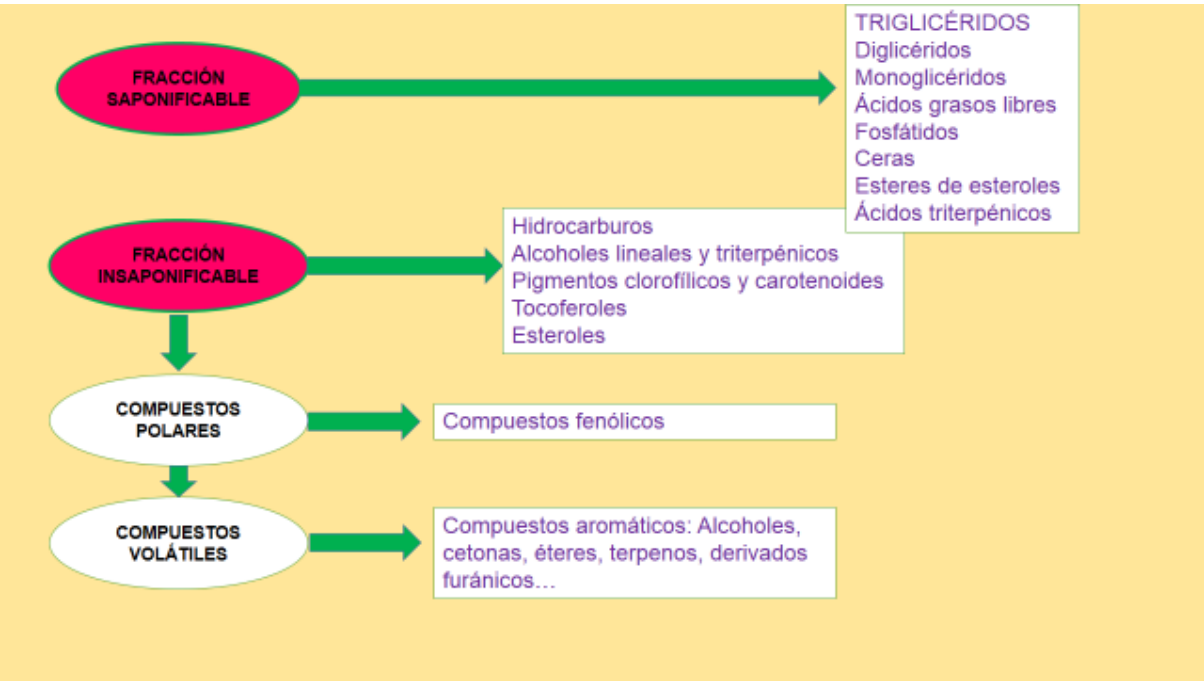

Figura 2.13. Composición del Aceite de Oliva desde el punto de vista analítico.
Fuente: Elaboración propia

- Fracción mayoritaria o saponificable

En esta fracción está en mayor medida los triglicéridos (Figura 2.14), los cuales son los componentes principales. En una proporción menor se encuentran los diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres, etc.

Dentro de esta fracción, están los ácidos grasos, que son sustancias constituidas por una larga cadena hidrocarbonada, teniendo en un extremo un grupo carboxílico (COOH). Los ácidos grasos pueden encontrarse saturados (sin dobles enlaces carbono-carbono) o insaturados (poseen uno o varios dobles enlaces). En el Aceite de Oliva, el número de átomos de carbono varía entre 16 y 24, encontrando un número de dobles enlaces entre 0 y 3.

Se pueden encontrar en el aceite de oliva tal cual, que son los denominados ácidos grasos libres, los principales responsables de la acidez en el aceite (Aparicio y Harwood, 2002).

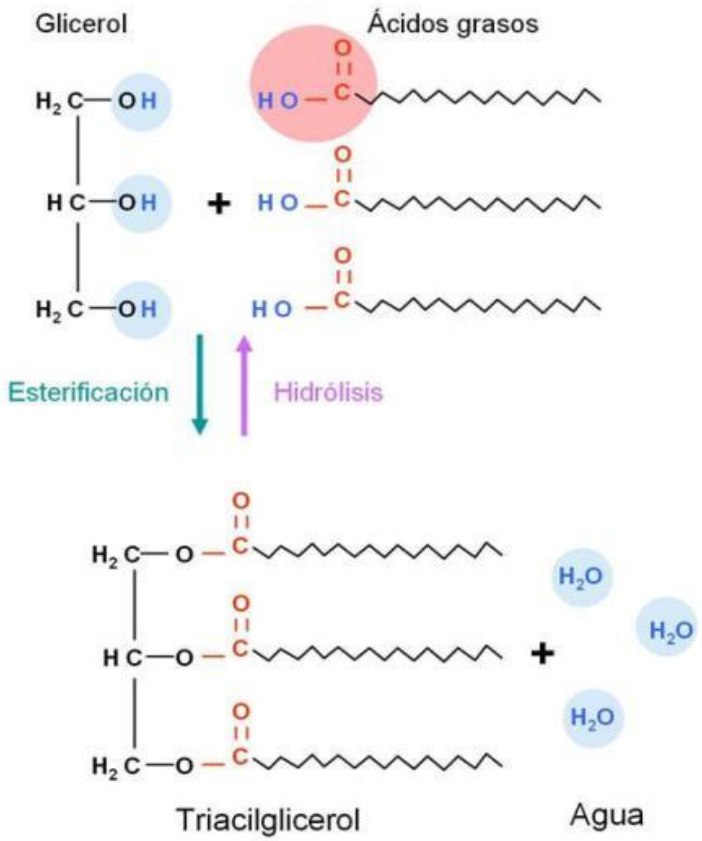

Figura 2.14. Reacción de formación de los triglicéridos. Fuente: www.genomasur.com

Los ácidos grasos que se suelen presentar en el Aceite de Oliva, los cuales se pueden ver en la Tabla 2.7 son: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), heptadecanoico (C17:0), heptadecenoico (C17:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoléico (C18:2), linolénico (C18:3), araquídico (C20:0), eicosenoico (C20:1), behénico (C22:0) y lignocérico (C24:0) (Lozano y cols., 2009).

El Aceite de Oliva Virgen se diferencia de otras grasas vegetales por su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados. La presencia de ácidos grasos libres son los que le confieren un carácter más o menos ácido al aceite. Pero no todos los ácidos grasos se encuentran como ácidos grasos libres, la mayoría se encuentran formando ésteres, que combinados con la glicerina forman los triglicéridos.

La composición en ácidos grasos de un Aceite de Oliva Virgen según el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2015) se representan en la Tabla 2.7:

Tabla 2.7. Composición de ácidos grasos de un Aceite de Oliva Virgen. Fuente: COI, 2015.

ÁCIDOS GRASOS	PORCENTAJE EN PESO
Ácido mirístico (C14:0)	≤ 0.03
Ácido palmítico (C16:0)	7.50-20.00
Ácido palmitoleico (C16:1)	0.30-3.50
Ácido heptadecanoico (C17:0)	≤ 0.03
Ácido heptadecenoico (C17:1)	≤ 0.03
Ácido esteárico (C18:0)	0.50-5.00
Ácido oleico (C18:1)	55.00-83.00
Ácido linoléico (C18:2)	2.50-21.00
Ácido linolenico (C18:3)	≤ 1.00
Ácido aráquico (C20:0)	≤ 0.60
Ácido eicosenoico (C20:1)	≤ 0.40
Ácido behénico (C22:0)	≤ 0.20
Ácido lignocérico (C24:0)	≤ 0.20

El Aceite de Oliva se llama como tal porque el ácido graso mayoritario es el ácido oleico (C18:1), la estructura del ácido oleico se muestra en la Figura 2.15.

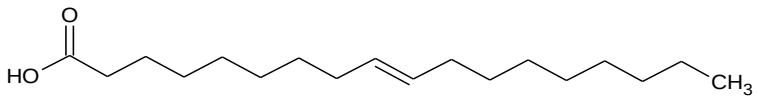

Figura 2.15. Estructura del ácido oleico (C18:1).

En esta fracción también se encuentran las ceras, que son los ésteres de los alcoholes alifáticos, tienen un alto peso molecular y un número par de átomos de carbono, de 36 a 46. Están en muy baja proporción en el aceite, y un incremento puede ser debido a las técnicas de elaboración.

También están los fosfolípidos, éstos contienen en su estructura un ácido graso y un grupo fosfórico, están en una proporción de 40-150 mg/kg, y disminuyen a medida que el aceite envejece.

Se encuentra en esta fracción también los esteroles esterificados con ácidos grasos, estos constituyen un 10-15% del total de esteroles, siendo los ácidos triterpénicos más conocidos en el Aceite de Oliva el ácido oleanólico, ácido betulínico y ácido maslínico (Boskou, 2006).

- Fracción minoritaria o insaponificable

La fracción insaponificable, no reacciona con la sosa o potasa para dar jabones, siendo soluble en los disolventes clásicos de las grasas después de la saponificicación.

Los componentes menores de esta fracción insaponificable son:

a) Hidrocarburos

Constituyen entre el 25 y 45% del insaponificable del Aceite de Oliva. Están formados por una fracción de hidrocarburos saturados (mezcla de n-parafinas) y el resto, por hidrocarburos insaturados, destacando el escualeno que es el que se encuentra en mayor proporción en el Aceite de Oliva (Vázquez Roncero, 1963). Es un precursor bioquímico de la biosíntesis de los esteroles (Lozano y cols., 2009).

b) Alcoholes alifáticos

Los alcoholes alifáticos se encuentran en el aceite de oliva esterificados con los ácidos grasos formando las ceras, suelen ser de cadena lineal, saturada y con un número par de átomos de carbono (de 8 a 30 átomos de carbono) (Paganuzzi, 1980).

c) Alcoholes triterpénicos

Los alcoholes triterpénicos están compuestos de 30 átomos de carbono, estructura muy similar a los esteroles, y se dividen en dos tipos: los monohidroxialcoholes (β-amirina, butyrospermol, cicloartenol, etc) y los dihidroxialcoholes (eritrodiol y uvaol) (Paganuzzy, 1980).

d) Esteroles

Pueden encontrarse libres o esterificados con ácidos grasos (ésteres de esteroles). Los esteroles se determinan para comprobar la autenticidad de los aceites. Los principales son el β-sitosterol (75-90%), campesterol (2-3%), estigmasterol (1-2%). Cuando avanza la maduración se produce una disminución de éstos (Gutierrez y cols., 1999).

e) Tocoferoles

Los tocoferoles son antioxidantes naturales y tienen beneficios nutricionales, éstos incrementan la estabilidad del Aceite de Oliva frente al enranciamiento. El más

importante es el α-tocoferol ya que actúa como vitamina E, representando el 90-95% de los tocoferoles totales.

El Aceite de Oliva también tiene en su composición β-tocoferol y el γ-tocoferol, que son más activos que el α-tocoferol en la actividad antioxidante (Valenzuela y Nieto, 1996). El contenido de tocoferoles depende de algunas variables como la variedad, origen, estado de maduración y tipo de conservación (Montedoro y Garafolo, 1984).

f) Pigmentos

Los pigmentos carotenoides se encargan de dar coloración al aceite, los más importantes son la luteína y el β-caroteno, siendo este precursor de la vitamina A. Los carotenos tienen una gran cantidad de dobles enlaces, por eso son oxidantes, agentes protectores del aceite frente al enranciamiento. Los carotenos reaccionan privan al oxigeno de su reactividad al reaccionar con él en los procesos de oxidación (Lozano y cols., 2009).

El color verde del Aceite de Oliva Virgen es debido a los pigmentos clorofílicos (Figura 2.16), éstos en la oscuridad tienen acción antioxidante de los compuestos fenólicos, y en la luz actúan como prooxidantes (Beltrán, 2000).

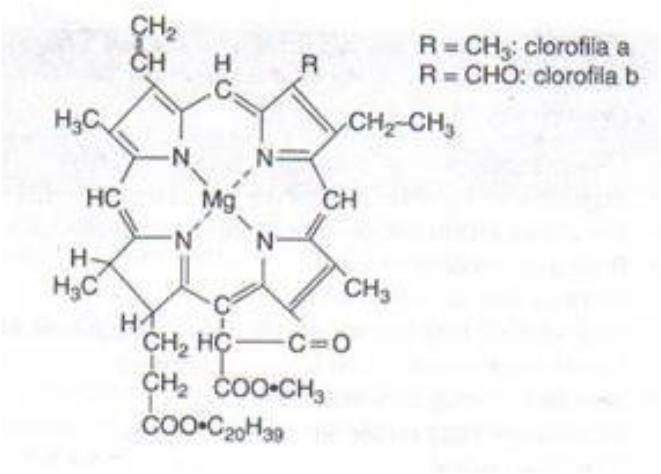

Figura 2.16. Estructura de la clorofila.

g) Compuestos fenólicos.

Los compuestos fenólicos están presentes en el mesocarpio de la aceituna, es una parte importante, con funciones diversas, como actividad antimicrobiana, protección frente al daño oxidativo limitando los efectos de la luz UV.

Estos compuestos son los principales responsables de las propiedades antioxidantes que tiene el Aceite de Oliva Virgen Extra. También forman parte del sabor y aroma en las propiedades organolépticas de los Aceites de Oliva Vírgenes. El contenido en fenoles depende de una amplia variedad de factores como: la maduración del fruto, el sistema de extracción empleado, proceso de molienda, proceso de filtración, variables climatológicas y agronómicas del cultivo y variedad de aceituna.

En la maduración del fruto se producen reacciones químicas y enzimáticas, con las cuales se produce la aparición de fenoles libres. Los fenoles son compuestos polares pero son retenidos en el aceite en pequeñas cantidades. Sus cantidades también varían con la cantidad de agua utilizada en el proceso de extracción. Cuando hay altas cantidades de agua, los polifenoles se separan del aceite (Lozano y cols., 2009).

2.2.4. Aspectos nutricionales del Aceite de Oliva Virgen

El Aceite de Oliva es un alimento muy exquisito con multitud de utilidades, es un alimento importante en las costas de Siria y Palestina, Grecia, Italia, Dalmacia, África del Norte y la península Ibérica.

El valor nutricional del Aceite de Oliva ha sido cuestionado durante décadas del siglo XX. Se han desarrollado estudios, que demuestran que la tasa de muerte por enfermedades cardiovasculares era inferior en los países mediterráneos con respecto a otros países occidentales (Entrala, 1998). Las diferencias parecían que eran debidas a los tipos de alimentación de esas poblaciones, especialmente a la calidad de la grasa que se consumía (Aparicio y cols., 2003). Por ello, se empezó a hablar de la “Dieta Mediterránea”, caracterizada por un alto consumo de verduras, cereales, legumbres, fruta, poca carne y mucho pescado y con el Aceite de Oliva como una grasa principal (Mata y cols., 1993). Desde ahí, se ha reconocido el valor

nutricional del Aceite de Oliva, sus cualidades alimenticias, por ser un tipo de grasa mayoritaria en su composición y por su contenido en sustancias antioxidantes.

Como se dijo anteriormente, el Aceite de Oliva se constituye el 98% de triglicéridos, y el 2% restante, de una mezcla compleja de compuestos orgánicos, cuya presencia le proporciona al Aceite de Oliva sus características organolépticas, y en algunos residen las propiedades nutricionales que diferencia al Aceite de Oliva Virgen de otros aceites y grasas (Lozano y cols., 2009).

La composición que tiene el Aceite de Oliva en ácidos grasos le confiere unas propiedades particulares. Los aceite que tienen un alto contenido en ácido oleico, tienen una mayor estabilidad frente a la autooxidación (Jiménez y Uceda, 1995). Su valor nutricional se debe a que tienen una baja proporción de ácidos grasos saturados. Pero la composición en ácidos grasos es diferente según una serie de factores, como son la variedad, el grado de madurez de las aceitunas, y su proporción también varía según la zona de producción, el clima, latitud (Uceda y Frías, 1975).

La resistencia a la oxidación de un aceite, depende de las características que tenga este aceite, principalmente su composición en ácidos graso, su relación entre los monoinsaturados y poliinsaturados, su contenido en antioxidantes de origen natural (polifenoles, tocoferoles, etc.), las trazas metálicas, la forma de elaborarlo y las condiciones en las que se conserva (temperatura, calidad del recipiente, acceso al oxígeno, luz, etc.) (Jiménez y Uceda, 1995).

2.3. SISTEMAS DE CULTIVO Y PRACTICAS AGRICOLAS EN OLIVAR

El cultivo es el cuidado de las plantas, que en el caso del olivo su finalidad sería obtener la mayor cantidad de aceitunas sanas. Existen diferentes sistemas de cultivo según la protección ambiental, tendencias socioculturales, seguridad alimentaria, etc. Así, el cultivo convencional tiene un objetivo principal, el cual es el rendimiento, se persigue un incremento continuo de la productividad, aun aplicando técnicas agresivas y nada respetuosas con el medio ambiente así como para sus consumidores (Figura 2.17).

Por el contrario, el cultivo ecológico se encarga de producir pero con un equilibrio con la naturaleza, respetando el medio ambiente, y con la finalidad de obtener productos saludables para sus consumidores. Este cultivo asegura una agricultura sostenible, excluyendo cualquier tipo de compuesto químico de síntesis, los cuales se suelen utilizar para la fertilización y el control de plagas y enfermedades (Martínez, 2009).

Figura 2.17. Olivar convencional (Jaén, 2015). Fuente: horajaen.com

En el olivar ecológico, las técnicas que utilizan serían el uso de cubiertas vegetales para conservar el suelo, ahorro energético, utilización de recursos del terreno y uso de energías renovables. Este tipo de cultivo tiene la ventaja de aportar condiciones de vida adecuadas a los animales, los cuales potencian la fertilidad del suelo, garantizando así la continuidad de la producción agraria. Pero también tiene un inconveniente, se dice que tiene un rendimiento menor que el cultivo convencional (Martínez, 2009) (Figura 2.18).

Figura 2.18. Olivar ecológico. Fuente: www.olipe.com

2.3.1. Tratamientos fitosanitarios

Todos los tipos de cultivos están expuestos a daños ya sean de origen parasitario, cuando el organismo que ataca está vivo, o daños de origen no parasitario, daños por las condiciones ambientales. Para que un daño tenga carácter de plaga, el grupo de animales fitófagos tiene que devorar el cultivo produciendo pérdidas económicas, y para considerar enfermedad, se tiene que producir una alteración en la morfología o fisiología de las plantas por acción tanto de un agente parasitario como no parasitario. Un agente de daños de origen parasitario puede ser un animal (ácaros, insectos, mamíferos, aves, moluscos) u otro organismo (virus, hongos, bacterias). También existen otros organismos vivos externos, las malas hierbas, que al competir por los mismos recursos y al ser hospedadores de agentes patógenos, ocasionan pérdidas en las producciones agrícolas (Aplicación de plaguicidas, 1999).

Con los avances tecnológicos y científicos se han desarrollado sustancias químicas que antes no eran conocidas. El uso de estas sustancias químicas, como

los plaguicidas, proporcionan un beneficio a la población. Pero su uso incorrecto y no controlado conlleva riesgos para el medio ambiente y para la salud.

La definición de plaguicida (Figura 2.19) según La Reglamentación Técnico-Sanitaria para la fabricación, utilización y comercialización de plaguicidas (RD 3349/83) es: *"sustancia o ingrediente activo, así como los preparados o formulaciones que contengan una o varias de estas sustancias destinada a cualquiera de estos fines:*

- *Combatir los agentes nocivos para los vegetales y productos vegetales, y prevenir su acción.*
- *Regular o favorecer la producción vegetal.*
- *Conservar los productos vegetales.*
- *Destruir o prevenir el desarrollo de los vegetales perjudiciales.*
- *Hacer inofensivos, prevenir o destruir la acción de otros organismos nocivos o indeseables distintos de los que atacan los vegetales.*

Figura 2.19. Plaguicidas. Fuente: www.elhogarnatural.com

Los plaguicidas se pueden clasificar por diferentes criterios, según el agente sobre el que actúan (insecticidas, fungicidas, herbicidas…), según el grupo químico al que pertenecen (insecticidas naturales, organoclorados, organofosforados, carbamatos…), según su comportamiento en la planta (sistémicos, penetrantes, de contacto), según su estado líquido, sólido y gaseoso (Tabla 2.8), (Fernández y cols., 2007).

Existe una gran cantidad de enfermedades y plagas las cuales atacan a los olivares, esto tiene una repercusión grave, no solo a la producción que los olivares tengan, sino también en la calidad del fruto y el zumo que se obtiene.

Los métodos de lucha contra plagas y enfermedades se pueden distinguir en (Fernández y cols., 2007):

- métodos indirectos
- métodos mecánicos
- prácticas de cultivo
- lucha química
- lucha biológica
- lucha integrada

Anteriormente se clasifico el agente parasitario o no parasitario, pero los principales agentes que provocan los daños en el olivar son los insectos, por ese motivo los plaguicidas más utilizados son los insecticidas antes que los herbicidas (control de malas hierbas) y fungicidas (hongos). Para luchar contra plagas de insectos, los plaguicidas que más se utilizan son los que pertenecen a la familia de los organofosforados como el Dimetoato, Clorpirifos, Metidation o Fenitrotion (Fernández y cols., 2007).

El control fitosanitario de los cultivos es una labor complicada, supone disponer de la maquinaria adecuada para cada tratamiento, además el éxito del tratamiento depende de:

- Elegir el producto necesario
- Aplicar una dosis apropiada
- Aplicar el producto en el momento preciso

Pero lo principal sería tener un conocimiento del cultivo, del ciclo biológico del agente causante y de las características de los productos del mercado (Fernández y cols., 2007).

Es muy importante tener un buen uso de los productos fitosanitarios en la agricultura, ya que toda la población está expuesta a los efectos nocivos que los productos fitosanitarios desprenden. La toxicidad que tiene un plaguicida depende de factores relacionados con sus propiedades físico-químicas (dosis, impurezas, solubilidad, etc.), con las características fisiológicas del individuo que ésta expuesto, o por las condiciones climáticas (temperatura y presión atmosférica). La interacción entre estos factores son los que determinan la toxicidad (Coscolla, 1993)

Tabla 2.8. Estados productos fitosanitarios (Fernández y cols., 2007).

ESTADO DEL FITOSANITARIO	FORMAS DE PRESENTARSE EL FITOSANITARIO	OBSERVACIONES
Estado líquido	Solución	Disolución total del producto en agua
	Emulsión	Dispersión del producto en agua formando pequeñas gotas
	Suspensión	Partículas sólidas que no se disuelven en el agua
Estado sólido	Producto pulverulento	Compuesto por partículas comprendidas entre 50 y 100 micras
	Microgránulos	Compuesto por partículas comprendidas entre 100 y 600 micras
Estado gaseoso	Fumigantes	Se aplican mediante inyección o difusión
	Vapor recalentado	Usado para desinfección de suelos
	Gasificación por calentamiento	Tratamientos realizados sólo en locales cerrados

El código alimentario de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen residuo de plaguicida como *"toda sustancia presente en un producto alimentario destinado a consumo humano o animal, como consecuencia de la utilización de un plaguicida".*

Para garantizar la protección del consumidor, en el Aceite de Oliva Virgen, la concentración de residuos debe ser controlada, garantizándose también unas buenas prácticas agrícolas. Los residuos de plaguicidas en el Aceite de Oliva Virgen dependen del número de tratamientos, de la solubilidad en grasa, de la tasa de degradación del ingrediente activo y del intervalo precosecha (Fernández y cols., 2007). El control de estos residuos tanto en aceituna como en Aceites de Oliva Virgen se recoge en el siguiente apartado de Reglamentación en el olivar (Capítulo 1.3.3).

Un residuo de plaguicida es debido a los restos que deja el propio plaguicida, así como sus productos de degradación. Los residuos de plaguicida se representan en partes por millón (ppm) o en miligramos de plaguicida por kilogramo de producto vegetal (mg/kg) (Coscolla, 1993).

2.3.2. Olivar ecológico

Un olivar certificado como ecológico tiene que tener un fuerte control para que su aceite pueda ser vendido como denominación *"ecológico".* Hay muchas empresas autorizadas que garantizan mediante algunas visitas a la explotación olivarera y analíticas para saber si se ha cumplido la normativa en esa olivar ecológico.

Una parte importante de los olivares andaluces tienen suelos degradados, bien por la erosión hídrica, la degradación biológica y/o la degradación física. Todo esto es debido a una mala práctica agrícola, como utilización de plaguicidas, suelos descubiertos, etc. Por ese motivo, es muy importante que el olivar que se va a transformar en una finca de producción ecológica tiene que recuperar el suelo lo antes posible. Las técnicas son: el uso de cubiertas vegetales, compostaje de los residuos de la almazara y picado de restos de poda (Guzmán y cols., 2012).

En un olivar ecológico se tienen como prioridad la promoción de la biodiversidad y la mejora de la fertilidad del suelo. Estas dos condiciones ayudan a prevenir los problemas en el olivar de plagas y enfermedades. En los olivares hay muchos organismos vivos, pero aun así, refiriéndonos a la artropofauna (arácnidos, insectos) y a los hongos, solo un número reducido es considerado como plaga o enfermedad del cultivo. Y un insecto se convierte en plaga, es porque el equilibrio ecológico se ha roto, es decir, algo falla en la explotación. Una cubierta vegetal y los setos se encargan de mantener los enemigos naturales de las plagas, la flora les ofrece a los insectos alimento y refugio, dando a la finca una presencia de poblaciones estables de enemigos naturales, que controlan a los insectos-plaga cuando sus poblaciones crecen (Guzmán y cols., 2012).

Otra medida sería el mantenimiento de la fertilidad del suelo, con un nivel aceptable de materia orgánica, que nutra de forma equilibrada los olivos. Ya que las deficiencias nutricionales, y el exceso de nitrógeno, provocan un cultivo más susceptible a enfermedades y plagas (Manual de buenas prácticas agrarias, 2006).

Hay una normativa de aplicación que permite el tratamiento con sustancias activas, en caso de que las medidas anteriores tuvieran problemas de plagas, esta normativa se recoge en sus anexos correspondientes del Reglamento (CE) nº

889/2008 de la Comisión, de 5 de septiembre de 2008,con el que se establecen disposiciones de aplicación del Reglamento (CE) nº 834/2007.

Los plaguicidas utilizables en la producción ecológica en caso de ser necesarios, sobre todo durante el periodo de conversión a la agricultura ecológica se recogen en la Tabla 2.9.

Tabla 2.9. Principales plagas y enfermedades del olivar y su control (Guzmán y cols., 2012)

PLAGA O ENFERMEDAD	TRATAMIENTO	PRÁCTICA CULTURAL	OBSERVACIONES
Prays (Prays oleae)	**Bacillus thurungiensis**	**Favorecer poblaciones de Crisopas**	**En generación antófaga (inicio de floración)**
Mosca del olivo (Bastrocera oleae)	**Spinosad**	**Trampeo masivo**	**Adelanto de cosecha**
Cochinilla (Saissetia oleae)	**Aceite mineral**	**Aclareo de copa**	**Lucha biológica (Metaphycus barletti)**
Negrilla (Capnodium elaeophillum)	**Azufre Permanganato de potasio**	**Aclareo de copa**	**Caldo bordelés enriquecido en cal**
Repilo (Spilocaea oleagina)	**Cobre**	**Aclareo de copa**	**Hasta 6 kg cobre por ha y año**

2.3.3. Reglamentación en el olivar

Para controlar los residuos tóxicos encontrados en el cultivo se han establecidos los Límites Máximos de Residuos (LMRs) para los plaguicidas en aceitunas y aceite de oliva. El Codex Alimentarius define el Límite máximo de residuos (LMRs) como *"la concentración máxima de residuos de un plaguicida (mg/kg), que se permita legalmente en la superficie o parte interna de productos alimentarios para piensos o consumo humano*". Los LMR se basan en datos de BPA (Buenas prácticas agrícolas en el uso de plaguicidas) y su objetivo es lograr que los alimentos derivados de productos básicos que se ajustan a los respectivos LMR sean toxicológicamente aceptables (Codex).

El límite máximo de residuos para el Aceite de Oliva Vírgen registrado en el Codex Alimentarius se recoge en la Tabla 2.10.

Tabla 2.10. LMR Aceite de Oliva vírgen. Fuente: Codex, 2016

PESTICIDA	LMR (MG/KG)	AÑO DE ADOPCIÓN
Carbarilo	25	2004
Cipermitrin	0.5	2009
Fention	1	-
Kresoxim-Metilo	0.7	2003
Trifloxistrobin	0.9	2013

El LMR para aceitunas registrada en el Codex Alimentarius se recoge en la siguiente Tabla 2.11.

Tabla 2.11. LMR aceitunas. Fuente: Codex, 2016

PESTICIDA	LMR (MG/KG)	AÑO DE ADOPCIÓN
Buprofezin	5	2010
Carbarilo	30	2004
Cihalotrin	1	2009
Cipermetrin	0.05	2009
Deltamatrin	1	2004
Difenoconazol	2	2008
Dimetoato	0.5	2005
Fention	1	1997
Kresoxim-Metilo	0.2	2003
Metidation	1	1995
Paraguat	0.1	2006
Permetrin	1	-
Tebuconazol	0.05	2012
Trifloxistrobin	0.3	2013

El LMR registrado en la Legislación de la Unión Europea Rev. (27/04/2016) para el LMR de los plaguicidas de aceituna destinada para aceite se refleja en la Tabla 2.12.

Tabla 2.12. LMR de plaguicidas de aceituna destinada a aceite. Fuente: Ministerio de Economía y Competitividad (2016).

PLAGUICIDA	LÍMITE (MG/KG)
Abamectina	0.01
Acefato	0.02
Aceite de huesos	0.01
Aceites de petroleo	0.01
Acequinocil	0.01
Acetamiprid	0.01
Acibenzolar S metil	0.01
Ácido 1- naftilacetico	0.05
Ácido 2- naftiloxiacetico	0.02
Ácido difluoroacetico	0.02
Ácido giberelico	5
Ácido indolacetico	0.1
Ácido indolbutirico	0.1
Aclonifen	0.05
Acrinatrin	0.05
Alacloro	0.02
Aldicarb	0.02
Aldrin	0.01
Ametoctradina	0.01
Amidosulfuron	0.01
Aminopiralida	0.01
Amisulbrom	0.01
Amitraz	0.05
Amitrol	0.05
Anilazina	0.02
Antraquinona	0.02
Aramite	0.01
Asulam	0.1
Atrazina	0.05
Azadiractina	0.5
Azimsulfuron	0.01
Azinfos etil	0.02
Azinfos metil	0.05
Azociclotin	0.02
Azoxiestrobina	0.01
Azufre	50

3. OBJETIVOS

La presente memoria constituye la recopilación del trabajo experimental elaborado a lo largo del curso académico 2015-2016, y que persigue estudiar la influencia del sistema de cultivo, convencional o ecológico, sobre:

- Calidad reglamentada (índice de acidez, índice de peróxidos, coeficientes ultravioleta K_{232} y K_{270})
- Composición nutricional y terapéutica (pigmentos carotenoides y clorofílicos, tocoferoles, ácidos y alcoholes triterpénicos y composición fenólica)
- Seguridad alimentaria (plaguicidas)

4. MATERIALES Y MÉTODOS

En el siguiente apartado se va a indicar el material que se ha usado para el desarrollo del estudio, detallando los equipos utilizados y los reactivos químicos que se han empleado para todas la determinaciones analíticas realizadas.

4.1. INSTRUMENTACIÓN CIENTÍFICO-TÉCNICA

Los equipos utilizados para el desarrollo de este estudio se recogen en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Instrumentación científico-técnica

EQUIPO/APARATO	MODELO	TÉCNICA
Espectrofotómetro UV-Vis	VARIAN Cary 50 BIO	K_{232} y el K_{270}
		Pigmentos clorofílicos y carotenoides
Balanza analítica	Selecta	-
Centrífuga	Selecta Medifriger BL-S	Triterpenos
		Polifenoles cualitativos
		Plaguicidas
Agitador	Heidolph D-91126	Triterpenos
Cromatógrafo de gases	Shimadzu GC-2014AF/SP	Composición acídica
Cromatógrafo de líquidos	UPLC-MS/MS Waters Aquity	Triterpenos
		Polifenoles cualitativos
Cromatógrafo de líquidos	HPLC Shimadzu-Prominesce 20	Tocoferoles

4.2. REACTIVOS

Los reactivos utilizados en las determinaciones analíticas del presente estudio se recogen en la Tabla 4.2.

Tabla 4.2. Compuestos químicos utilizados

REACTIVOS	CALIDAD	PUREZA (%)	SUMINISTRA
Éter etílico	PAI	99,9	Panreac
Ácido oxálico	PA-ACS-ISO	-	Merck
Agua destilada	Millipore Elix 3	-	Merck
Etanol	HPLC	99,9	Merck
Fenolftaleína	RV	1	Panreac
Hidróxido potásico	PA	85	Panreac
Ácido clorhídrico	PA-ACS-ISO	37	Panreac
Dicromato potásico	Solución 0,1 N	-	Merck
Yoduro potásico	PRS-CODEX	99	Panreac
Almidón	RV	1	Panreac
Ácido acético glacial	PA-ACS-ISO	99	Panreac
Triclorometano	PA-ACS-ISO	99	Panreac
Tiosulfato sódico	Solución 0,01 N	-	Merck
Ciclohexano	HPLC	99,9	Merck
n-Hexano	PA	95	Panreac
Metanol	PA-ACS-ISO (Reag.Ph.Eur.)	99,8	Panreac
Folín	Merck	-	Merck
Metanol	HPLC	99,8	Panreac
Ácido sulfúrico	PA-ISO	96	Panreac
Hidróxido sódico	PRS-CODEX	98	Panreac
Heptano	HPLC	99,3	Panreac
Cloruro sódico	PA	99	Panreac
Acetonitrilo (ACN)	HPLC	≥ 99,9	Sigma-Aldrich
$MgSO_4$	PA-ACS-ISO	≥ 98	Panreac
NaCl	PA-ACS-ISO	≥ 99,5	Panreac
Amina primaria/secundaria (PSA)	PA-ACS-ISO	≥ 99	Agilent Technologies
Ácido fórmico	PA-ACS-ISO	≈ 98	Sigma-Aldrich

4.3. EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN

En los siguientes apartados se hace una descripción de los equipos utilizados en el presente trabajo.

4.3.1. Espectrofotometría ultravioleta-visible

Como se indicó anteriormente el equipo utilizado en el presente estudio ha sido el Espectrofotómetro VARIAN Cary 50 BIO UV-Visible Spectrophotometer.

La espectrofotometría UV-Vis es una técnica basada en la interacción de las radiaciones electromagnéticas con la materia. Los electrones en las moléculas se dividen en niveles de energía, aunque suelen residir en los niveles más bajos. Al suministrar energía por una radiación electromagnética, los electrones pasan a un estado excitado dando lugar a un espectro de absorción. La radiación electromagnética es un conjunto de corpúsculos, los fotones, los cuales llevan asociada una onda. El conjunto de radiaciones electromagnéticas se denominan espectro electromagnético (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Regiones del espectro electromagnético

REGIONES	LONGITUD DE ONDA (NM)
Rayos X	1-100
Ultravioleta	100-390
Visible	390-800
Infrarrojo	800-100.000
Microondas	100.000-1.000.000

Las técnicas espectrofotométricas pueden ser moleculares o atómicas. La espectrofotometría UV-Vis es una técnica de absorción molecular. Se trata de un método físico para el análisis cuantitativo y la determinación de estructuras (Eugene, 1990). La absorción de la radiación electromagnética por una disolución se rige por la Ley de Lambert-Beer. Esta Ley relaciona la luz incidente (I_0) y la luz transmitida. La relación entre éstas se denomina transmitancia (Eugene, 1990). Siendo la absorbancia el logaritmo decimal de la transmitancia:

$$T = I / I_0 \qquad A = -\lg I / I_0 = a\ c\ l = \varepsilon\ c\ l$$

Los componentes de un espectrofotómetro son (Figura 4.1):

Figura 4.1. Componentes espectrofotómetro. Fuente: www.ebah.com

- Fuente de energía radiante

Las fuentes de radiación que son emitidas en la región UV-Vis del espectro se dividen en fuentes térmicas, en las que la radiación se debe a una temperatura, y fuentes de descargas eléctricas a través de gases.

- Sistema de selección de longitud de onda

Se dividen en filtros o monocromadores. El monocromador produce un haz de radiación de gran pureza espectral y permite variar la longitud de onda. Aísla una banda estrecha de energía radiante. Suele ir asociado a un sistema óptico, el cual proporciona un haz de radiación paralelo dirigiéndolo hacia el detector.

- Dispositivo para la cubeta de espécimen

- Detector de luz

Se encarga de medir la energía radiante transmitida por la muestra. Hay tres tipos usados en la región ultravioleta y visible (Eugene, 1990). Células fotovoltaicas, fototubos, y tubos fotomultiplicadores, los cuales se evalúan según la sensibilidad, la linealidad de la respuesta con la intensidad de la radiación, el tiempo de respuesta, la influencia de la longitud de onda en la respuesta, estabilidad y capacidad de amplificación de la señal de salida.

- Dispositivo de lectura de la señal generada por el detector (Eugene,1990)

4.3.2. Cromatografía de gases

El equipo utilizado en el presente trabajo ha sido el Cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2014AF/SP, con columna columna SGE BPX- 70, 60 m, 0.25 mm,

0.25µm. 70% cianopropil polisilfenileno-siloxano. Temperatura máxima 260ºC (Scharlau, Milán, Italia).

La cromatografía de gases (CG) (Figura 4.2) se trata de un método de separación, en la que la mezcla a separar, una vez volatilizada, pasa a través de una columna con la ayuda de un gas portador inerte. En la separación el analito se distribuye entre una fase móvil gaseosa y una fase líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte (Skoog y Leary, 1994).

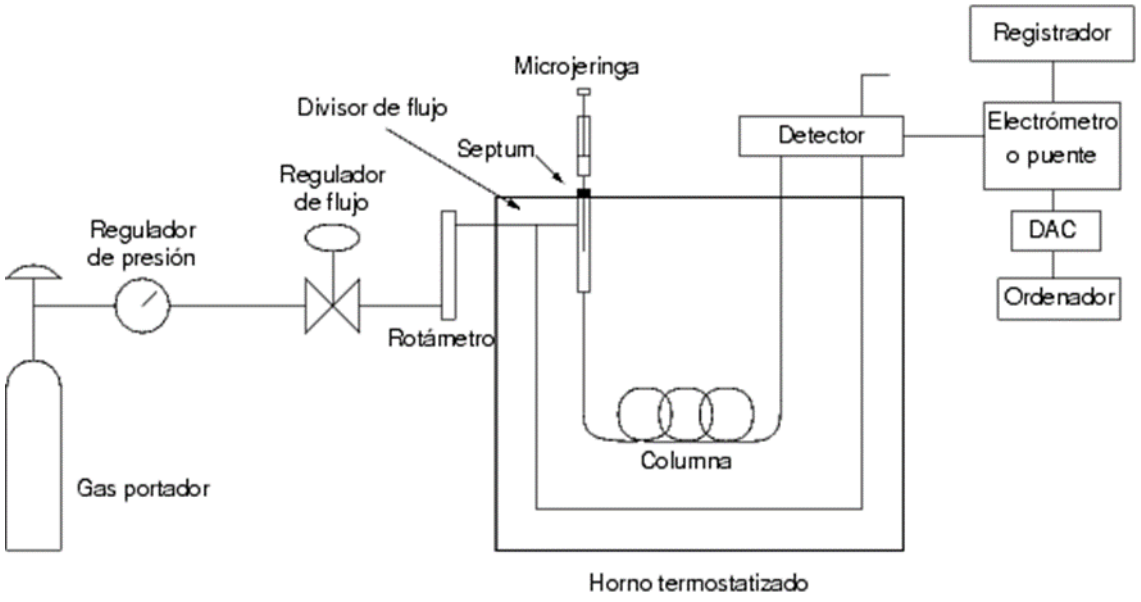

Figura 4.2. Componentes del Cromatógrafo de gases (Fuente: Skoog y Leary, 1994)

- Gas portador

Los gases portadores son Helio, Argón, Nitrógeno, Dióxido de carbono y el Hidrógeno. Estos gases deben ser químicamente inertes. Para elegir este gas portador se necesita saber que detector se va a utilizar.

- Sistema de inyección de la muestra

La muestra debe de tener un tamaño adecuado, en que esto sea así se basa la eficacia de la columna. El método más común de inyección de muestra sería usando una microjeringa para inyectar una muestra líquida o gaseosa a través de un septum de goma de silicona. Las columnas capilares necesitan pocas cantidades de muestra, para ellas se emplea un divisor de la muestra que permite pasar a la columna solamente una pequeña fracción de la muestra, desechándose el resto (Skoog y Leary, 1994).

- Horno

El horno se encarga de controlar la temperatura del sistema de introducción de la muestra y de la columna, esto es decisivo para conseguir una separación adecuada.

- Columna

En ella tienen lugar los procesos físico-químicos en los que se fundamenta la separación cromatográfica. En función de sus valores de volatilidad-solubilidad o volatilidad-absorción, los solutos adquieren diferente movilidad. Hay diferentes tipos de columnas: rellenas o empaquetadas y capilares o abiertas.

- Detector

Es necesario para detectar los compuestos que han sido separados en la columna cromatográfica, y así medirlos y de alguna forma poder identificarlos. Se encarga de medir una propiedad física o química del gas que circula a su través permanentemente. Sus funciones son: definir los tiempos de retención del momento en el que pasa un soluto para su análisis cualitativo, y originar una señal en función de la cantidad de soluto que pasa a su través. Para el análisis cualitativo de los compuestos de la muestra, es decir, para la identificación de los compuestos que salen de la columna, es necesario un espectrómetro de masas o un detector de infrarrojos. En estos detectores, los espectros de los compuestos se comparan con espectros que están recogidos en bibliotecas y de esta forma se pueden identificar. Otra forma sería, comparar los tiempos de retención de los analitos de la muestra con los tiempos de retención de sustancias puras que fueron introducidos en columnas de distinta polaridad (Skoog y Leary, 1994).

También se podría añadir a la muestra una cantidad de sustancia que se sospeche que se encuentre en la misma, en caso de observar un aumento de señal es indicativo de que se trata del compuesto del que se sospechaba. Para un análisis cuantitativo, se tendrían en cuenta las áreas y/o altura del pico cromatográfico y así se comparan esas áreas con las áreas de sus correspondientes patrones. Los detectores más utilizados:

- ECD: Detector de captura electrónica
- FID: Detector de ionización de llama
- TCD: Detector de conductividad térmica
- MS: Espectrómetro de masas
- NPD: Detector de nitrógeno y fósforo

- Registrador

A éste le llega la señal eléctrica amplificada dando lugar a un cromatograma. A partir de él se obtienen los datos cualitativos y cuantitativos (Skoog y Leary, 1994).

4.3.3. Cromatografía de líquidos

El Cromatógrafo de líquidos utilizado en el presente trabajo ha sido Shimadzu, modelo Prominesce serie 20, columna Supelcosil LC-Si (L:11; 250 mm, d.i. 4.6 mm.), con detector diode-array SPD-M20A. Permite trabajar con lámpara de deuterio y de wolframio entre 190 y 800nm con resolución de 1.4nm y volumen de inyección variable hasta 100µL.

La cromatografía de líquidos (Figura 4.3) es una técnica de separación en la que un líquido (fase móvil) circula en contacto con un sólido u otro líquido inmiscible (fase estacionaria). Al introducir la muestra, los analitos avanzarán, introducidos en la corriente de la fase móvil, a lo largo del sistema con diferente velocidad dependiendo de la afinidad que tengan por cada fase. Una vez terminada la muestra el recorrido por la columna, cada analito habrá eluido con un tiempo de retención diferente, por lo que quedarán separados (Skoog y Leary, 1994).

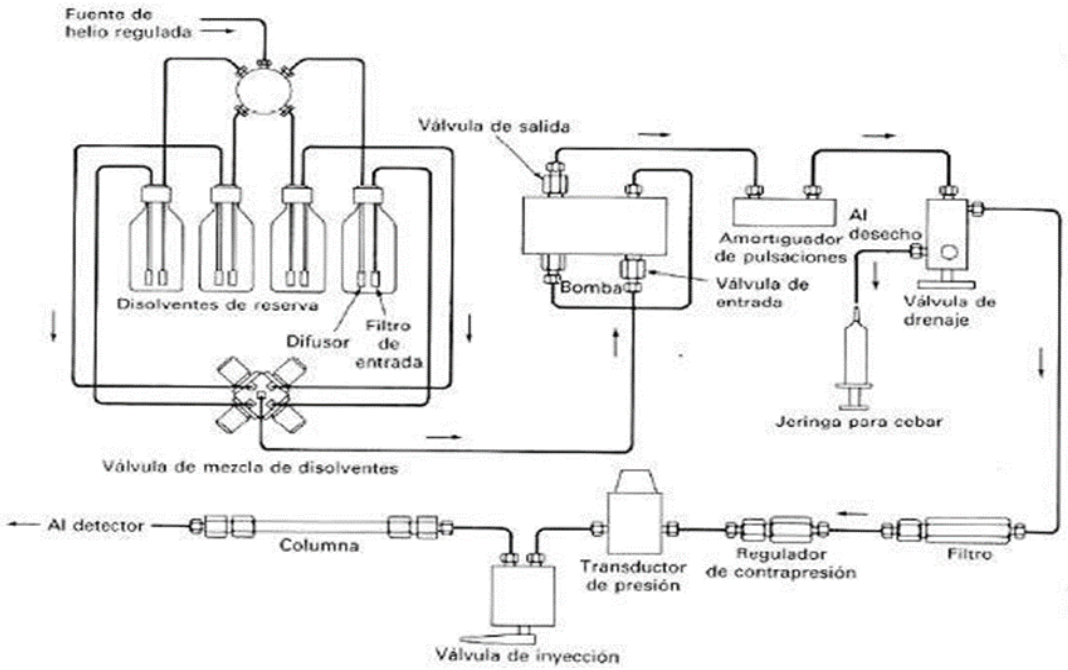

Figura 4.3. Equipo HPLC. Fuente: Skoog y Leary, 1994.

- Bomba

Se encarga de pasar la fase móvil a través de una columna con una velocidad de flujo controlada.

- Inyector

El método más utilizado es la utilización de bucles para la introducción de la muestra, hay algunos intercambiables con los cuales se puede elegir el tamaño de muestra.

- Columnas

Están construidas con tubo de acero inoxidable con un diámetro interno uniforme, aunque también se pueden encontrar tubos de vidrio de paredes resistente.

Suelen tener una longitud entre 10 y 30 cm. Y un diámetro interno de 4-10 mm.

En cuanto al relleno, en cromatografía de líquidos se suelen utilizar dos tipos de rellenos, pelicular y de partícula porosa.

- Detectores

Los más utilizados en HPLC son: detector de fluorescencia, absorbanciaa, electroquímico, de índice de refracción, electroquímico, de dispersión de luz y por espectrometría de masas.

- Espectroscopía de masas

Es una técnica analítica a partir de la cual se puede elucidar la estructura química de algunas moléculas e identificar los compuestos. Se puede utilizar tanto en cromatografía de gases como en cromatografía de líquidos, llevando a cabo un análisis cuantitativo o cualitativo de los analitos. En esta técnica, las moléculas gaseosas son ionizadas, se aceleran en un campo electrónico y se separan en función de la masa. Esto tiene suficiente energía como para romper las moléculas en varios trozos, dando lugar a un espectro de masas (Skoog y Leary; 1994) (Figura 4.4).

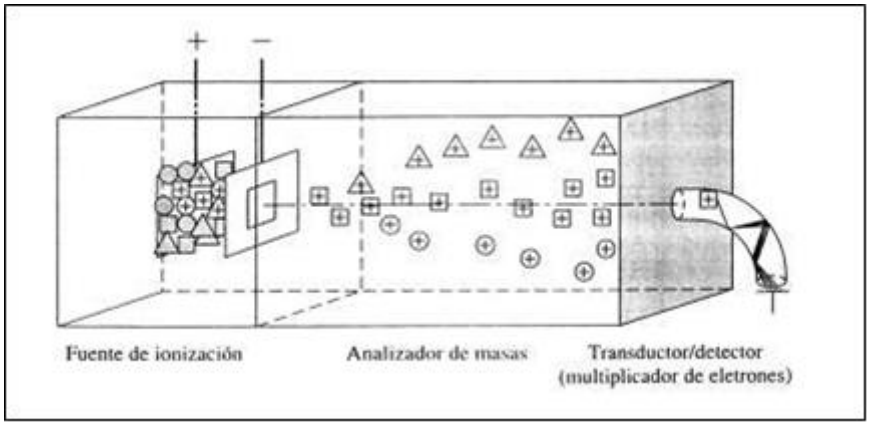

Figura 4.4. Espectrómetro de masas. Fuente: Rubinson y Rubinson, 2001.

Hay diferentes tipos de cromatografía de líquidos, los cuales se diferencian según la naturaleza de la fase estacionaria:

- Cromatografía de absorción
- Cromatografía de reparto
- Cromatografía de intercambio iónico
- Cromatografía de exclusión

Según la polaridad de la fase estacionaria se distinguen dos tipos de cromatografías (Tabla 4.4).

Tabla 4.4. Tipos de cromatografía según la fase estacionaria (Skoog y Leary, 1994)

Cromatografía de fase normal	**La fase estacionaria presenta puntos activos de alta polaridad y las interacciones con el soluto son específicas del grupo activo**
Cromatografía de fase reserva (inversa)	**La fase estacionaria tiene naturaleza apolar, produciéndose interacciones inespecíficas.**

4.3.4. Cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC):

Este tipo de cromatografía tiene mejoras con respecto al HPLC, con ella se puede trabajar con presiones más altas, incluso hasta 1000 atmósferas, utilizando tamaños más pequeños de partículas.

4.4. MUESTRAS

En el presente trabajo se han estudiado algunos parámetros de calidad reglamentada, composición y nutricionales, así como, el análisis de residuos de diferentes muestras de Aceite de Oliva Virgen Extra de cultivo tradicional y ecológico. Se han analizado un total de 5 muestras, de las cuales tres de ellas pertenecen a cultivo ecológico y dos a cultivo tradicional (Tabla 4.5). En todas las muestras se ha seguido como criterio que su recolección y obtención haya estado comprendida en la segunda quincena de octubre. En cultivo ecológico de variedad 'Picual' se ha analizado una muestra recolectada y obtenida de la finca experimental del IFAPA Centro Venta del Llano, y dos muestras comerciales de diferente procedencia. En cuanto al cultivo convencional se analizaron dos muestras de variedad 'Picual' procedentes de la finca experimental del IFAPA Centro Venta del Llano.

Tabla 4.5. Muestras en estudio

TIPO DE CULTIVO	PROCEDENCIA
ECOLÓGICO	IFAPA (EI)
	Comercial 1 (EC1)
	Comercial 2 (EC2)
CONVENCIONAL	IFAPA 1 (TI1) IFAPA 2 (TI2)

4.5. MÉTODOS DE ANÁLISIS

A continuación se van a describir las determinaciones realizadas a las muestras de Aceite de Oliva Virgen seleccionadas para realizar el presente estudio.

4.5.1. Determinación de la Acidez

Para el análisis de la acidez de las muestras objeto de estudio se ha seguido el método oficial de la Unión Europea, que se recoge en el Reglamento Nº2568/91 (CE, 1991). Con el análisis del grado de acidez, se determina la presencia de ácidos grasos libres en el aceite.

Para ello, se pesa 5.00±0.01g de muestra en un matraz Erlenmeyer, utilizando como disolvente 50 mL de una mezcla de etanol de al 95% y éter dietílico en proporción de volumen 1:1. Esta mezcla se neutraliza previamente en el momento de su utilización con una solución de hidróxido potásico 0,1 M en presencia de fenolftaleína.

La muestra se valora seguidamente con una solución de KOH 0,1M utilizando fenolftaleína como indicador.

El grado de acidez se expresa en porcentaje de ácido oleico, según la siguiente expresión:

$$\text{Grado de acidez} = \frac{\mathrm{V} \times \mathrm{c} \times \mathrm{M}}{10 \times \mathrm{P}}$$

V: volumen de disolución valorada de hidróxido potásico utilizada (mL)

c: concentración de la disolución de hidróxido potásico utilizada (mol/L)

M: peso molecular del ácido oleico (282g/mol)

P: peso de la muestra (g)

4.5.2. Determinación del índice de peróxidos

Para el análisis del índice de peróxidos de las muestras objeto de estudio se ha seguido el método oficial de la Unión Europea, que se recoge en el Reglamento Nº2568/91 (CE, 1991). El índice de peróxidos es una medida directa del contenido en hidroperóxidos de una muestra. Es un parámetro de calidad y se define como los miliequivalentes de oxígeno activo que hay en un kilogramo de grasa.

Para medirlo se hace una valoración redox, para ello se introduce 2.00±0.01 g de muestra en un matraz en el que previamente se ha desplazado el aire (mediante una corriente de CO_2 o N_2), y se disuelve con 10mL de cloroformo y 15mL de ácido acético glacial. Se le añade a continuación una disolución de 1mL de KI en exceso, recién preparada. Se mantiene el matraz en agitación suave durante 1 minuto, y se conserva en oscuridad durante 5 minutos. Transcurridos los 5 minutos, se le agregan 75mL de agua destilada y se valora el yodo liberado con una disolución de tiosulfato sódico ($Na_2S_2O_3$) 0,002N en presencia de almidón. Paralelamente se prepara un blanco.

Para el cálculo del índice de peróxidos se utiliza la ecuación x:

$$\text{Índice de peróxidos} = \frac{(V - V') \times N \times 1000}{P}$$

V: volumen de tiosulfato sódico gastado en la muestra (mL)

V': volumen de tiosulfato sódico gastado en el blanco (mL)

P: peso de la muestra (g)

C: normalidad de la disolución de tiosulfato sódico (eq/L)

4.5.3. Medida espectrofotométrica de absorción en la región ultravioleta (K_{232} y K_{270})

Para esta determinación se ha seguido el método oficial de la Unión Europea, que se recoge en el Reglamento Nº2568/91 (CE, 1991). Esta determinación es una medida del coeficiente de extinción específico en diferentes longitudes de onda, a 232 y 270 nm. Se mide la absorción del aceite en la región UV. A la longitud de onda de 232 nm la transparencia de la región se ve afectada por el proceso de autoxidación, así como resultado de diferentes procesos industriales, por eso el K_{232} es un parámetro de calidad.

Para su determinación, en caso de que se observe turbidez o sustancias en suspensión en el aceite hay que filtrar. Seguidamente se pesa 100 mg de muestra en un matraz aforado de 10mL y se disuelve en ciclohexano, completando hasta el

enrase. Seguidamente se introduce la disolución en la cubeta de cuarzo del espectrofotómetro, para así medir la absorbancia a 232 y 270 nm. La concentración preparada debe de ser exacta, es decir, la absorbancia leída en el espectrofotómetro debe de estar dentro de los límites 0.1 y 0.8.

Para su cálculo se utiliza la siguiente expresión:

$$K_\lambda = A_\lambda / b.c$$

K_λ: coeficiente de extinción a la longitud de onda

A_λ: absorción a la longitud de onda dada

c: concentración disolución (g/100ml)

b: espesor cubeta (cm)

4.5.4. Pigmentos clorofílicos y carotenoides

Para la determinación del contenido en pigmentos clorofílicos y carotenoides se ha seguido el método propuesto por Mínguez y cols., (1990). En este método se determina la absorbancia de un Aceite de Oliva a la longitud de onda de máxima absorción del componente feofitina (fracción clorofílica) y luteína (fracción carotenoide).

En su procedimiento se disuelve 7.50±0.01 g de aceite en ciclohexano, enrasando hasta 25mL. Cuando la disolución esté homogénea, se leen la absorbancia a 670 nm para la determinación de los pigmentos clorofílicos, y a 470 nm para los pigmentos carotenoides. Los resultados se expresaron en mg de pigmento por kilogramo de aceite.

El cálculo se realizó a partir de la ecuación:

$$C = \frac{\text{Ɛ} \times \text{V}}{\text{Ɛ0} \times \text{P}}$$

Ɛ: absorción a 670nm o 472nm

ε_0: coeficiente de extinción específica para cada pigmento (feofitina-a)=613 y (luteína)=2000

P: peso muestra (g)

V: volumen disolución de pigmentos (25 mL)

4.5.5. Determinación de los Tocoferoles

Se ha seguido el método propuesto por Cunha y cols., 2006. Para la determinación de tocoferoles en las muestras objeto de análisis, se disuelve 0.20±0.01 g de muestra de aceite en 10mL de n-hexano. La muestra es inyectada en un cromatógrafo de líquidos de alta resolución. Se inyectó un volumen de 20µL. La fase móvil utilizada fue Hexano:Isopropanol (97:3 v/v) en condiciones isocráticas. Los cromatogramas se registraron a 275 nm. Seguidamente se construyó la recta de calibrado a partir del estándar, utilizándose para la cuantificación. Los picos correspondientes a los diferentes patrones fueron (Figura 4.5).

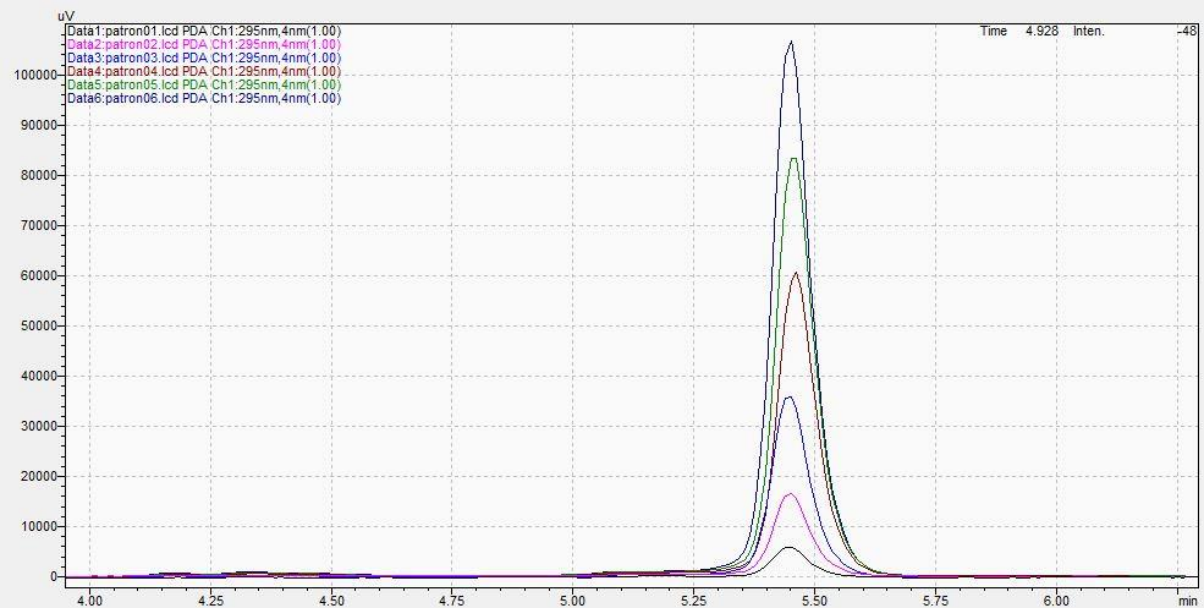

Figura 4.5. Cromatograma de los patrones

La ecuación de la recta fue: y=6641x-42194; R^2=0,9987 siendo, y=área; x=concentración (ppm).

Los resultados se expresaron en mg de tocoferol por kg de aceite.

4.5.6. Determinación de triterpenos

Para la determinación del contenido en triterpenos se ha seguido el método propuesto por Fernández-Hernández y cols., (2015).

Los triterpenos se han extraído por el método de extracción actual. Para ello, se pesa 2.00 ± 0.01g de muestra y se le añade 20mL de metanol (calidad HPLC). Se agita (1hora) y centrifuga el extracto (5min) a 4000 r.p.m. Posteriormente, se retira 0.5mL de sobrenadante, diluyendo éste con la fase móvil (acetonitrilo-agua, 75/25 v/v).

En un vial se coloca 100µL de patrón interno 18β-glycerhitic (24mg/kg), y seguidamente, se filtra con una jeringa, 3mL de dilución del extracto de triterpenos para ser analizado por UPLC-MS.

A través de las áreas integradas de cada compuesto y la recta patrón obtenida anteriormente se calcula el contenido en ácidos triterpénicos.

Las condiciones para el análisis por UPLC-MS de los compuestos triterpénicos se recogen en la Tabla 4.6. y Tabla 4.7.

Tabla 7.6. Condiciones optimizadas de MRM para el estudio de compuestos triterpénicos por UPLC-MS/MS.

Compound	Precursor ion (m/z)	Quantitation (MRM_1)			Confirmation (MRM_2)		
		Product ion	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Product ion	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Oleanolic acid	455.54	407.65	90	40	389.71	90	45
Maslinic acid	471.48	393.36	80	40	405.21	80	50
Ursolic acid	455.49	407.45	85	40	166.47	85	45
Erythrodiol+Uvaol	265.31	97.05	50	20	216.56	50	20
Linoleic acid	279.37	261.38	45	17	58.95	45	17
18β-glycyrrhetinic acid	469.47	425.45	90	40	355.37	90	50

Tabla 4.7. Tiempo de retención, ecuación de regresión, r^2 para el análisis de compuestos triterpénicos por UPLC-MS/MS en soluciones estándar.

Compound	Retention time (min)	Regression equation	r^2
Oleanolic acid	4.54	y = 0.0003x – 1.1388	0.9999
Maslinic acid	1.78	y = 0.0002x – 3.7261	0.9966
Ursolic acid	4.28	y = 0.0003x – 1.2226	0.9998
Erythrodiol+Uvaol	3.69	y = 0.0005x – 5.1192	0.9972
Linoleic acid	6.42	y = 0.0013x + 1.5205	0.9999
18β-glycyrrhetinic acid	2.10	y = 0.00002x + 0.3189	0.9966

4.5.7. Polifenoles cualitativos

Se ha seguido el método propuesto por Suárez y cols., 2008. Para la determinación de polifenoles cualitativos se hace una extracción de los polifenoles, seguido de su análisis por UPLC-MS.

Para ello se pesa 5.00 ± 0.01g de muestra y se le añade 20mL de una mezcla de metanol-agua (80:20, v/v). Se agita a temperatura ambiente durante 30 minutos y seguidamente se centrifuga a 4000 r.p.m 5 minutos. Una vez recogidos los 0.5mL de sobrenadante, se diluye al 5% (v/v) con acetonitrilo (LC-MS). En un vial se añade 100µL de patrón interno 4-Ethylphenol (40mg/kg), añadiendo posteriormente el extracto fenólico diluido (3mL) para ser analizado por UPLC-MS.

Las condiciones de MRM para el análisis de algunos de los polifenoles analizados, así como las ecuación de la recta se recogen en las Tabla 4.8 y Tabla 4.9.

Tabla 4.8. Condiciones optimizadas de MRM para el estudio de polifenoles por UPLC-MS/MS.

Compound	Precursor ion (m/z)	Quantitation (MRM_1)			Confirmation (MRM_2)		
		Product ion	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)	Product ion	Cone voltage (V)	Collision energy (eV)
Hydroxitirosol (HYT)	152.86	123.00	25	17	53.01	25	20
Luteolina	285.19	133.05	45	27	151.04	45	27
Apigenina	269.19	117.10	45	30	151.07	45	30
Vanillin	151.09	136.07	15	10	92.05	15	20
P-Coumaric	163.14	119.08	20	10	93.00	20	23
Van Acid	167.05	123.06	25	10	151.98	25	10
3,4-DHPEA-EDA (DOA)	319.00	195.00	40	5	183.00	40	10
p-HPEA-EDA (DLA)	303.00	285.00	30	5	179.00	30	5
3,4-DHPEA-EA (AOA)	377.00	275.00	35	10	307.00	35	10
p-HPEA-EA (ALA)	361.00	30	291.00	10	259.00	10	10

Tabla 4.9. Ecuación de regression, r^2, para el análisis de polifenoles por UPLC-MS/MS en soluciones estándar.

Compound	Regression equation	r^2
Hidroxitirosol	y = 0.005894x + 0.118	0.9999
Vanillin	y = 0.00204x + 0.6911	0.9999
Van acid	y = 0.0010x + 0.3463	0.9912
p-coumarico	y = 0.0018x + 0.3657	0.9999
T-cinamic	y = 0.0021x + 0.3999	0.9835
Luteolina	y = 0.0008x + 0.2758	0.9737
Apigenina	y = 0.0007x + 0.1988	0.9971
DOA	y = 0.00196x – 0.244	0.9971
DLA	y = 0.0012x + 0.3884	0.9609
AOA	y = 0.00293x + 0.5114	0.9856
ALA	y = 0.001555x - 0.514	0.9745

Se calculan los compuestos fenólicos a través del área integrada de cada compuesto, aplicando la recta patrón obtenida.

4.5.8. Determinación de plaguicidas

El método de extracción utilizado para la determinación de plaguicidas fue el método QuEChERS (Cunha y cols., 2007).

Para realizar el método QuERChERS, se pesaron 3.00 ± 0.01 g de muestra en un tubo de centrífuga de plástico de 50 mL, seguidamente se añadió 7 mL de agua ultrapura y 10 mL de ACN. Se agitó el contenido de forma manual (1min), y centrifugó a 3700 rpm (1min). Se tomaron 5 mL de sobrenadante y se introdujeron en un tubo de centrífuga donde se le había añadido anteriormente: 0.75 ± 0.01 g de $MgSO_4$ y 0.25±0.01 g de PSA. Se agitó el tubo de forma manual durante 30 seg y se volvió a centrifugar a 3700 rpm durante 1 min. Una vez centrifugado, se recogió 3 mL de sobrenadante para proceder a su análisis por UPLC-MS. Ese sobrenadante se filtró a través de un filtro de teflón llevándolo a un vial.

Para su determinación se ha usado un equipo de cromatografía de líquidos de ultra-rápida resolución, acoplado a un espectrómetro de masas con detector: UPLC-MS. Y se calculan los contenidos de los diferentes compuestos a través del área integrada de cada compuesto, aplicando la recta patrón obtenida con anterioridad.

5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se ha realizado un estudio sobre las posibles modificaciones en las características de los aceites a consecuencia del cambio en las técnicas de cultivo en nuestro olivar. Para analizar su influencia sobre dichas características, se han plasmado los resultados obtenidos para parámetros de calidad reglamentada (Reglamento (UE) 2568/91 consolidado en 2015), de composición nutricional y terapéutica, de los que hemos seleccionado la composición en antioxidantes naturales (pigmentos, tocoferoles, triterpenos y polifenoles) y de parámetros de seguridad alimentaria (plaguicidas).

Se considerará la tendencia sufrida en los parámetros de calidad reglamentada (acidez, índice de peróxidos, K_{232}, K_{270}). Las determinaciones analíticas se han realizado conforme a los métodos descritos en el Capítulo 4.5 de este Trabajo Fin de Máster.

En las diferentes figuras se recogen los resultados obtenidos de los parámetros de calidad reglamentada y composición, destacando que los valores observados en todos los tratamientos se encontraban dentro de los límites establecidos por el Reglamento (UE) Nº 1348/2013 modificando al Reglamento (CEE) 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, clasificando a los aceites obtenidos en la categoría de Aceite de Oliva Virgen Extra , en su Anexo 1.

En todas las determinaciones se hizo un total de dos repeticiones por cada muestra, representando gráficamente la media aritmética de los dos resultados obtenidos. La procedencia de las muestras seleccionadas para este estudio se explicó anteriormente en el Capítulo 4.4.

a) Determinación de la Acidez

Se ha analizado y calculado el grado de acidez para las diferentes muestras, los resultados obtenidos se reflejan en la Figura 5.1.

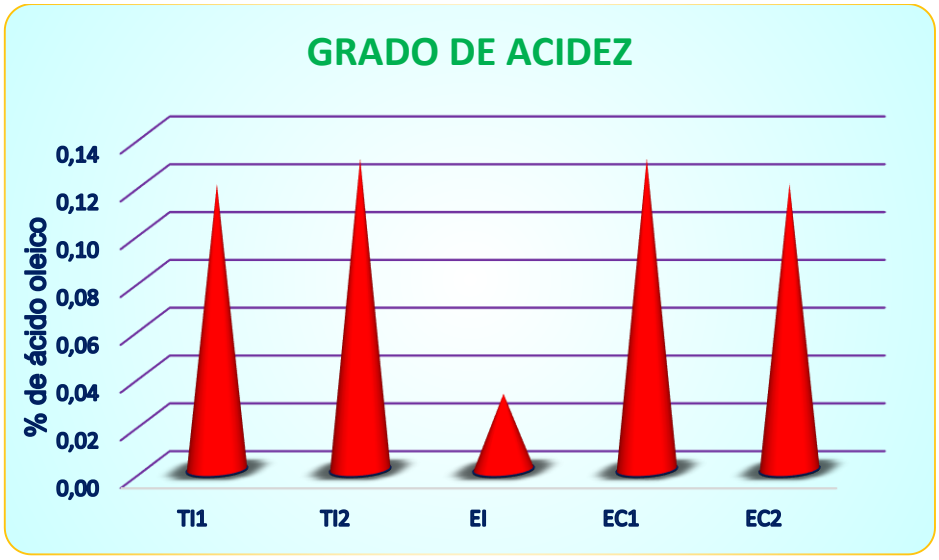

Figura 5.1. Acidez en las muestras estudiadas. Resultados expresados como valor medio para n=2.

Todos entran dentro de la categoría como Aceite de Oliva Virgen Extra, ya que tienen un grado de acidez ≤ 0.8, dato registrado en el Anexo I del Reglamento 2568/91 consolidado 2015.

Se puede ver en la Figura 5.1., que existe una gran diferencia en la muestra EI (cultivo ecológico parcela controlada), con respecto a las demás muestras. Comparándola con los de cultivo convencional (TI1, TI2), como corresponden a la misma plantación, se puede ver con claridad la diferencia entre un ecológico y un convencional, presentando el ecológico una acidez mucho menor que las convencionales. Pero esta muestra EI si la comparamos con las otras dos muestras comerciales de cultivo ecológico (EC1, EC2), también presenta diferencia, aun perteneciendo las tres a un cultivo ecológico. Esto se debe a que la muestra EI, se trata de una muestra perteneciente a una plantación controlada, pero en cambio las muestras comerciales no se puede asegurar el control que han tenido y el estado en el que se encontraban los frutos antes de su procesamiento. La justificación del cambio entre la muestra perteneciente a un cultivo ecológico de plantación controla con respectos a las demás muestras se puede justificar en base a la cantidad de ácidos grasos libres, ya que la acidez determina la cantidad de ácidos grasos libres que hay presentes en las muestras de aceite, ésta se expresa en porcentaje de ácido oleico. En una aceituna sana que está en el árbol, su aceite tiene un 0% de acidez

libre, por ese motivo, la presencia de los ácidos grasos libres es debida a alguna anomalía como el estado de los frutos, mal tratamiento o mala conservación.

Por todo esto, un aceite de índice de acidez muy bajo es un aceite de alta calidad (como ocurre con la muestra EI, la cual tiene un grado de acidez mucho más bajo de 0.1), en el que la aceituna procesada estaba en buenas condiciones en el momento de la recolección, con un estado de madurez adecuado, sin problemas sanitarios y un buen proceso de extracción (Troncoso y cols., 2006).

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la acidez de los aceites es un parámetro influenciado por factores externos, agronómicos y/o industriales. En este trabajo, los frutos fueron recolectados sanos y en su momento óptimo de maduración junto a una extracción del Aceite de Oliva Virgen con condiciones controladas, hecho que justifica los resultados obtenidos. Además, las práctica agronómicas empleadas en ambos sistemas de cultivo, ecológico y convencional, no afecta negativamente a la calidad del Aceite de Oliva Virgen obtenido.

b) Determinación del Índice de Peróxidos

Los resultados obtenidos de los análisis de la determinación del índice de peróxidos se recogen en la Figura 5.2.

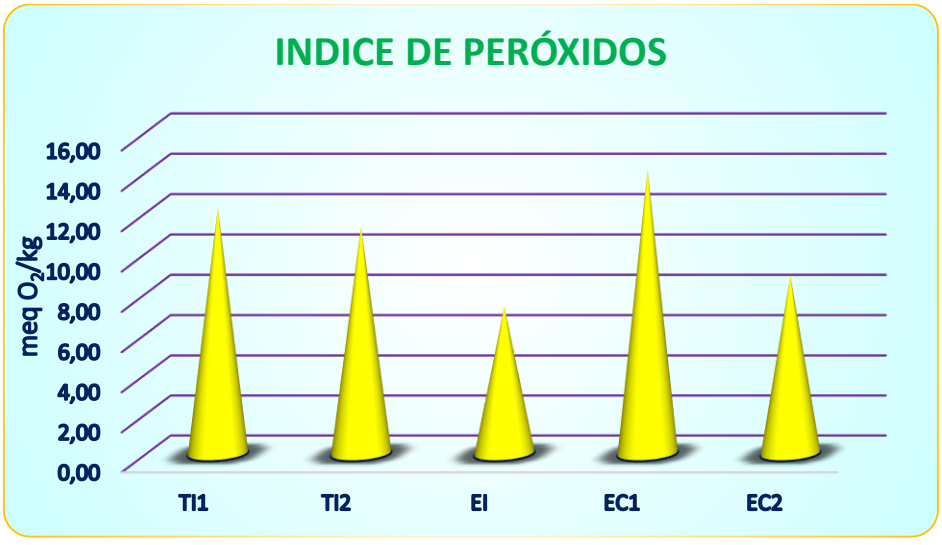

Figura 5.2. Índice de peróxidos de las muestras estudiadas. Resultados expresados como valor medio para n=2.

Todos entran dentro de la categoría como Aceite de Oliva Virgen Extra, ya que tienen un índice de peróxidos ≤ 20 meq O_2/kg aceite, dato registrado en el Anexo I del Reglamento 2568/91 consolidado 2015.

El índice de peróxidos determina el estado de oxidación primaria de un aceite antes de que se aprecie el olor y sabor a rancio. Las grasas se oxidan al entrar en contacto con el oxígeno del aire. Cuando una grasa comienza a oxidarse se forman diversos compuestos; entre ellos, se encuentran los peróxidos, que se consideran los primeros productos de la oxidación. Cuanto mayor sea este valor, peor será la calidad del aceite y menor la aptitud que presenta para su conservación.

Como se puede ver en la Figura 5.2. hay un incremento de este parámetro en los comerciales ecológicos con respecto al ecológico de plantación controlada, esto puede ser debido a que el índice varía con las altas temperaturas ambientales, alteraciones incorrectas en la conservación de estos aceites, o condiciones de elaboración tanto en patio como en fábrica. El menor índice de peróxidos en el aceite procedente de la plantación de ecológico controlada frente a los convencionales, al proceder de la misma plantación, puede ser debido, como señalaba Di Giovacchino, (1998), en primer lugar a las condiciones del proceso de elaboración y de la calidad de las aceitunas y no del estado de madurez. Al igual que en los estudios realizados por Rotondi *y cols.*, (2004), y Cires, (2007), en los que detectaron que el índice de peróxidos no presentó diferencias significativas a lo largo del proceso de maduración.

c) Medida espectrofotométrica de absorción en la región ultravioleta (K_{232} y K_{270}).

En la Figura 5.3 se recogen los resultados obtenidos de las muestras objeto de estudio de la medida espectrofotométrica de absorción en la región UV a 232 y 270 nm.

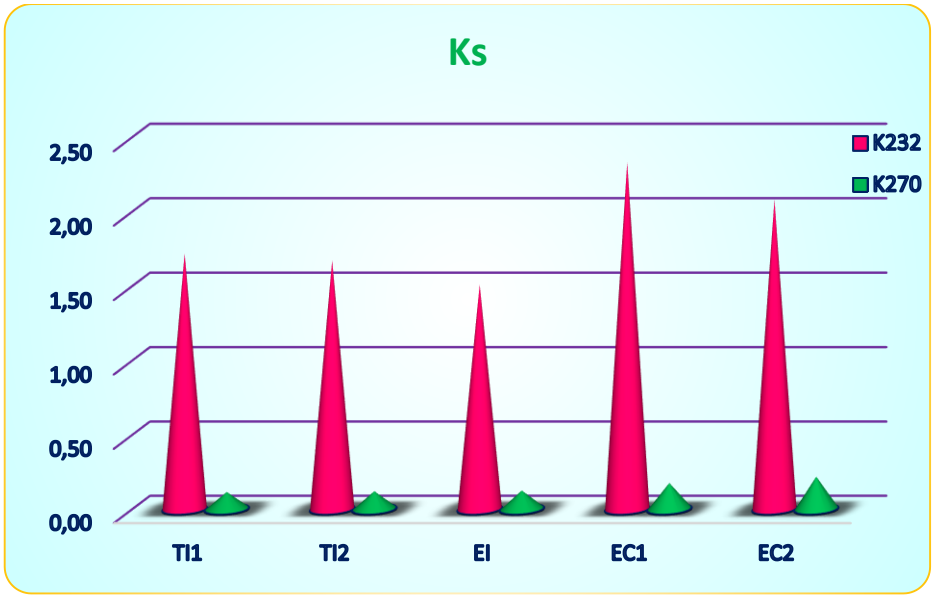

Figura 5.3. K_{232} y K_{270} de las muestras estudiadas. Resultados expresados como valor medio para n=2.

Todos entran dentro de la categoría como Aceite de Oliva Virgen Extra, ya que tienen un $K_{232} \leq 2.50$ y un $K_{270} \leq 0.22$, datos registrados en el Anexo I del Reglamento 2568/91 consolidado 2015. Este método proporciona una impresión sobre la frescura que tiene el Aceite de Oliva (Figura 5.3). Estos parámetros están relacionados con el índice de peróxidos, ya que seguimos determinando el estado oxidativo de los aceites, pero en este caso, se miden hasta la obtención de los productos secundarios y/o finales de la oxidación. La justificación de que el K_{232} sea menor que el K_{270} es debido a que los aceites no han sufrido una oxidación excesiva. El valor de K_{232} estima la cantidad de hidroperóxidos que existen en el Aceite de Oliva Virgen, mientras que el K_{270} da información sobre el estado más avanzado de oxidación, indicando la cantidad de compuestos secundarios formados a partir de los hidroperóxidos en el proceso de oxidación.

A medida que el proceso oxidativo avanza, los peróxidos se van modificando obteniéndose otro tipo de componentes: α-dicetonas o cetonas α - insaturadas que absorben luz UV. a distinta longitud de onda (270 nm) que los hidroperóxidos. En un aceite obtenido de una aceituna sana, que no haya sido sometido a ningún tratamiento diferente de las operaciones físicas propias de la extracción, su valor es generalmente inferior a los límites establecidos para K_{232} y K_{270}.

Al igual que la acidez libre y el índice de peróxidos, el coeficiente de extinción ultravioleta es un parámetro que no varía de forma significativa durante la maduración, ya que dependen esencialmente de la calidad de las aceitunas (Di Giovacchino, 1998), así como también del proceso de extracción.

El medio agrológico tiene una escasa influencia sobre la calidad reglamentada medida por: el índice de acidez, el índice de peróxidos y la transmisión al ultravioleta a 270 nm o K_{270} (Jiménez *y cols.*, 1999). Las variaciones de los parámetro físico-químicos tales como el índice de acidez, el índice de peróxidos, están más inducidas por factores externos, como las prácticas culturales, tratamientos fitosanitarios, el proceso de elaboración, el almacenamiento y la conservación (Jiménez *y cols.,* 1999)

Cabría indicar que las diferencias significativas halladas en los distintos parámetros químicos en relación al estado de oxidación del Aceite de Oliva Virgen (K_{232}, K_{270} e Índice de Peróxidos) no implican una correlación entre el estado de oxidación de los mismos y las distintas prácticas agrícolas empleadas en las plantaciones convencionales y ecológicas seleccionadas para llevar a cabo este trabajo.

d) Pigmentos clorofílicos y carotenoides

En el siguiente gráfico se representan los valores de los resultados de los pigmentos clorofílicos y carotenoides analizados (Figura 5.4).

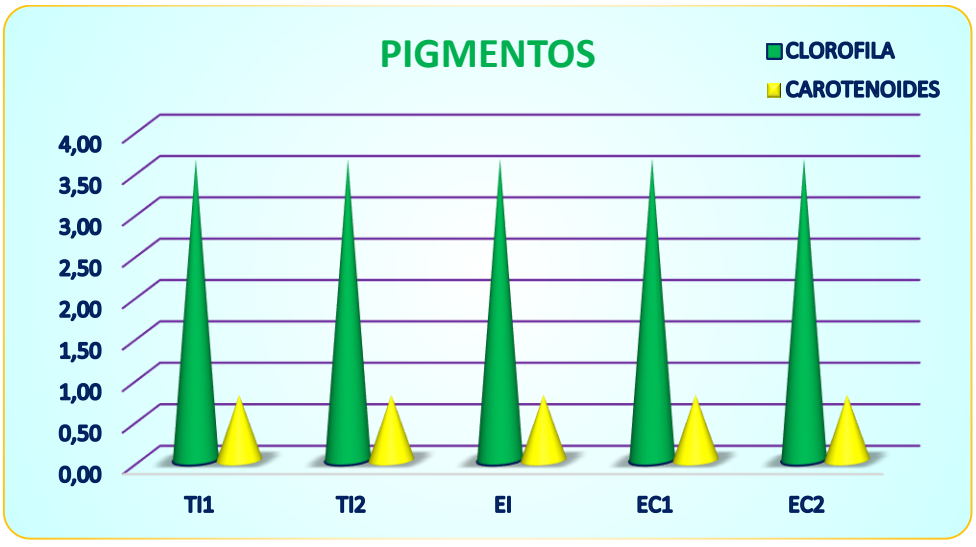

Figura 5.4. Pigmentos clorofílicos y carotenoides de las muestras estudiadas. Resultados expresados como valor medio para n=2.

Los pigmentos clorofílicos y carotenoides son los responsables de dar una coloración verde-amarillenta a las muestras de aceite (Pinto y Martínez, 2008).

Para su cálculo se midió los componentes mayoritarios de la fracción clorofílica y carotenoide, cuyas medidas de absorción son a 670 y 472 nm respectivamente, el procedimiento se puede ver en el Capítulo 4.5.

En la Figura 5.4. se puede apreciar que hay menor cantidad de carotenoides en todas las muestras con respecto al contenido en clorofilas, esto es debido a que en todos los casos, se tratan de aceites tempranos, que en la variedad 'Picual', predominan las clorofilas.

No existe cambio alguno entre las diferentes muestras, ni en la cantidad de carotenoides ni en la cantidad de clorofilas, esto se debe a que el análisis de los pigmentos del aceite no es un indicativo de la calidad. El contenido en pigmentos se relaciona con el momento de la maduración del fruto, y todas las muestras se recogieron en la misma época, por ese motivo no existe ningún cambio entre ellas. Por lo que no se encuentran diferencias en los resultados del análisis de pigmentos en las muestras con distintas prácticas agrícolas llevadas a cabo en este estudio.

e) Determinación de tocoferoles

En la siguiente gráfica se pueden ver los resultados del análisis de tocoferoles analizados en las muestras de aceite (Figura 5.5).

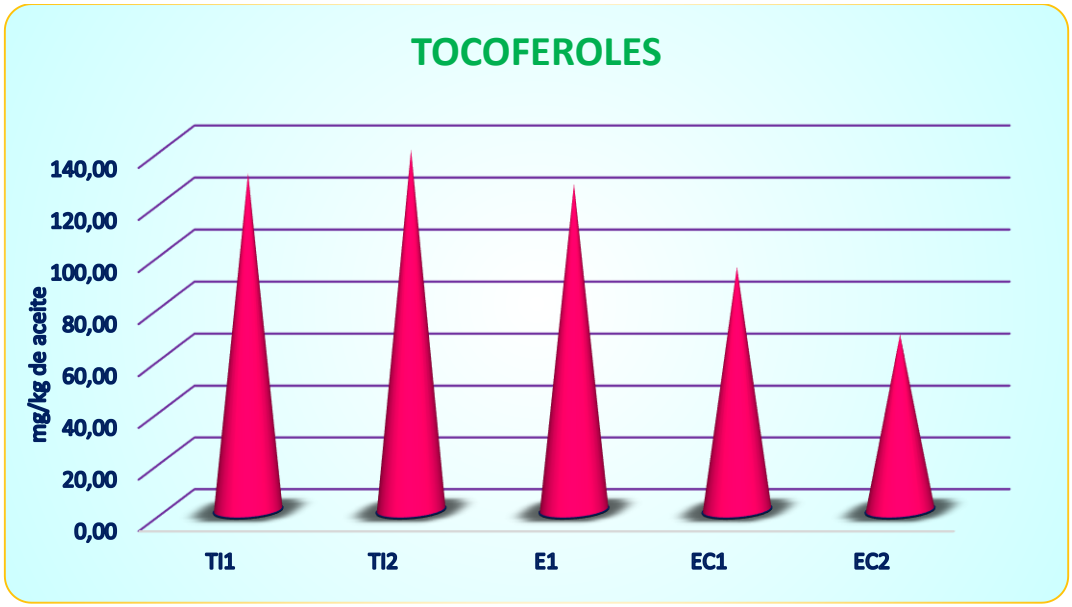

Figura 5.5. Tocoferoles de las muestras estudiadas. Resultados expresados como valor medio para n=2.

Los tocoferoles como antioxidantes naturales, están relacionados con la estabilidad de un aceite y así como el estado de oxidación. La concentración en tocoferoles en el Aceite de Oliva Virgen varía en función de algunos factores como la variedad de la aceituna, el grado de madurez, condiciones y duración del almacenamiento, etc. (Pinto y Martínez, 2008).

Por ese motivo, como los ecológicos comerciales presentaban valores mayores de índice de peróxidos, ahora el contenido en tocoferoles es menor (Figura 5.2).

No se observan diferencias entre las plantaciones controladas, tanto convencional como ecológico, siendo de la misma variedad y en el mismo lugar, lo que le hace estar en condiciones atmosféricas y agronómicas similares, elaborando finalmente aceites con similares contenidos en antioxidantes naturales, como es el caso de los tocoferoles. Como tales antioxidantes naturales, en caso de procesos de oxidación del aceite, estos serían los primeros en degradarse antes de llegar a la fracción saponificable (98% fracción lipídica de ácidos grasos). Su menor contenido en las muestras de Aceite de Oliva Virgen Extra ecológicas comerciales, vuelve a indicar alteraciones en la calidad por factores externos en la conservación del aceite

y una mayor oxidación, como se observó para los resultados del índice de peróxidos (Figura 5.2) y coeficientes ultravioleta (K_{232} y K_{270}) (Figura 5.3).

f) Determinación de triterpenos

Para el análisis de la composición triterpénica se han seleccionado los compuestos mayoritarios en el Aceite de Oliva Virgen Extra, acidos triterpénicos (maslínico y oleanólico) y los alcoholes triterpénicos (uvaol y eritrodiol) (Figura 5.6).

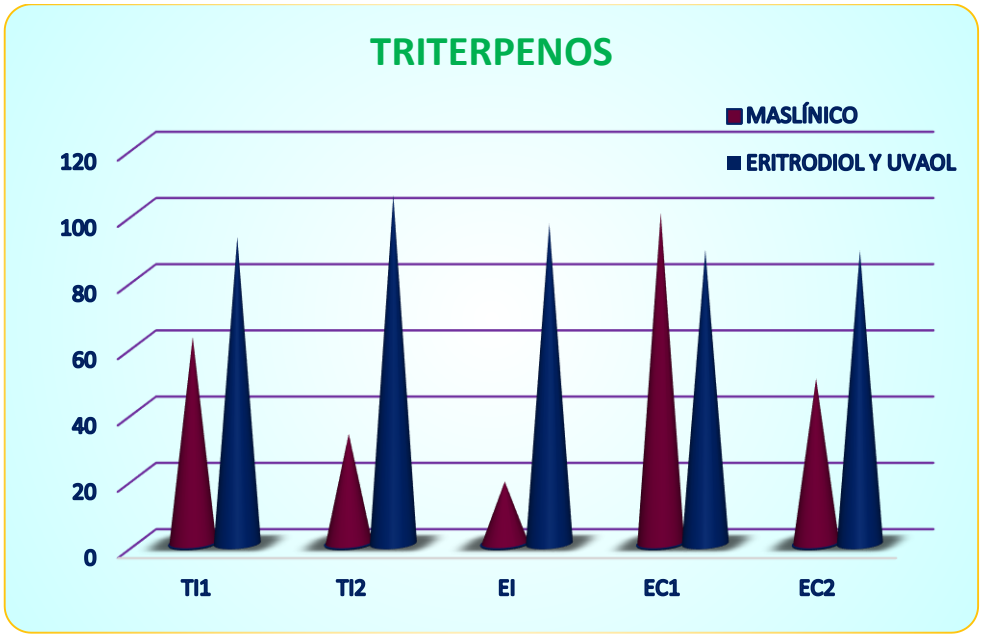

Figura 5.6. Composición triterpénica de las muestras estudiadas. Resultados expresados como valor medio para n=2.

El contenido de Ácido Oleanólico en el Aceite de Oliva Virgen Extra es tan bajo que no ha podido ser cuantificado al encontarse por debajo de los límites de detección. El contenido de los alcoholes triterpénicos (Eritrodiol y Uvaol) (Figura 5.6) es mayor al contenido de los ácidos triterpénicos (Maslínico) (Figura 5.6) ya que estos se encuentran en mayor proporción en el aceite, debido a que los ácidos son más apolares frente a los alcoholes que son más polares, y el coeficiente de reparto será diferente (Pinto y Martínez, 2008). Un mayor o menor contenido no influye en la

calidad reglamentaria de la normativa, pero como son compuestos saludables cualquier contenido que sea superior a 0 hace el aceite más nutricional y terapéutico.

No hay gran diferencia entre ellas en el contenido en alcoholes triterpénicos, todas tienen un contenido similar. Pero en cambio, sí que existen cambios en todas en el contenido en ácidos triterpénicos. El contenido en maslínico es muy diferente entre las muestras estudiadas, la muestra de cultivo ecológico de plantación controlada es la que menos contenido tiene, en cuanto a las dos muestras de cultivo ecológico comercial también tienen diferencias entre ellas, obteniendo una de ellas un contenido muy alto con respecto a las demás (Figura 5.6), pero incluso las muestras de cultivo convencional tienen diferencias entre ellas. Por este motivo, el contenido en compuestos triterpénicos está influenciado por otros factores de los que no depende el método de cultivo, sino la humedad del fruto entre otras.

g) Determinación de polifenoles cualitativos

Se han analizado los siguientes polifenoles: Hydroxitirosol (HYT), Luteolina, Apigenina, Vanillin, P-Coumaric, Van Acid, T-Cinamic, 3,4-DHPEA-EDA (DOA), p-HPEA-EDA (DLA), 3,4-DHPEA-EA (AOA), p-HPEA-EA (ALA).

El contenido en Apigenina es tan bajo que no ha podido ser cuantificado al encontrarse por debajo de los límites de cuantificación.

En el siguiente gráfico se puede comparar los polifenoles analizados en las diferentes muestras (Figura 5.7)

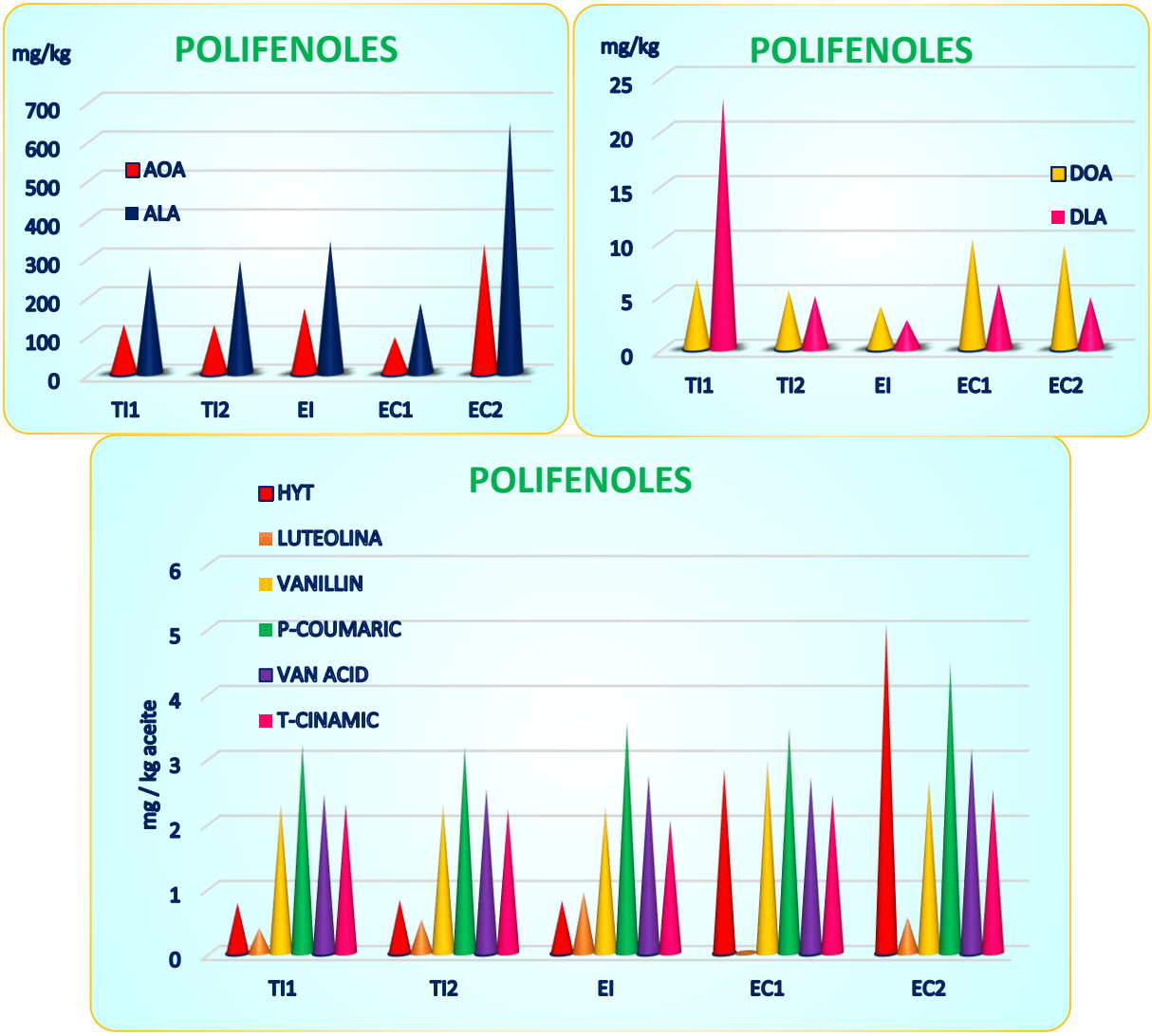

Figura 5.7. Polifenoles de las muestras estudiadas. Resultados expresados como valor medio para n=2.

El contenido en polifenoles es muy variable como se puede ver en la Figura 5.7. En cuanto al contenido en HYT de las diferentes muestras, en las muestras de cultivo convencional y ecológico de plantación controlada tienen una cantidad similar y a la vez mucho menor que la de las muestras comerciales de cultivo ecológico, esto es debido a que el control en las comerciales no ha sido controlado como en las anteriores. Aunque puede ser debido a una mala conservación de las muestras lo que también se observó en el estudio de los parámetros de oxidación (índice de peróxidos, K_{232}, K_{270}) como de otros antioxidantes naturales (tocoferoles).

En todas las muestras el contenido en Vanillin, P-Coumaric, Van Acid y T-Cinamic es similar en todos los casos, exceptuando un contenido mayor en P-Coumaric para el caso de una de las muestras comerciales de cultivo ecológico (Figura 5.7). El contenido en DOA y DLA en las muestras es mayor que el contenido en los polifenoles anteriormente citados, incrementándose el contenido de DOA en las muestras comerciales con respecto a las de cultivo convencional y ecológico de plantación controlada. En cambio en contenido de DLA en una de las muestras de cultivo convencional de plantación controlada es mucho mayor que en las demás. El contenido en AOA y ALA es muy similar en todas las muestras exceptuando nuevamente una de las muestras comerciales de cultivo ecológico (Figura 5.7).

La composición fenólica de los aceites, está influenciada en mayor peso por factores como la variedad (aunque en menor medida que otros parámetros), el medio edafoclimático, la época de recolección, la campaña, el nivel de cosecha, condiciones de riego, índice de madurez y la interacción entre todos ellos (Barranco,1998; Inglese, 1994).

Los polifenoles son antioxidantes naturales muy importantes para la estabilidad del aceite. Existe una relación positiva entre la cantidad de polifenoles y resistencia a la oxidación. Altas concentraciones le confieren al aceite características de amargor y pungencia (sensación de picor), atributos considerados positivos. El contenido de polifenoles nos da información de la calidad nutricional, estabilidad y características sensoriales del Aceite de Oliva Virgen.

h) Determinación de plaguicidas

Se han analizado una serie de plaguicidas en las diferentes muestras, los cuales han sido: Oxifluorfen, Cabaryl, Dimetoato, Diuron, Diflufenican, Terbutilazina, Amitrol. Pero el contenido en la mayoría de ellos es tan bajo que se encuentra por debajo del límite de detección. Solo se han encontrado trazas de Oxifluorfen, Carbaryl y Amitrol, como se puede ver en la Figura 5.8.

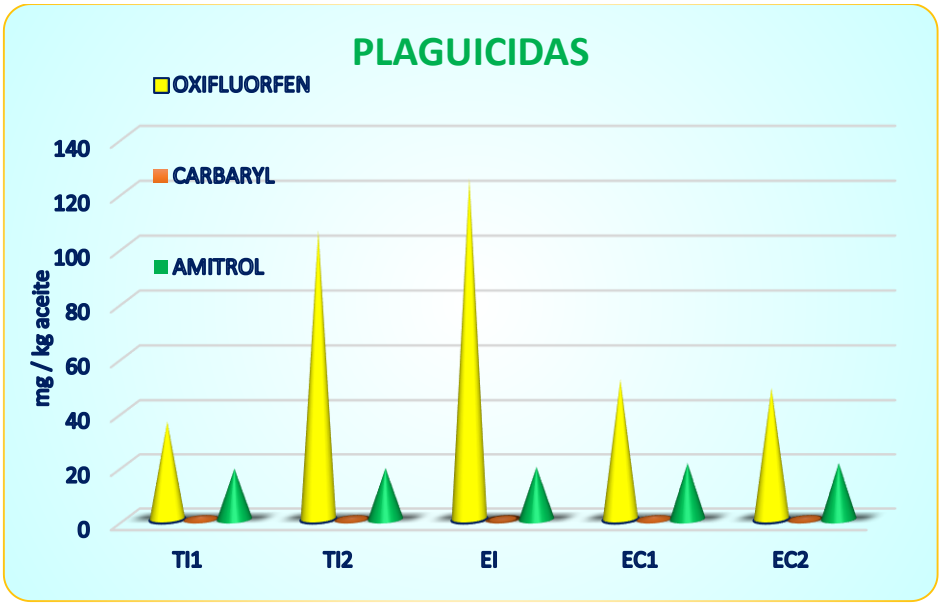

Figura 5.8. Plaguicidas de las muestras estudiadas. Resultados expresados como valor medio para n=2.

El contenido en Amitrol es muy parecido en todas la muestras analizadas, en todas sobrepasa el Límite Máximo de Residuos que tiene que ser menor a 0.05 mg/kg (CODEX, 2016). El Amitrol es un herbicida sistémico, que se aplica en postemergencia, este producto se encarga de destruir las plántulas procedentes de las semillas que germinan en la zona superficial del suelo. En el suelo se degrada con rapidez, no se acumula y tiene un bajo riesgo de contaminación por lavado. La persistencia depende la la dosis que se aplique, alcanzando hasta 4 meses (terralia, 2014).

El contenido en Carbaryl es casi inapreciable en todas las muestras, y no sobrepasa el Límite Máximo de Residuos ya que tiene que ser menor de 25 mg/kg (CODEX, 2016). El carbaryl es un insecticida, ligeramente persistente (2 a 3 semanas) (laguiasata, 2009)

El oxifluorfen es el que mayor contenido tiene en todas las muestras, y comparando entre ellas, el que mayor contenido tiene es la muestra de cultivo ecológico de plantación controlada, seguida de una de las muestras de cultivo convencional de plantación también controlada. Las muestras comerciales tienen un contenido menor y similar entre ellas.

El oxifluorfen es un tipo de plaguicida utilizado en agricultura para el control de maleza. Su utilidad es exclusiva para plantas formuladoras de plaguicidas agrícolas. Es moderadamente persistente (30 a 40 días). En todos los sobrepasa el LMR que tiene que ser inferior a 0.05 mg/kg (CODEX, 2016).

6. CONCLUSIONES

Con la realización de este trabajo, se pretendía estudiar las modificaciones que puede haber en las características de un Aceite de Oliva Virgen Extra con respecto al cambio en las técnicas de cultivo del olivar.

Se ha demostrado que los parámetros de calidad de un Aceite de Oliva Virgen no se ven afectados por las técnicas de cultivo, sino que depende de factores como el proceso de extracción, las condiciones en el momento de la recolección, el estado del fruto, etc.

En cuanto a la composición nutricional y terapéutica (contenido en antioxidantes) es un parámetro muy variable. Pero si se demuestra claramente, que existe un mayor contenido en antioxidante cuando los parámetros de calidad como el índice de peróxidos es menor, ya que los antioxidantes se relacionan con la estabilidad de un aceite y así con el estado de oxidación. El contenido en antioxidantes naturales no se ven afectados tampoco por las técnicas de cultivo, no existen cambios significativos entre el cultivo convencional y ecológico.

Para los parámetros de seguridad alimentaria (plaguicidas), de los siete productos fitosanitarios estudiados: Herbicidas (Amitrol, Diflufenican, Oxifluorfen, Diuron y Terbutilazina) e Insecticidas (Dimetoato, Carbaril) solo se han detectado tres de ellos (Carbaril, Amitrol y Oxifluorfen), obteniendo las misma cantidad de Carbaril y Amitrol y diferencias en el contenido en Oxifluorfen, para las muestras analizadas. En el caso de los Aceites de Oliva Virgen bajo un sistema de cultivo ecológico, no tenían que tener ninguna traza de plaguicida, pero en cambio sí se ha dado la existencia de plaguicidas, esto puede ser debido a la permanencia del plaguicida en el olivar que anteriormente era convencional y se pasó a ecológico, o simplemente que los plaguicidas hayan llegado a ese olivar por el tratamiento con herbicidas en un cultivo vecino.

El control de los tratamientos fitosanitarios en plantaciones con cultivo convencional y ecológico son similares, en los dos tipos se han encontrado trazas de plaguicidas que superan en algunos casos el LMR, como en el caso del Oxifluorfen comentado anteriormente. Por lo que en los dos sistemas de cultivo no se están realizando correctamente según normativa.

7. BIBLIOGRAFÍA

- **Aparicio, R.; Harwood, J.** “Manual del Aceite de Oliva”. AMV- Mundiprensa, Madrid; (2003).
- **Aplicación de Plaguicidas**. Dirección General de Investigación y Formación Agraria. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla (1999).
- **Ávila Rosón, Juan C. y Fernández Sánchez, Jorge F.** Ayer y hoy del cultivo de la producción de aceite. “El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía”. Ed. Fernández Gutiérrez, Alberto y Segura Carretero, Antonio. Servicio de Publicaciones de la Fundación Unicaja, Málaga (España); (2009).
- **Barranco D.; Fernández Escobar R.; Rallo L.** “El cultivo del Olivo”. Junta de Andalucía, Mundiprensa. Madrid, 1997.
- **Beltran G.; Jiménez A.; Aguilera MP.; Uceda M.** “Análisis mediante HPLC de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina. Relación con la medida del amargor K225 y la estabilidad”. Grasas y Aceites 51: 320-324 (2000).
- **Boskou Dimitrios. “**Olive Oil Chemistry and Technology”**.** Ed. Department of Chemistry, Aristotle University of Thessaloniki; Thessaloniki, Greece (2006).
- **Cerretani L.; Gómez Caravaca, Ana M.; Bendini, Alessandra.** Aspectos tecnológicos de la producción del aceite de oliva. “El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía”. Ed. Fernández Gutiérrez, Alberto y Segura Carretero, Antonio. Servicio de Publicaciones de la Fundación Unicaja, Málaga (España); (2009).
- **Civantos, Luis.** La olivicultura en el mundo y en España. “El cultivo del olivo”. Ed. Barranco, Diego; Fernández R.; Rallo L. Junta de Andalucía; Mundiprensa, Madrid (España); (2008).
- **Coscolla, R.** “Residuos de plaguicidas en alimentos vegetales”. Mundi-Prensa, Madrid (España); (1993).
- **Cunha, S.C.; Amaral, J.S.; Fernández, J.O.; Oliverira, M.B.** “Quantification of tocopherols and tocotrienols in portuguese olive olis using HPLC with three different detection systems”. J.Agric, Food Chem, (3351-3356); (2006).
- **Cunha, S.C.; Lehotay, S.J.; Mastovská, K.; Fernandes, J.O.; Oliveira, M.B.P.P.** “Evaluation of the QuEChERS sample preparation approach for the analysis of pesticide residues in olives”. J. Sep.Sci. 30 (2007) 620-632.

- **Del Castillo Quesada, E.; Torres Saura, V.; Álvarez Fernández, B.** "El aceite de oliva y la salud. Proceso industrial y puntos críticos de control en almazaras". Área Sanitaria Norte de Málaga, (España); (2007).
- **Entrala, A.** "Dieta y arterogénesis: tipos de alimentos que influyen en los fenómenos de arteriosclerosis". II Jornadas de Nutrición Práctica, Revista de Nutrición Práctica 2: 77-84, (1998).
- **Eugene D. Olsen.** "Métodos ópticos de análisis". Ed. Reverté, S.A. (1990).
- **Fernández Fernández, Milagros; Yruela Morillo, Mª del Carmen; Ortíz Berrocal, Francisco; Alfonso Almirón, Juan Manuel; Ejido Freiré, Jose; Lirola Peralta, Javier; López Contreras, José; López Rodríguez, Manuel; García Bernal, Juan Pedro; Marqués Córdoba, Francisco; Martín Coleto, Reyes Alonso; Martín Rodríguez, Antonio; Navas Becerra, Juan Andrés; Romero Tortolero, Pablo**. "Aplicación de Plaguicidas". IFAPA, Junta de Andalucía. Sevilla (España); (2007).
- **Fernández Hernández, Antonia; Martínez, Antonio; Rivas Francisco; García Mesa, Jose A; Parra, Andrés**. "Effect of the Solvent and the Sample Preparation on the Determinatión of Triterpene Compounds in Two-Phase Olive-Mill-Waste Samples". IFAPA, Mengíbar (Spain); (2015).
- **F. Rapoport, Hava.** Botánica y morfología. "El cultivo del Olivo". Ed. Barranco D.; Fernández Escobar R.; Rallo L. Junta de Andalucía, Mundiprensa. Madrid (España); (2008).
- **García-ortiz, A.; Frias, L.** "El empleo de alpechín y orujos húmedos. Comunicación I+D Agroalimentaria 18/95".Conserjería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía, Sevilla, (1995).
- **García-ortiz, A.; Giráldez, J.; González, P.; Ordóñes, R**."El riego con alpechín". Agricultura, Revista Agropecuaria, n.º 730, 426-431 (1993).
- **Gutiérrez, F.; Jiménez, B.; Ruiz, A.; Albi. M.A.** "Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extrected from the varieties Picual and Hojiblanca and on the different components involved". Journal of the Agricultural and Food Chemistry, 47: 212-127, (1999).
- **Gúzman, Gloria I.; Foraster, Laía; Sánchez, Juan Luis.** "El olivar ecológico". Junta de Andalucía, Consejo de Agricultura y Pesca, (2012).

- **Jiménez, A.; Uceda, M**. “Características químicas y organolépticas del aceite de oliva virgen de la variedad ‘Arbequina’”. 1 er Simposi de L’Olivera Arbequina a Catalunya. Les Borges Blanques, 145-148 pp (1995).
- **Kapellakis, I. E.; Tsagarakis, K. P.; Crowther, J. C**. “Olive oil history, production and by-product management”. Environment Science Biotechnology, 7: 1-26, (2008).
- **Lozano Sánches, Jesús; Segura Carretero, Antonio; Fernández Gutiérrez, Alberto.** Composición del aceite de oliva. “El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía”. Ed. Fernández Gutiérrez, Alberto y Segura Carretero, Antonio. Servicio de Publicaciones de la Fundación Unicaja, Málaga (España); (2009).
- **Manual de buenas prácticas agraria** en los diferentes sistemas de productivos del olivar andaluz. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, 2006.
- **Martínez Martínez, Pilar.** Sistemas de cultivo. Factores agronómicos, climáticos-ambientales, técnicos y socioculturales. “El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía”. Ed. Fernández Gutiérrez, Alberto y Segura Carretero, Antonio. Servicio de Publicaciones de la Fundación Unicaja, Málaga (España); (2009).
- **Mínguez, M.I., Rejano, L., Gandul, B., Sánchez, A. y Garrido, J.** “Color-Pigment correlation in virgin olive oil”. *Journal of the American Oil Chemists' Society.* 68, (1991); 332-336.
- **Montedoro, G.; Garofalo, L.** “Características cualitativas de los aceites de oliva vírgenes. Influencia de algunas variables: variedad, medio ambiente, extracción y conservación de producto acabado”. Revista Italiana Delle Sostanze Grasse, 61: 157-168, (1984).
- **Paganuzzi, V.** “Distribucion of the alcoholic components of the nonsaponifiable matter within the olive drupe. III. Triterpene alcohols”. Riv Ital Sostanze Grasse 57(3): 145-149, (1980).
- **Picornell Buendía, M.R. y Melero Martínez, J.M.** “Historia del cultivo del olivo y el aceite; su expresión en la biblia”. Revista de la Facultad de Educación de Albacete (2013).
- **Plan Director del Olivar Andaluz**. Junta de Andalucía (2011).

- **Quirantes Piné, Rosa; Domínguez Corna, Juan J.; Segura Carretero, Antonio; Fernández Gutiérrez, Alberto.** Técnicas de análisis del aceite de oliva. “El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía”. Ed. Fernández Gutiérrez, Alberto y Segura Carretero, Antonio. Servicio de Publicaciones de la Fundación Unicaja, Málaga (España); (2009).
- **Roig, A.; Cayuela, M.L.; Sánchez-Monedero, M.A.** “An overview on olive mill wastes and their valorisation methods”. Waste Management 26: 960-969, (2006).
- **Skoog, D.A. y Leary, J.J.** “Análisis Instrumental”. Ed. McGraw-Hill, Madrid; (1994).
- **Suárez, Manuel; Macià, Alba; Romero, Maria-Paz; Motilva, Maria José.** “Improved liquid chromatography tándem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil”. Journal of Chromatography A. (2008).
- **Tardáguila, J.; Montero, F.; Olmeda, M.; Alba, J.; Bernabéu, R**. “Análisis del sector del aceite de oliva”. Alimentación, Equipos y Tecnología, 15(3): 41-47, (1996).
- **Uceda, M.; Frías, L.** “Epocas de recolección. Evolución del contenido graso y de la composición y calidad del aceite”. II Seminario Oleícola Internacional. Córdoba, (1975).
- **Valenzuela, A.; Nieto, S.** “Syntetic and natural antioxidants: food quality protectors”. Grasas y Aceites, 47: 186-196, (1996).
- **Vázquez Roncero. A.** “Química del Olivo. I. Los componentes orgánicos I”. Grasas y Aceites 14: 262-270, (1963).

WEB

- http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/76-the-olive-tree
- http://www.magrama.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/esyrce/
- http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/standards/pestres/materias-primas/es/
- http://plaguicidas.comercio.es/productos.aspx
- http://www.infoagro.com/abonos/lmr_cultivo.asp?id=68