



UNIVERSIDAD DE JAÉN  
*Centro de Estudios de Postgrado*

## Trabajo Fin de Máster

# ***DIFERENCIACIÓN DEL OLIVAR ECOLÓGICO MEDIANTE METABOLÓMICA APLICADA A LA HOJA***



**Alumno/a: Colón Rosa, Natalia F.**

Tutor/a: Dr. Gabriel Beltrán Maza  
Dpto: **Instituto de Investigación y Formación  
Agraria y Pesquera. Consejería de Agricultura,  
Pesca y Desarrollo Rural**

Diciembre 2017

## ÍNDICE

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| RESUMEN.....                                                                     | 1  |
| 1. ANTECEDENTES.....                                                             | 2  |
| 1.1 El cultivo del olivo.....                                                    | 2  |
| 1.2 Una breve historia de la olivicultura.....                                   | 2  |
| 1.3 Importancia del cultivo del olivo.....                                       | 3  |
| 2. SISTEMAS DE CULTIVO DEL OLIVO .....                                           | 5  |
| 2.1 El sistema de cultivo convencional.....                                      | 5  |
| 2.2 El sistema de producción integrada.....                                      | 6  |
| 2.3 El sistema de cultivo ecológico.....                                         | 7  |
| 2.3.1 El efecto del cultivo ecológico en las plantas.....                        | 9  |
| 3. LA HOJA DEL OLIVO.....                                                        | 11 |
| 4. Composición de la hoja de olivo.....                                          | 13 |
| 4.1 Importancia del estudio de los compuestos fenólicos de la hoja de olivo..... | 14 |
| 4.2 Compuestos fenólicos en la hoja de <i>Olea europea</i> .....                 | 18 |
| 5. TRABAJO DE FIN DE MÁSTER.....                                                 | 21 |
| 5.1 Objetivo e hipótesis.....                                                    | 22 |
| 5.2 Materiales y métodos.....                                                    | 23 |
| 5.3 Resultados y discusión.....                                                  | 27 |
| 5.3.1 Optimización de la preparación de la muestra.....                          | 27 |
| 5.3.2 Efecto del sistema de cultivo sobre la humedad de la hoja.....             | 28 |
| 5.3.3 Compuestos fenólicos.....                                                  | 30 |
| a. Alcoholes fenólicos.....                                                      | 30 |
| b. Ácidos fenólicos.....                                                         | 33 |
| c. Compuestos secoiridoides.....                                                 | 34 |
| d. Flavonoides libres y glucosilados.....                                        | 35 |
| 5.3.4 Polifenoles totales.....                                                   | 35 |
| 5.3.5 CONCLUSIONES.....                                                          | 38 |
| BIBLIOGRAFÍA.....                                                                | 39 |
| ANEXOS.....                                                                      | 42 |

## AGRADECIMIENTOS

Me gustaría aprovechar este espacio para expresar mi más agradecimiento a todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en particularmente al Dr. D. Gabriel Beltrán Maza y a la Dra. Dña. Araceli Sánchez Ortiz por la orientación, el seguimiento y la supervisión de este proyecto, también por su paciencia y el apoyo recibido a lo largo de estos meses. Igualmente agradecer al Dr. D. Rafael Pacheco Reyes su atención y motivación para continuar.

También deseo agradecer al Dr. Mohamed Aymen Bejaoui por su interés y ayuda incondicional día a día. Al personal del IFAPA, en especial a Ginés quien con alegría me ayudó a ubicar mis parcelas experimentales y para resolver cualquier duda respecto al Centro.

Finalmente, y no menos importante, un agradecimiento muy especial a mi familia: mi padre y mi madre por su apoyo incondicional, y por alentarme en todo momento a seguir adelante, por ofrecerme todo cuanto he necesitado siempre.

A todas estas personas, sinceras gracias

## RESUMEN

El olivar en Andalucía es el cultivo más importante debido a su gran extensión, sin embargo, a pesar de la homogeneidad paisajística existen distintos sistemas de cultivo: convencional, producción integrada y ecológico. Es preciso señalar que los productos ecológicos tienen un valor añadido que los diferencia de otros productos del mercado. Pero, a pesar de los Reglamentos Específicos puede existir fraude en la garantía de que las parcelas sean verdaderamente manejadas de forma ecológica. Es por ello que existe la necesidad de identificar marcadores que indiquen la autenticidad de las prácticas de cultivo ecológico. Este proyecto se enfocó en los compuestos fenólicos de la hoja de olivo. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios implicados en la respuesta de las plantas al estrés. Se intentó determinar el efecto del cultivo ecológico en la composición de la fracción fenólica de la hoja para establecer marcadores moleculares que pudieran diferenciar olivos cultivados bajo condiciones ecológicas. Se extrajo los fenoles de hojas procedentes de cultivo convencional y ecológico mediante HPLC-DAD. Se analizaron fenoles pertenecientes a cuatro grupos: en general no se encontraron diferencias significativas entre cultivo convencional y ecológico para los grupos de compuestos secoiridoides y alcoholes fenólicos. En el grupo de ácidos fenólicos solo se observaron cantidades mayores del ácido caféico en cultivo ecológico para la última época muestreada. Para el grupo de flavonoides, se observó mayores concentraciones en olivar ecológico durante la primera época muestreada, y en las últimas dos se observó cantidades superiores en hojas de cultivo convencional. Para el periodo de tiempo analizado, la fracción fenólica de las hojas no puede ser utilizada como marcador para la diferenciación de olivos cultivados en condiciones convencionales y ecológicas.

**PALABRAS CLAVE:** OLIVAR ECOLÓGICO, FENOLES, HOJA DE OLIVO, METABOLÓMICA, DIFERENCIACIÓN

## ABSTRACT

The olive tree cultivar in Andalusia is the most important crop due to its large extension, however, despite the homogeneity of the landscape there are different farming systems: conventional, integrated production and organic. It should be noted that organic products have an added value that differentiates them from other products in the market. But, despite the specific regulations there might be fraud in the guarantee that olive groves are truly managed with organic practices. For this reason there is a need to identify markers that indicate the authenticity of organic farming. This Project was focused on the phenolic compounds of the olive leaves. Phenolic compounds are secondary metabolites involved in the response of plants to stress. We tried to determine the effect of organic farming on the composition of the phenolic fraction of the leaf to establish molecular markers that could differentiate olive trees grown under organic conditions. The phenols from leaves sampled in conventional and organic parcels were extracted by HPLC-DAD. Phenols belonging to four phenolic groups were analysed: in general no significant differences were found between conventional and organic crops for the groups of secoiridoid compounds and phenolic alcohols. In the group of phenolic acids, only larger quantities of caffeic acid were observed in organic culture for the last season sampled. The group of flavonoids showed higher concentrations in organic olive crops during the first season sampled, and in the last two, higher amounts were observed in conventional crop leaves. In the period of time analysed (March until May), the phenolic fraction of the leaves cannot be used as a marker for the differentiation of olive trees grown under conventional or organic conditions.

**KEY WORDS:** ORGANIC OLIVICULTURE, PHENOLS, OLIVE LEAF, METABOLOMICS, DIFFERENTIATION.

## 1. ANTECEDENTES:

### 1.1 El cultivo del olivo

El olivar en Andalucía se caracteriza por su gran extensión. La representatividad y simbolismo trasciende los límites de la simple práctica agrícola, alcanzando implicaciones agroecológicas, socioeconómicas, culturales y paisajísticas importantes inherentes a la diversa realidad territorial de su explotación. El olivar compone la principal formación vegetal de Andalucía (Guzmán-Álvarez, 2008). En Jaén ocupa alrededor de 590.000 ha, aproximadamente un 42% de la superficie agrícola andaluza. En España, dependiendo del año, se generan alrededor de 3.000 millones de euros con la producción de aceites de oliva. Debido a la profunda implicación del cultivo del olivar en la vida de muchos productores y la importancia cultural que esto supone, es de suma importancia el estudio agronómico del cultivo que genera tanta riqueza en estas tierras.

### 1.2 Una breve historia de la olivicultura

*“Es gracias a una diosa de la mitología griega que nació el olivo. De hecho, fue Atenea, en una lucha con Poseidón por poseer La Acropolis Atica, que hizo brotar el primer árbol de olivo sobre la tierra. Sin lugar a dudas Zeus decretó la victoria a Atenea porque había otorgado a la ciudad el regalo más hermoso y útil para el hombre: el primer olivo, de hecho considerado símbolo de paz” -DOP Umbria*



Imagen 1. Cerámica griega con representación de la recolección de la aceituna

El olivo es uno de los cultivos más antiguos conocidos. Endémico de Oriente Medio, se evidencia que su domesticación surgió aproximadamente hace más de 5.000 años. La aceituna ha tenido un sinnúmero de usos: alimento, cosmética, medicina, perfumes, iluminación, etc. (Imagen 1). Existen documentos del antiguo Egipto que relatan sobre el olivo, un árbol símbolo

importante para los faraones y sus deidades. Posteriormente los Fenicios introdujeron el cultivo en España hacia el año 1100 a. C., también durante la

conquista romana, siendo desarrollado por los musulmanes en tiempos del *Al andalus* siglos después. (De Candolle 2006), por lo que el cultivo de esta especie vegetal en España remonta a tiempos inmemorables.

### 1.3 Importancia del cultivo del olivo



El olivo (*Olea europea L.*) es un árbol perteneciente a la familia *Oleaceae*, actualmente reconocido a nivel mundial por su fruto, la aceituna, y de elevada importancia comercial cuyo principal producto es el aceite de oliva. Por otra parte, el olivo cuenta con una amplia historia de utilidad que ha sido desarrollada a través de los siglos (Torres Ruiz, 2013). Inicialmente se utilizaba para fabricar ungüentos corporales (Imagen 2), conserva de aceituna en salmuera, forraje, madera para construir y

como combustible (Pastor y Castro, 2001). Luego tomó importancia como grasa alimentaria en exclusivo. De la misma manera se ha valorado por sus propiedades nutricionales bioactivas de interés medicinal y terapéutico, puesto que se ha determinado que los compuestos fenólicos tanto en la aceituna, el aceite y la hoja poseen actividades antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias y antihipertensivas (Maestro-Duran, *et.al.* 1994)



**Imagen 2. El oliva tiene multiplicidad Desde la natural hasta alimentación.**



**aceite de de usos. cosmética la**

<https://mejorconsalud.com/wp-content/uploads/2013/10/Delicioso-aceite-de-oliva.jpg>

**Imagen 3. Mapa de las zonas de cultivo del olivar en Andalucía:**

Tomado de: [http://blogs.periodistadigital.com/imgs/20071212/olivar\\_andalucia.jpg](http://blogs.periodistadigital.com/imgs/20071212/olivar_andalucia.jpg)

Desde la perspectiva económica y agronómica, la importancia del olivar en Andalucía es indiscutible. La superficie ocupada por el olivar es de aproximadamente un 60% del total de hectáreas a nivel nacional (COI, Observatorio Precios y Mercados) (Imagen 3). En Jaén alcanza aproximadamente un 43% de la superficie total cultivable (Gómez-Calero, 2009). A nivel internacional España es el principal productor y exportador de aceite de oliva.



El olivar andaluz caracteriza el paisaje al ser un monocultivo de tipo arbóreo en un área extensiva (Imagen 4). Sin embargo, a pesar de esta aparente homogeneidad y desde un punto de vista agronómico no es posible defender un único acercamiento al manejo del cultivo del olivo, entendiéndose un único código de buenas prácticas que satisfaga las necesidades de cualquier explotación. Es más propio, en este sentido, hablar del conjunto de *olivares andaluces*, ya que existe gran variabilidad entre las distintas explotaciones (Manual de olivicultura ecológica, 2004).

**Imagen 4.** Monocultivo olivo

## **2. SISTEMAS DE CULTIVO DEL OLIVO**

Durante siglos y hasta los años 60 se puede alegar que en España la agricultura respondía a las prácticas y técnicas denominadas como tradicionales. A partir de entonces la modalidad de producción industrial se fue implantando como el modelo de producción agraria casi exclusivo, situación que se mantiene hasta la actualidad.

A partir del 1986, con la anexión de España en la Unión Europea se impulsó la producción olivarera como consecuencia de la política de subvenciones de la PAC, y se convirtió en el impulso de un apreciable proceso de intensificación del cultivo del olivo.

De esta forma muy resumida, se puede sostener que gran parte del olivar en España se cultiva hoy en día de una forma convencional y que puede ser considerada una agricultura extensiva, que no renuncia a la aplicación de sustancias de síntesis. Por otra parte, existe un porcentaje cada vez más

importante que se cultiva de una forma intensiva o superintensiva con una gran utilización de *inputs* productivos externos, y que una fracción minoritaria se cultiva de forma alternativa como es el caso de las producciones ecológicas e integradas.

Actualmente los sistemas de cultivo o producción del olivo se pueden resumir en tres categorías coexistentes: convencional, ecológico y de producción integrada.

### **2.1. El sistema de cultivo convencional**

La producción convencional tiene como objetivo principal el rendimiento, dando prioridad a obtener cosechas abundantes e incremento en productividad aún a coste de aplicar técnicas que pueden ser agresivas y poco respetuosas con el medio ambiente. La mayor amenaza para este sistema de producción es el condicionamiento de las buenas prácticas agrícolas y otros requisitos de la normativa que hoy día son exigidos a las explotaciones por las directrices de la Política Agraria Europea para acceder a ayudas económicas junto con la obligación para obtener alimentos que sean seguros.

El cultivo convencional está caracterizado por el laboreo intenso, mantenimiento de una cobertura desnuda durante todo el año, recurriendo la mayor parte de las veces al empleo de herbicidas de preemergencia y postemergencia y el uso de fitosanitarios para el control de plagas. Para este sistema de cultivo existe una normativa de buenas prácticas pero no se certifica.



**Cultivo convencional con suelo desnudo. Existen varios sistemas de laboreo de suelos: laboreo convencional y mínimo.**

[http://www.agroinformacion.com/images/noticias/grandes/Agroinformacion.com17122012\\_140736.JPG](http://www.agroinformacion.com/images/noticias/grandes/Agroinformacion.com17122012_140736.JPG)

## 2.2 El sistema de producción integrada

El sistema de calidad propuesto por la Producción Integrada se basa en la certificación por entidades de los productos con normas y técnicas específicas que diferencian el producto obtenido y permite su trazabilidad (como se obtiene el producto y su origen). Además de facilitar el desarrollo de buenas prácticas de elaboración y transformación. Las transformaciones de un sistema de cultivo a otro pueden tomar años.

Los reglamentos específicos son elaborados a partir de técnicas agronómicas empleadas para la obtención del aceite de oliva en las explotaciones o en la manipulación y elaboración de este en las almazaras e industrias de transformación para garantizar su calidad y seguridad, teniendo en cuenta unos requisitos mínimos. Los reglamentos para producción integrada son: la *Normativa de Andalucía de Producción Integrada Decreto 245/2003* de 2 de septiembre (Boja Nº 179 de 10.09.03), *Reglamento específico de olivar*: Orden 15.04.08, Boja Nº 83 de 25 de abril de 2008 y el *Reglamento específico para industrias* (Aceite de oliva: Boja Nº 117 de 18.06.13 y Aceituna de Mesa: Boja Nº 123 de 24.06.04).

El objetivo agronómico de la producción integrada es lograr un cultivo sostenible compatibilizando técnicas y medios para lograr una máxima rentabilidad a la vez que ocasionar el menor daño posible al ambiente y que garantice la seguridad alimentaria. Es el método más utilizado después del cultivo convencional.



**Logotipo de producción integrada de Andalucía. Olivar de producción integrada, en este caso particular se labran los pies de olivo y se deja una cama de cobertura vegetal en la entrecalle.**

Obtenido de la web de la Junta de Andalucía, Ministerio de Agricultura, Pesca y Deportes

### 2.3 El sistema de cultivo ecológico

Es el sistema de producción que utiliza al máximo los recursos y mecanismos de producción naturales, asegurando a largo plazo una agricultura sostenible. Está regida por la *Comisión Europea*, Reglamento CE 834/2007 del Consejo de 28 de junio de 2007 sobre producción y etiquetado de productos ecológicos y el *Reglamento CE 889/2008* de la Comisión del 5 de septiembre de 2008, que fija los objetivos y principios a aplicar en este tipo de producción, especifica las normas relativas a producción, almacenamiento, transformación, transporte, venta, etiquetado, control e intercambio comercial y suministro al consumidor de los productos derivados del olivo.

La producción ecológica debe cumplir ciertas normas sobre:

- Proceso de conversión de cultivo convencional o producción integrada a ecológica, el cual puede durar al menos 3 años.
- Tratamientos del suelo, que deben respetar la vida y su fertilidad natural.
- Prevención de daños basado en métodos naturales, pero para lo cual se permite utilizar un número limitado de productos fitosanitarios autorizados por la Comisión.
- Semillas y los materiales de reproducción vegetativa (deben ser producidos ecológicamente).

Es preciso señalar que los productos oleícolas ecológicos tienen un valor añadido que los diferencian de otros productos del mercado. A pesar de los reglamentos específicos y los controles, puedes existir fraude respecto a la garantía que las parcelas de procedencia del fruto sean realmente manejadas de forma ecológica. De ahí deriva la necesidad de identificar indicadores o marcadores en el olivo que indiquen la autenticidad de las prácticas de cultivo ecológico. Al tratarse de un árbol de hoja perenne, esta podría ser un órgano de interés sobre el cual estudiar la presencia de algún marcador específico.



**Olivar de producción ecológica, se observa la cobertura vegetal viva utilizada para el control de la erosión del suelo. Etiquetado de producción ecológica de la Unión Europea.**

En la siguiente tabla se resumen las principales diferencias entre los sistemas de cultivos existentes para el olivar:

**Tabla 1.** Diferencias entre la agricultura convencional, producción integrada y producción ecológica. Elaboración a partir de información del Comité Andaluz de Agricultura Ecológica (CAAE) Octubre 2008

| Variable           | P. Convencional                   | P. Integrada         | P. Ecológica                      |
|--------------------|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| <b>Normativa</b>   | Comunitaria, estatal y autonómica | Estatal y autonómica | Comunitaria, estatal y autonómica |
| <b>Certificado</b> | No emite                          | Emite                | Emite                             |

|                               |                                                                                                             |                                                           |                                                                    |
|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <b>Agroquímicos</b>           | No hay uso restringido                                                                                      | Uso restringido, solo materias activas autorizadas        | Productos naturales, no permite productos agroquímicos de síntesis |
| <b>Factores de producción</b> | No los integra todos                                                                                        | Los integra todos                                         | Los integra todos                                                  |
| <b>Medio ambiente</b>         | Existe una consciencia cada vez mayor, interesan las grandes producciones y el mayor beneficio al productor | Lo protege, también la salud del consumidor y su economía | Lo protege, también la salud del consumidor y su economía          |
| <b>Cantidad y calidad</b>     | Ofrece productos en cantidad                                                                                | Ofrece productos de calidad                               | Produce productos de alta calidad y seguridad alimentaria          |
| <b>Coste</b>                  | Moderado                                                                                                    | Moderado                                                  | Elevado                                                            |
| <b>Sostenibilidad</b>         | No                                                                                                          | Si                                                        | Si                                                                 |

### 2.3.1 Efecto del cultivo ecológico en las plantas.

En los últimos siglos, las nuevas tecnologías agrícolas y el uso excesivo de fertilizantes químicos, pesticidas y herbicidas ha facilitado el incremento en producción a precios más bajos. Está más que evidenciado que el abuso de estas sustancias resulta en la contaminación y desequilibrio en los ecosistemas agrarios (Vinha et.al. 2014). Por otro lado, cada vez más gente está dispuesta a pagar un poco más por alimentos producidos a través de prácticas amigables con el medio ambiente, no solo por que se evita la exposición a residuos de fitosanitarios que son perjudiciales para la salud, sino porque poco a poco se va creando una mayor consciencia sobre cómo la agricultura afecta nuestro entorno. El aumento en la demanda de productos certificados como ecológicos ha creado la necesidad de diferenciar ambos sistemas de cultivo ya sea cuantificando la presencia de residuos químicos aplicados, las cantidades de nutrientes y los metabolitos secundarios como los polifenoles. (Devanand L. et.al. 2010). Sin embargo, debido al gran número de resultados contradictorios sobre los posibles beneficios nutricionales que aporta el sistema de cultivo ecológico es preciso investigar más (Smith-Spangler et.al. 2012). Algunos

estudios no encuentran diferencias en la calidad nutricional entre alimentos producidos de manera convencional y ecológica (Vinha *et.al.* 2014). Se ha descrito que para cultivos como la naranja, se ha cuantificado mayor actividad antioxidante e incrementos en la síntesis de compuestos polifenólicos en manzanas procedentes de cultivos ecológicos (Tarozzi *et.al.* 2006; Petkovzek *et.al.* 2010). Otros afirman que el uso de agentes de control biológico se correlacionan negativamente con los niveles de carotenoides y compuestos fenólicos en tomates (Cwalina-Ambroziak & Amarowicz 2012). En realidad existe poca información relacionada con la influencia del sistema de cultivo empleado en las concentraciones de metabolitos secundarios en plantas de interés agronómico, porque son compuestos que recientemente son de interés para la ciencia, por los beneficios que aportan a la salud humana (Gieb *et.al.* 2009; Zhang *et.al.* 2009). Sin embargo pocos estudios han enfocado la investigación a las condiciones agronómicas de la planta de interés en sí. Sin embargo, está bastante documentado que la cantidad y calidad de los polifenoles presentes en frutas y vegetales están significativamente influenciados por la variedad, el medio ambiente, tipo de suelo y el sistema de cultivo (convencional/ecológico) (Achouri, Boye & Belanger 2005; Autolovich, Prenzler *et.al.* 2000 ; Luthria 2006). Los sistemas de cultivo convencional y ecológico se diferencian en la cantidad de nutrientes aplicados como fertilizantes, materia orgánica añadida al suelo como los residuos de cosecha, presencia de cobertura vegetal de leguminosas de invierno, compost, etc. Se ha visto que la disponibilidad del nitrógeno orgánico tiene el potencial para influenciar la síntesis de metabolitos secundarios, proteínas y sólidos solubles (Vallverdú-Queralt *et.al.* 2012). Algunos artículos afirman que las frutas y vegetales que provienen de la agricultura ecológica tienen una mayor cantidad de metabolitos secundarios como los compuestos fenólicos, carotenoides, vitaminas y glucosinolatos (Tarozzi *et.al.* 2006). Por otra parte, algunos estudios muestran resultados contradictorios, esto enfatiza la importancia que tienen los parámetros ambientales y agronómicos (temperatura,

incidencia de radiación, irrigación, etc.) así como la importancia del estudio de su efecto en la producción de los mismos.

Ha sido demostrado que el uso de fitosanitarios afecta los metabolitos secundarios de las plantas, aumentando o disminuyendo la concentración de compuestos fenólicos dependiendo del mecanismo de acción del fitosanitario. Algunos herbicidas reducen la fijación de carbono de las plantas, disminuyendo la proporción de carbono disponible para la síntesis de metabolitos primarios y secundarios. Otros herbicidas bloquean la ruta del ácido shikimico, reduciendo la síntesis de aminoácidos aromáticos en el inicio de la síntesis de compuestos fenólicos (Luthria 2006).

Los fenoles presentes en las hojas de olivo son de gran interés para la comunidad de investigadores por diversas razones. Algunos compuestos fenólicos parecen atraer la mosca del olivo (*Dacus oleae*) (Foto pág. 12) a ovopositar, mientras que otros inhiben la ovoposición (Maestro-Durán *et.al.* 1994). Estos compuestos también han sido implicados en la defensa de las plantas frente a estrés ambiental y estrés biótico, otros funcionan como antioxidantes. La biosíntesis de estos compuestos se ha estudiado para entender su rol en las plantas como defensa contra herbívoros (Lattanzio L. *et. al.* 2006). La hoja de olivo tiene una variedad de compuestos fenólicos que forman parte de cuatro familias principales.



### 3. LA HOJA DEL OLIVO

Las hojas son los órganos esenciales para la síntesis de alimento utilizable por la planta y donde las siguientes actividades adquieren mayor relevancia:

**1. Función clorofílica o fotosintética:** ocurre la transformación de sustancias inorgánicas tomadas del suelo y la atmósfera en compuestos utilizables por la planta, es

decir, la conversión de savia bruta a savia elaborada. La transformación de energía lumínica en energía química:



Los requisitos de las hojas para realizar su función clorofílica son: una buena temperatura (ni mucho calor, ni mucho frío), aireación y luz.

**2. Transpiración y respiración:** las hojas de los olivos tienen ciertas características que le permiten la adaptación a las distintas condiciones climáticas anuales. En verano la falta de agua junto con las altas temperaturas son los factores limitantes para el desarrollo de las plantas. Las hojas del olivo poseen las siguientes características como adaptación frente a la desecación y controlar la evapotranspiración.

| Tabla 2. | Adaptación                                      | Ventaja                                                                                                                                                                                           |
|----------|-------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|          | Tamaño pequeño                                  | Poca superficie de contacto con el aire. Para evitar desecación y evapotranspiración excesiva.                                                                                                    |
|          | Cutícula gruesa y pelos blanquecinos (tricomas) | En el envés de la hoja sobresalen los tricomas. Las plantas los utilizan para protegerse de la radiación e impedir calentamiento excesivo, conservación de la humedad en la superficie epidermal. |
|          | Estomas                                         | Poros por donde ocurre el intercambio gaseoso y la pérdida de agua con posibilidad de apertura y cierre controlados.                                                                              |
|          | Curvatura en los bordes de la hoja              | Consigue crear una cámara de aire húmedo controlando así la pérdida de agua.                                                                                                                      |



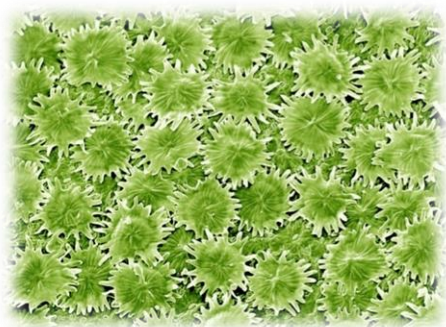
a. b.



**a. Estoma (células guarda). Aspecto blanquecino del envés de la hoja de olivo.**

Obtenido de: <http://fresno.pntic.mec.es/msap0005/1eso/T10-plantas/images/tema-11/Estomas.jpg>

**b. Tricomas con forma de pelo escamoso de la hoja del olivo. *O. europea*** Los tricomas son modificaciones epidérmicas que crecen de la epidermis hacia fuera. Dos tipos: glandulares (los que elaboran sustancias) y los no glandulares, que sólo secretan su propia pared. Obtenido de: <http://fresno.pntic.mec.es/msap0005/1eso/T10-plantas/images/tema-11/Estomas.jpg>



- La principal función es la de protección, defensa contra el ataque de insectos.
- Mantenimiento de un microclima adecuado ya que conservan la humedad en la superficie de la epidermis
- Protección contra agresiones mecánicas
- Protección contra la luz. Los tricomas producen sombra olivo.
- Absorben el agua y nutren minerales.

#### 4. COPOSICIÓN DE LA HOJA

Los fenoles son compuestos sintetizados en el metabolismo secundario de las plantas en frutos, hojas, tallos, raíces u otras partes. Se caracterizan por poseer uno o más grupos hidroxilo unidos a uno o más anillos bencénicos. Algunos metabolitos secundarios sintetizados por las plantas tienen un rol significativo en la defensa contra herbívoros, plagas y patógenos. El papel de estos compuestos incluyen la disuasión y/o actividad repelente, toxicidad, o el papel de precursores de sistemas de defensa física (Maiani *et.al* 2010). Sin embargo, muchos herbívoros y patógenos especialistas eluden los efectos de los metabolitos secundarios y algunos los utilizan como compuestos para reconocer al hospedador. Es importante comprender que las relaciones entre patógenos/plagas y las plantas son realmente complejas.

Los fenilpropanoides son un grupo de compuestos fenólicos, una familia muy diversa que abarca desde ácidos fenólicos simples hasta polímeros grandes y complejos como los taninos, ligninas y flavonoides. Como bien se mencionó anteriormente estos compuestos son metabolitos secundarios, muchos toman como material de partida los productos de la fotosíntesis (Figura 1). Estos productos pueden entrar en varias rutas metabólicas. La mayoría de los fenoles son sintetizados en la ruta del ácido shikímico, utilizando aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptófano) y dan origen a los taninos. Por otra parte los tocoferoles, terpenos y



secoiridoides se sintetizan via las rutas MEP y MVA (Figura 1). La biosíntesis de estos compuestos se ha estudiado para entender su rol en las plantas como defensa contra herbívoros. (Lattanzio *et. al.* 2006). La Tabla 3 muestra un resumen de algunas de las funciones de compuestos fenólicos en plantas.

Foto: mosca del olivo, una de las plagas más importante que afecta el fruto.  
<http://www.casil.es/webcasil/wd->

#### 4.1 Importancia del estudio de los compuestos fenólicos de la hoja de olivo

Los compuestos fenólicos:

Características generales de los compuestos fenólicos:

- Estructura con anillo aromático con un grupo fenol (-OH).
- Familia de compuestos heterogénea.
- Suelen ser ácidos, solubles en agua y pueden formar puentes de hidrógeno.
- Pueden interactuar con grupos peptídicos (taninos).
- Los fenoles con grupo catecol (*o*-dihidroxibenceno) pueden quelar metales.
- Son susceptibles a la oxidación (antioxidantes).
- La mayoría se derivan de fenilpropanoides.
- Otro grupo numeroso e importante es el de los flavonoides.
- Diversas estructuras: monoméricas, diméricas (ligninas) y poliméricas (ligninas y taninos).

**Tabla 3.** Funciones de los compuestos fenólicos en plantas:

| Función                                                 | Ejemplo                                                                                                                                                                     |
|---------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Pigmentos</b>                                        | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Antocianinas</li> <li>• Flavonas</li> <li>• Flavonoles</li> </ul>                                                                  |
| <b>Sustancias defensivas</b>                            | <ul style="list-style-type: none"> <li>• Tóxicas: taninos</li> <li>• Fitoalexinas (furanocumarinas, isoflavonoides)</li> <li>• Disuasores alimentarios (taninos)</li> </ul> |
| <b>Reguladores: interacciones planta-microorganismo</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Rizobium</i></li> <li>• <i>Agrobacterium</i></li> </ul>                                                                         |

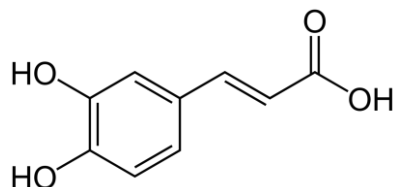
### Protectores frente a UV

#### Sustancias alelopáticas

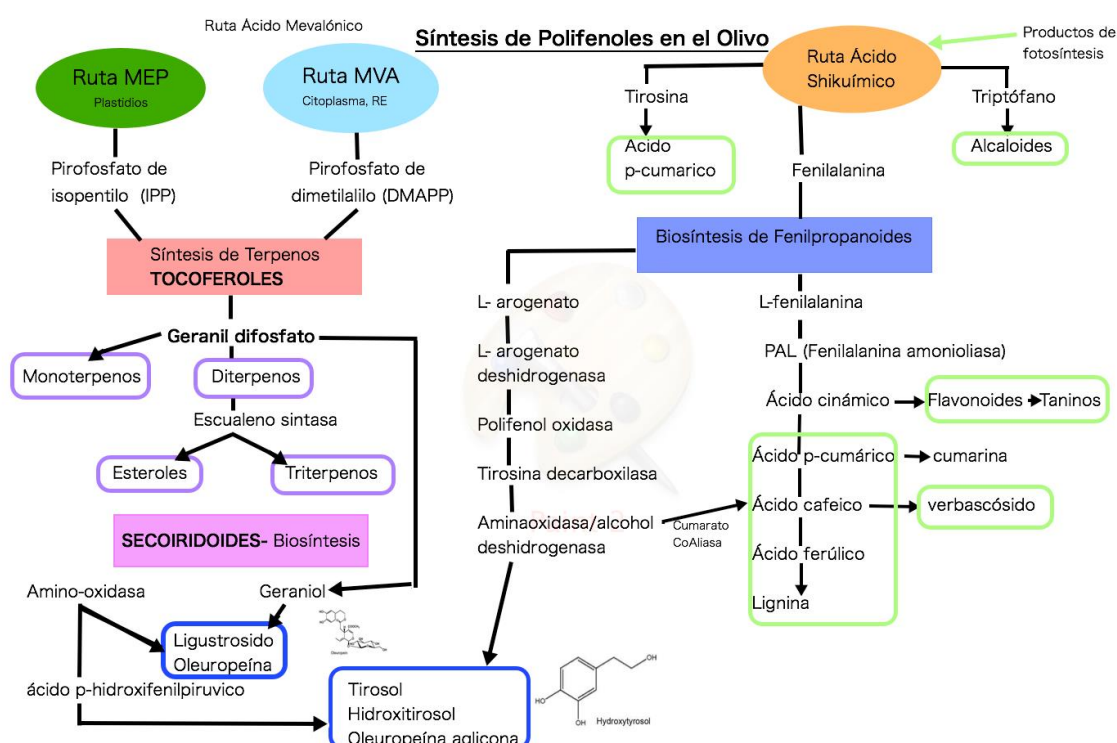
- Ácido cafeico
- Ácido ferúlico

#### Función estructural

- Lignina
- suberina



Ejemplo de la estructura de un fenol: Ácido cafeico



**Figura 1.** Rutas metabólicas implicadas en la síntesis de polifenoles

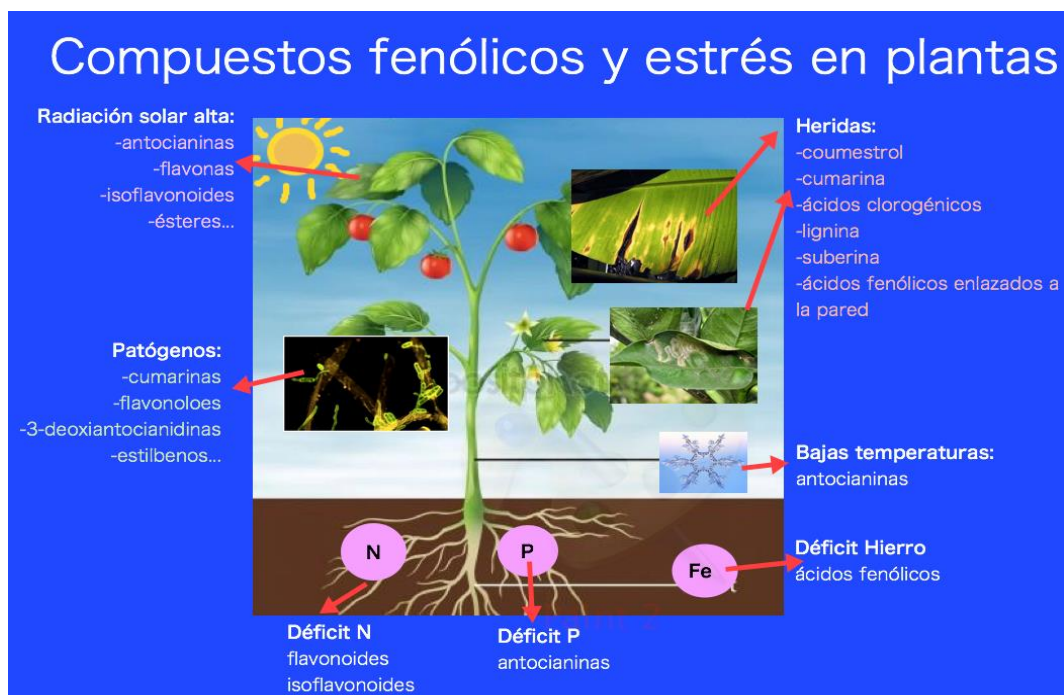
Los compuestos fenólicos en general son sintetizados por una de dos vías biosintéticas principales: la ruta del ácido shikímico o la vía del ácido malónico (Lincoln y Zeiger 2006)

Diagrama propio adaptado de: Buchanan *et.al.* 2000

Algunos estudios han encontrado que los metabolitos secundarios pueden actuar como defensa contra herbívoros, microbios, virus y la competición entre plantas, además de funcionar como señales químicas para atraer polinizadores o a modo de repelente, también protegen la planta de la radiación ultravioleta y

agentes oxidativos. Por lo tanto, representan una característica adaptativa que ha sido sujeta a selección natural durante la evolución. Los metabolitos secundarios son caracterizados por tener una amplia gama de actividades biológicas y esto ha llevado al reino de las plantas a acumular un catálogo extenso de compuestos.

El rol de los compuestos fenólicos en la defensa de la planta está relacionada con sus propiedades antibióticas, disuasorio alimentario y de sabor desagradable para ciertos organismos. Además tienen su implicación en las relaciones planta-animal y/o planta-microorganismo, los fenoles de las plantas también están relacionados con la mayoría de pigmentos rojos, azules y morados, como antioxidantes y como agentes quelantes (Tabla 3) (Maestro-Durán *et.al* 1993).



**Figura 2.** Los compuestos fenólicos están implicados en la respuesta de las plantas frente a agentes causantes de estrés (exceso de radiación, heridas, patógenos, etc.) y abarcan una amplia variedad de funciones en distintas partes de la planta. Adaptado de Ávalos *et.al.* 2009.

Los fenoles se almacenan en vacuolas centrales de las células guarda en los estomas y en células epidérmicas y subepidérmicas de las hojas y brotes.

Además, algunos compuestos fenólicos se han hallado covalentemente enlazados a la pared celular, otros se encuentran en las ceras o en las partes externas de la superficie de los órganos vegetales. Algunos estudios sugieren que incluso tienen un rol en el núcleo celular, formando complejos flavonoide-ADN que protege contra el daño oxidativo (Beart, J. *et.al.* 2000).

Los factores principales que contribuyen a la distribución cuantitativa y cualitativa de los compuestos fenólicos en *O. europea* son de carácter agronómico. Los principales factores son la climatología, el tipo de suelo, las practicas culturales; riego, sistema de cultivo, aplicación de fitosanitarios, manejo del suelo, etc. (Casado Motilva *et.al.* 2009). Se ha demostrado que distintos tipos de fenoles solubles en agua, como el ácido ferúlico, gallico o los flavonoides, estimulan o inhiben la germinación de esporas y que afectan el desarrollo de hifas de hongos saprofitos. Por otra parte, se cree que la liberación de aleloquímicos a la rizosfera ocurre a través de la lixiviación desde las hojas y otras partes aéreas, a través de emisión de volátiles y exudados radiculares, así como de la descomposición de la corteza de los troncos. Algunos aleloquímicos fenólicos identificados son: ácido p-hidroxibenzoico y ácido p-cumárico presente en las hojas. (Lattanzio L. *et. al.* 2006) La Figura 2 muestra distintos agentes causantes de estrés en plantas y la relación con los polifenoles. Las antocianinas e isoflavonoides, ayudan a la planta a combatir los efectos por el exceso de luz ultravioleta, las cumarinas y estilbenos están relacionados con la respuesta defensiva frente a patógenos. Por otro lado los ácidos fenólicos, la lignina y la suberina están implicados en la respuesta frente a plagas y heridas. Muchos de estos compuestos cumplen un rol defensivo en respuesta a varios agentes estresantes.

Los polifenoles se pueden agrupar en cuatro clases dependiendo de su estructura química:

**Tabla 4.** Clasificación de los compuestos fenólicos las hojas de olivo (modificado de Harborne *et.al.* 1989)**Los principales fenoles del olivo forman parte de las familias:**

| FAMILIA                                          | EJEMPLO                                                                                                        |
|--------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Ácidos<br/>fenólicos y<br/>derivados</b>      | Ácido caféico                                                                                                  |
|                                                  | Ácido vainillínico                                                                                             |
|                                                  | Ácido ferúlico                                                                                                 |
|                                                  | Ácido siríngico                                                                                                |
|                                                  | Ácido p-cumárico                                                                                               |
|                                                  | Ácido o-cumárico                                                                                               |
|                                                  | Ácido protocatequico                                                                                           |
|                                                  | Ácido sinápico                                                                                                 |
|                                                  | Ácido gálico                                                                                                   |
|                                                  | Ácido benzoico                                                                                                 |
|                                                  | Ácido p-hidrobenzoico                                                                                          |
| <b>Alcoholes<br/>fenólicos</b>                   | Tirosol                                                                                                        |
|                                                  | Hidroxitirosol                                                                                                 |
| <b>Flavonoides<br/>libres y<br/>glucosilados</b> | Flavonas                                                                                                       |
|                                                  | Luteolina                                                                                                      |
|                                                  | Apigenina                                                                                                      |
|                                                  | Apigenina-7-glucósido                                                                                          |
|                                                  | Luteolina-7-glucósido                                                                                          |
|                                                  | Oleuropeína (mayoritario)                                                                                      |
| <b>Secoiridoides</b>                             | Ligustrosido                                                                                                   |
|                                                  | Dimetiloleuropeína                                                                                             |
|                                                  | Oleocantal: dialdehído derivado de ligustrosido                                                                |
|                                                  | Otros derivados: (forma aldehídica del ácido elenócio, hidroxitirosol, isómeros de oleuropeína algicona, etc.) |
| <b>Lignina</b>                                   |                                                                                                                |

**4.2 Compuestos fenólico en la hoja de *Olea europea*:**

Los compuestos fenólicos del olivo se encuentran principalmente en las hojas, algunos de estos compuestos son: oleuropeína, hidroxitirosol, tirosol, luteolina, rutina, ácido caféico, catequina y apigenina. Las plantas del Mediterráneo han desarrollado mecanismos para producir altos niveles de antioxidantes como mecanismo de protección en contra de factores ambientales estresantes. El compuesto rutina puede combinarse con cationes, permitiendo así el suministro de nutrientes desde el suelo hasta las células en plantas. Por otra parte el ácido caféico se encuentra en todas las plantas, es un intermediario importante en la biosíntesis de lignina y uno de los principales componentes de la biomasa de las plantas y sus residuos (Dey *et.al.* 1989). El valor potencial en compuestos de alto valor añadido en la hoja de olivo es elevado, el estudio de su composición es de gran interés científico y práctico (Guinda *et.al.* 2002).

La composición de la hoja de olivo puede resumirse en las siguientes tablas:

La fracción más prominente de la hoja de olivo es la fibra neutro detergente (45%) aquí se encuentran los fenoles y sus derivados.

| Fracción                       | Porcentaje     | Descripción                                                                                                                                            |
|--------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Fibra neutro detergente</b> | 45%            | Altamente lignificada (18%), principalmente oleuropeína (5-8%), confiere carácter amargo y disminuye la digestibilidad de sus proteínas. Antioxidantes |
| <b>Hemicelulosa y celulosa</b> | Contenido bajo | -                                                                                                                                                      |
| <b>Proteínas</b>               | 7-11%          | Mayormente distribuidas en la pared celular                                                                                                            |
| <b>Cenizas</b>                 | 7%             | Contenido bajo                                                                                                                                         |
| <b>Fósforo y Sodio</b>         | -              | Contenido muy bajo                                                                                                                                     |

Tabla 1. Principales propiedades agroquímicas de la hoja de olivo (obtenido de Albuquerque *et.al.* 2006).

|                                       |              |
|---------------------------------------|--------------|
| <b>Humedad %</b>                      | <b>7,3</b>   |
| <b>pH</b>                             | <b>5,60</b>  |
| <b>Conductividad eléctrica (dS/m)</b> | <b>1,74</b>  |
| <b>Materia Orgánica %</b>             | <b>90,60</b> |
| <b>Lignina %</b>                      | <b>31,9</b>  |
| <b>Celulosa %</b>                     | <b>19,3</b>  |
| <b>Hemicelulosa %</b>                 | <b>21,7</b>  |
| <b>Contenido graso %</b>              | <b>8,3</b>   |
| <b>Carbono orgánico total %</b>       | <b>52,40</b> |
| <b>Nitrógeno total %</b>              | <b>1,33</b>  |
| <b>Fósforo %</b>                      | <b>0,08</b>  |
| <b>Potasio %</b>                      | <b>0,57</b>  |
| <b>Calcio %</b>                       | <b>2,60</b>  |
| <b>Magnesio %</b>                     | <b>0,24</b>  |

|                        |      |
|------------------------|------|
| <b>Sodio %</b>         | 0,03 |
| <b>Hierro mg/Kg</b>    | 337  |
| <b>Cobre mg/Kg</b>     | 77   |
| <b>Manganeso mg/Kg</b> | 52   |
| <b>Zinc mg/Kg</b>      | 13   |

Composición general de los principales componentes del extracto de hexano de hojas de olivo y sus principales ejemplos (Guinda *et.al.* 2002)

- **Ceras:** constituidas por ácidos grasos y alcoholes terpénicos: ej. ácido palmítico, oleico, linoleico,  $\alpha$  y  $\beta$ - amirina.
- **Triglicéridos:** trioleína, palmitodioleína, de los cuales el segundo es el compuesto mayoritario.
- **Tocoferoles y carotenos:**  $\alpha$ -tocoferol y  $\beta$ -caroteno
- **Esterol más abundante:**  $\beta$ -sitosterol
- **Alcoholes lineales y terpénicos:** heneicosanol, docosanol, germanicol,  $\alpha$  y  $\beta$ - amirina y sus isómeros.
- **Dialcoholes terpénicos:** uvaol (mayoritario en hoja) y eritrodíol (mayoritario en aceite).

A pesar de llamarse metabolitos secundarios, esto no significa que tengan una menor implicación en procesos importantes para las plantas. Las especies vegetales necesitan de ellos para adaptarse al medio en el que se desarrollan. Las funciones de los fenoles son muy diversas y es por esto que habría que profundizar en su estudio para ver de qué manera afectan la producción de los cultivos que nos interesan y cómo las prácticas y los sistemas de cultivo que

empleamos inciden sobre el incremento o disminución de estos compuestos bioquímicos a lo largo del tiempo.

## 5. TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

**Título:** *DIFERENCIACIÓN DEL OLIVAR ECOLÓGICO  
MEDIANTE METABOLÓMICA APLICADA A LA HOJA*

## 5.1

**OBJETIVO:** Determinar el efecto del cultivo ecológico en la composición de la fracción fenólica de la hoja de olivo para establecer marcadores moleculares que pudieran diferenciar los olivos cultivados bajo condiciones ecológicas.

**HIPÓTESIS:** La síntesis de compuestos fenólicos de la hoja de olivo puede ser modulada o modificada según el tratamiento nutricional y el uso de fitosanitarios de síntesis utilizados en el manejo del cultivo. Esto puede dar lugar a diferencias en los perfiles fenólicos entre el tratamiento convencional y ecológico que pueden ser útiles como herramienta de control para verificar el correcto manejo del olivar ecológico o detectar posibles contaminaciones o malas prácticas.

## 5.2 Materiales y Métodos

### 5.2.1 Material Vegetal:

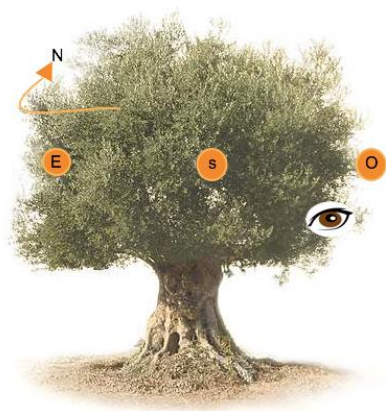
El estudio se realizó en la finca experimental del Instituto de Investigación y Formación Pesquera y Agraria (IFAPA) de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía en el Centro Venta del Llano del municipio de Mengíbar, Jaén. Los olivos en cultivo ecológico forman parte de una parcela certificada. Todos los tratamientos aplicados cumplen con las especificaciones del Reglamento Específico de la Normativa Europea nº 834/2007 del Consejo de 5 de septiembre de 2008, que rige la producción ecológica. A las parcelas tanto de cultivo ecológico como convencional se le aplicó el mismo riego. Se seleccionaron y marcaron tres parcelas de olivos para el tratamiento *convencional* y otras tres para el tratamiento *ecológico* (Figura 3). Cada parcela estaba formada por tres olivos de aproximadamente 30 años de edad similares entre sí en volumen de copa, poda, vigorosidad y orientación.



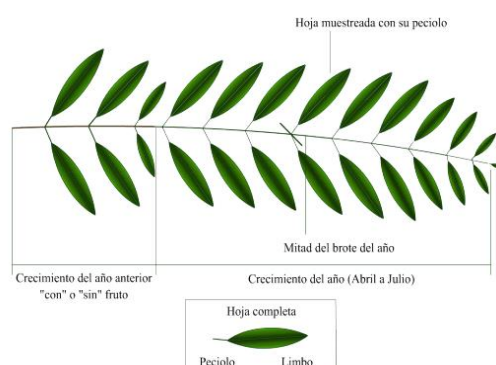
**Figura 3.** Mapa aéreo de los olivos muestreados en el IFAPA Centro Venta del Llano, Mengíbar, Jaén.

### 5.2.2 Toma de muestras

Se recolectaron aproximadamente 150 hojas maduras alrededor del olivo y en las cuatro orientaciones (N – S – E – O), a la altura de la cara de la persona que tomó la muestra, en tallos tomados al azar. (Figura 4). Dentro de un tallo se consideró el tramo correspondiente al crecimiento del año (Figura 5), tomando solo las hojas de la parte central de este tramo (tercer y/o cuarto par de hojas), y solo aquellas hojas desarrolladas y expandidas, que no presentaban ninguna anomalía (ataque de plagas o enfermedades, necrosis, etc.). Se tomaron dos hojas completas, incluyendo el pecíolo y sin la yema axilar. El número aproximado de hojas por parcela fue de 450. Se realizaron muestreos durante los meses de marzo, abril y mayo de 2017.



**Figura 4.** Representación del muestreo realizado en cada una de las orientaciones N,S,E,O) a la altura del operador.



**Figura 5.** Esquema de un brote de olivo en el que se muestra el crecimiento del año y el punto de este en que se realizó la toma de muestra de hojas. Tomado de Olivarum, Laboratorios especializados en muestras de olivo.

Una vez recolectadas las hojas en el campo se introdujeron en un sobre de papel y se almacenaron inmediatamente en una caja y fueron llevadas al laboratorio para procesado y análisis.

### 5.2.3 Determinación de compuestos fenólicos

#### 1. Preparación de la muestra:

Se lavaron las hojas con agua destilada, se retiró el exceso de agua y se pesaron aproximadamente 10 g de hoja por tratamiento y parcela, luego se desecaron en la estufa a 120°C durante dos tiempos, 15 y 30 minutos. Se dejaron enfriar en desecador y se volvió a tomar el peso para calcular la humedad (Ecuación 1). Una vez desecada la muestra se troceó con unas tijeras y se pesó 1g de muestra.

$$\text{[Ecuación 1]} \quad \% \text{ Humedad} = \frac{\text{peso hoja húmeda g} - \text{peso hoja desecada g}}{\text{peso hoja húmeda g}} \times 100$$



#### 2. Extracción de compuestos fenólicos:

1. Se añadieron 40 mL de disolución metanol/agua (80:20 v-v) previamente enfriada entre 0-4°C. Se trituró en un homogeneizador IKA T25 digital ULTRA TURRAX a máxima velocidad, seguido de una agitación en orbital durante 1 hora manteniendo la cadena de frío al abrigo de la luz. Se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C durante 10 minutos. (ANEXO VI)
2. Para recuperar la fase hidrometanólica se filtró en doble capa de gasa y se dejó reposar durante 1 hora, luego se realizó un segundo filtrado utilizando filtro de

jeringa de 0,22 µm. El extracto se colocó en viales ámbar de 1,5 mL que se almacenaron a -18°C hasta su análisis.

\*Se llevaron a cabo tres extracciones por parcela y sistema de cultivo.

### 3. Análisis de compuestos fenólicos mediante HPLC-DAD

La fracción fenólica de las hojas se analizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) según el método descrito por Beltrán et al. (2000) con ligeras modificaciones. El equipo empleado fue un cromatógrafo líquido Agilent 1100 (Hewlett Packard) equipado con una bomba cuaternaria, sistema de termostatación de columnas, muestreador automático con sistema de termostatación y un detector UV-VIS Diodo Array. La separación cromatográfica se desarrolló con una columna de fase inversa RP 18 Pecosphere (Perkin Elmer-BronwLee Columns) (4,6 mm d.i. x 83 mm, diámetro de partícula 3 µm). El análisis se llevó a cabo a una temperatura de 25° C tanto para la columna como para el muestreador automático. La fase móvil utilizada fue una mezcla de ácido acético en agua (2 % v/v) (disolvente A) y de acético en metanol (2% v/v) (disolvente B) y un flujo de 0.45 mL/min. El gradiente utilizado fue: 90% A/10%B durante 10 min, 80%A/20%B en 8 min, 80%A/20%B durante 2 min, 60%A/40%B en 10 min, 50%A/50%B en 10 min y 0%A/100%B en 10 min hasta el final del análisis.

El análisis de los compuestos se realizó bajo control de temperatura a 25°C. La detección se llevó a cabo a 280 y 340 nm y el volumen de inyección de muestra fue de 20 µL. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por comparación de los tiempos de retención y las características al UV-Visible con las sustancias estándar. Los resultados se expresaron como µg por g de tejido seco. La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó a partir de rectas de

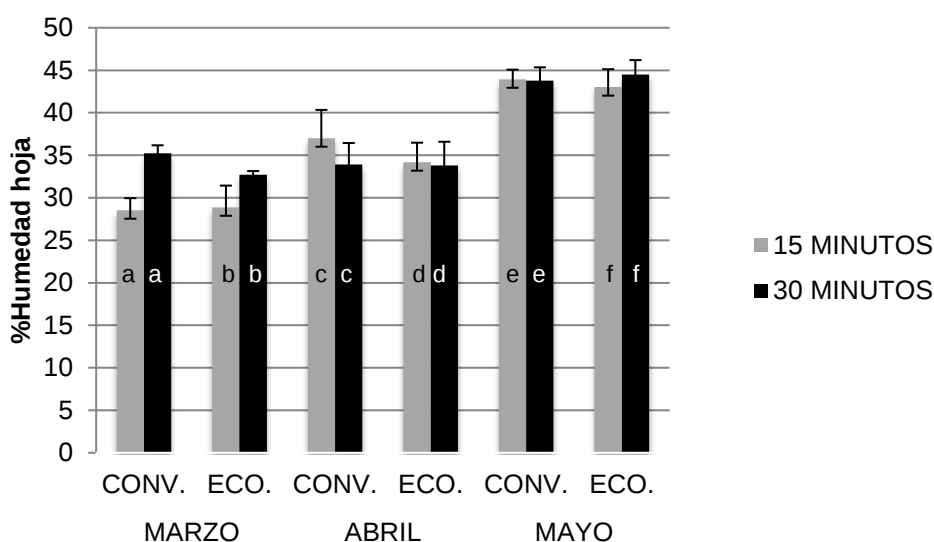
calibrado obtenidas con sustancias patrón hidroxitirosol, tirosol, verbascósido, lutein-7- glucósido, oleuropeína, apigenin-7-glucósido, luteína)

**4. Análisis estadístico:** Los resultados se han expresado como valores medios y la desviación estándar. Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) aplicando el test de Tukey para un nivel de significación de  $P=0,05$  utilizando el programa Statistix (SX) (Completely Randomized Analysis of Variance).

### 5.3 Resultados y discusión

#### 5.3.1 Optimización de la preparación de la muestra

Se compararon dos tiempos de desecación de las hojas y su efecto sobre la extracción de compuestos fenólicos. Se desecaron las hojas procedentes de cultivo ecológico y cultivo convencional durante 15 minutos y 30 minutos. No se observaron diferencias significativas en la humedad de las hojas desecadas a distintos tiempos para las hojas muestreadas durante los meses de marzo a mayo (Valor  $P=0,829$ ) (Figura 6).



**Figura 6.** Comparación entre dos tiempos de desecación (15 y 30 minutos) en el porcentaje de humedad de hojas de olivo procedentes de cultivo ecológico y convencional durante los meses de marzo a mayo de 2017.

La concentración de total de fenoles y la composición de la fracción fenólica de las hojas desecada a diferentes tiempos se muestran en la Tabla 5. la concentración de los compuestos fenólicos totales extraídos no se vio afectada por los tiempos de desecación de hojas seleccionados para optimizar la extracción durante el periodo muestreado (Figura 8). Para los compuestos fenólicos individuales no se encontraron diferencias significativas entre tipo de cultivos con excepción del compuesto secoiridoide ligustrósido, cuya concentración aumentó de (4468 a 6112)  $\mu\text{g/g}$  PS (15 y 30 minutos respectivamente) para cultivo convencional y de (2776 a 4072)  $\mu\text{g/g}$  PS para los olivos en cultivo ecológico (Tabla 5). Por tanto, se seleccionaron los resultados de las hojas de olivo desecadas durante 30 minutos y se recomienda desecar durante este tiempo a 120°C para aumentar la extractabilidad de compuestos como ligustrósido

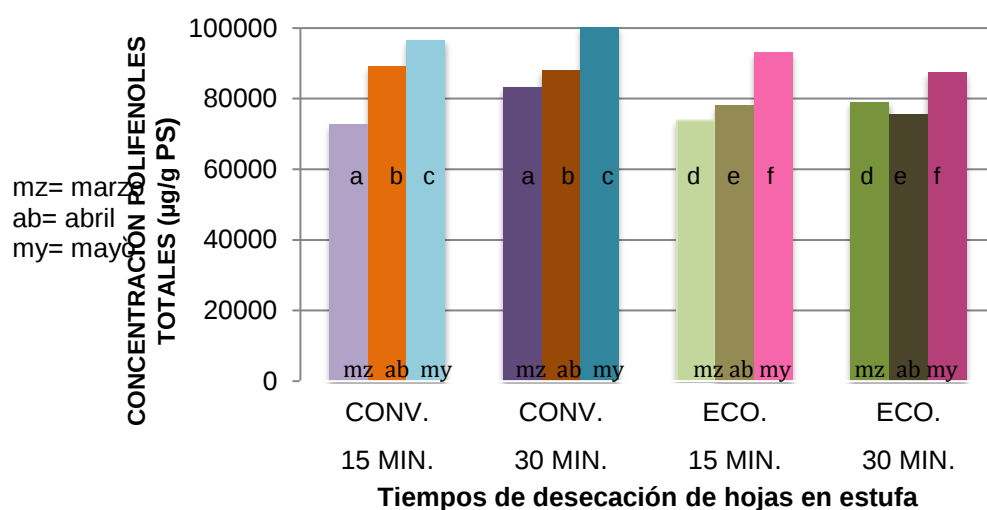
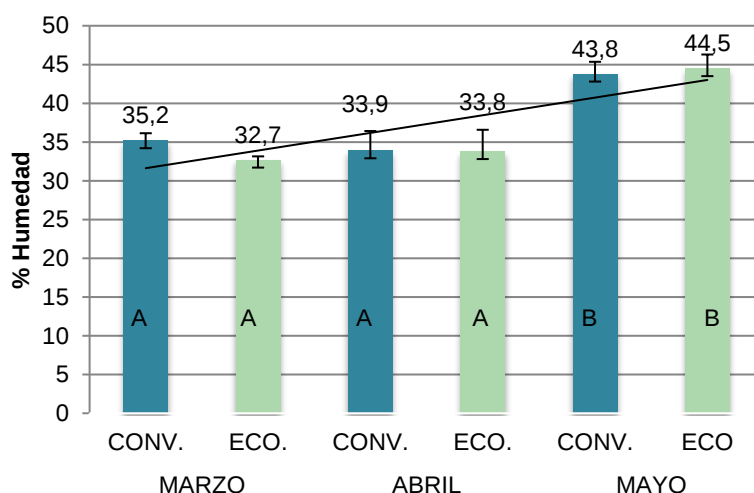


Figura 8.

Comparación de dos variables (tiempo de desecación y % humedad) dentro de un método de extracción de polifenoles. Tiempos de desecación: 15 y 30 minutos a 120°C. Se presentan los valores de concentración de polifenoles totales en  $\mu\text{g/g}$  PS.

### 5.3.2. Efecto del sistema de cultivo sobre la humedad de la hoja

El contenido de agua en las plantas es uno de los aspectos determinantes para su desarrollo fisiológico y es uno de los parámetros clave para determinar la presencia de estrés hídrico en cultivos de interés agronómico (Riaño *et.al.* 1999). La humedad disponible para la planta incide en el crecimiento de las células, la transpiración y la fotosíntesis. Procesos importantes de los cuales parten muchas rutas metabólicas para las plantas (Moran *et. al.*1994).



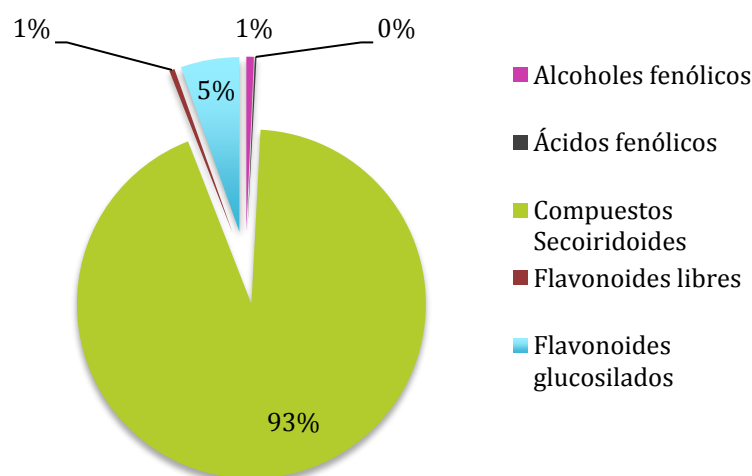
**Figura 7.** Porcentaje de humedad de hojas procedentes de cultivo convencional y ecológico

En general, los resultados del contenido en humedad de hojas de olivo procedentes de cultivo ecológico y convencional no mostraron diferencias significativas (valor  $P=0,8029$ ). Al tratarse del mismo cultivo y condiciones similares (orientación, suelo, régimen de riego), se puede inferir que ambos sistemas de cultivo responden de igual manera a las condiciones ambientales. Los resultados muestran valores entre 30% durante el mes de marzo, 35% en abril y entre 40-45% en mayo para ambos sistemas de cultivo. La humedad de la hoja no varió en los meses de marzo y abril, siendo significativamente mayor en el mes de mayo para ambos sistemas de cultivo (valor  $P=0,003$ ) (Ver Figura 7). Esto se pudo deber a las condiciones climáticas concurridas durante este periodo analizado (ANEXO II). El fin del invierno y el principio de la primavera. Momento clave en el cual comienzan a subir las temperaturas, a veces rápidamente en el caso de Andalucía. Estos factores afectan la

evapotranspiración y el contenido de humedad en las plantas, fundamentales para el desarrollo de los cultivos. (Gates 1980). A pesar de que numerosos estudios se han enfocado en resolver el debate de si la aplicación de fitosanitarios y fertilizantes o el sistema de producción ecológica afectan el contenido nutricional, la pregunta sigue sin respuesta definitiva.

### 5.3.3. Compuestos fenólicos:

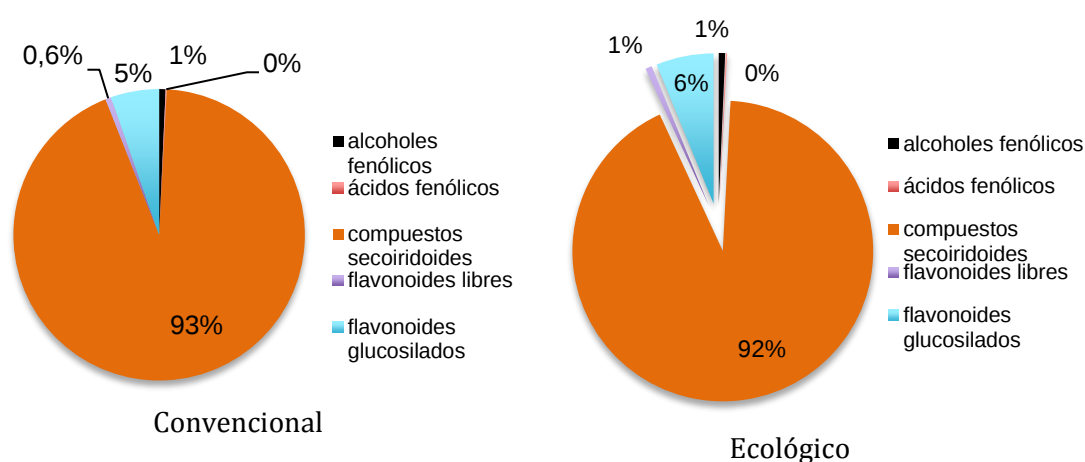
En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos para la concentración de compuestos fenólicos individuales y contenido total de las hojas procedentes de los olivos cultivados bajo sistema convencional y ecológico. La fracción fenólica de la hoja está formada por alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos, compuestos secoiridoides, flavonoides libres y flavonoides glucosilados. Los principales compuestos fenólicos de las hojas de olivo son los secoiridoides (93%) y los flavonoides glucosilados (5-6%), el resto de grupos se encuentra por debajo del 1% (Figura 10).



**Figura 10.** Fracción de las distintas familias de compuestos fenólicos del total de polifenoles en ambos sistemas de cultivo para el periodo de marzo 2017. Se escogió una figura porque no hubo diferencias significativas entre las fracciones de cada familia de compuestos fenólicos entre cultivos ni a lo largo del periodo analizado. Para ver las figuras correspondientes a cada sistema de cultivo y periodo de muestreo ir al ANEXO I.

**a. Alcoholes fenólicos:**

Los alcoholes fenólicos analizados en este trabajo fueron el hidroxitirosol y tirosol. En general, el hidroxitirosol se observó en una concentración más elevada. Los alcoholes fenólicos representan una fracción entre un 0,15% y 0,14% en hojas de cultivo convencional y ecológico respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre sistemas de cultivo a lo largo del periodo de muestreo (Figura 10). Las hojas de los árboles en cultivo ecológico mostraron una concentración mas baja de hidroxitirosol y tirosol para las tres épocas estudiadas (Tabla 6). A medida que pasaron los meses de marzo, abril y mayo, se observa una tendencia a aumentar la concentración de alcoholes fenólicos en hojas para cada sistema de cultivo (Tabla 6). Para la concentración específica de hidroxitirosol no se observaron diferencias significativas entre ambos sistemas de cultivo. Solo en el mes de marzo se observó un contenido significativamente más elevado de tirosol en el cultivo convencional (Valor  $P=0,0099$ , Convencional: 310  $\mu\text{g/g PS}$ , Ecológico: 187  $\mu\text{g/g PS}$ ).



**Figura 11.** Media de la fracción total de las distintas familias de fenoles extraídos de hojas de olivo en cultivo convencional y ecológico.

**Tabla 5.** Comparación de dos variables (tiempo y humedad) dentro de un método de extracción de polifenoles. Tiempos de desecación de 15 v 30 minutos a 120°C. Se presentan los valores de concentración de polifenoles cualitativos en µg/g PS.

| Polifenoles µg/g        | Valor P | 15 min. Conv ± SD | 30 min. Conv. ±SD | 15 min. Eco ± SD | 30 min. Eco ±SD |
|-------------------------|---------|-------------------|-------------------|------------------|-----------------|
| Hidroxitiroso           | 0,0917  | A 219 ± 62        | A 262 ± 68        | A 179 ± 54       | A 219 ± 22      |
| Tiroso                  | 0,3554  | A 272 ± 48        | A 310 ± 59        | A 200 ± 45       | A 187 ± 21      |
| Ácido cafeico           | 0,8054  | A 38 ± 12         | A 7 ± 10          | A 45 ± 6         | A 42 ± 12       |
| Ácido p-cumárico        | 0,5472  | A 78 ± 11         | A 86 ± 7          | A 75 ± 6         | A 67 ± 5        |
| Oleuropeína             | 0,5678  | A 59925 ± 7562    | A 68755 ± 11700   | A 62609 ± 3267   | A 66657 ± 6398  |
| Verbascosido            | 0,8062  | A 2063 ± 1144     | A 2455 ± 1106     | A 1749 ± 409     | A 1988 ± 700    |
| Ligustrosido            | 0,0200  | A 4469 ± 1021     | B 6112 ± 1429     | A 2776 ± 761     | B 4073 ± 619    |
| Apigenina               | 0,8213  | A 194 ± 27        | A 185 ± 32        | A 238 ± 45       | A 234 ± 44      |
| Luteolina               | 0,8639  | A 236 ± 25        | A 222 ± 35        | A 268 ± 33       | A 272 ± 47      |
| Luteolina 7-o-glucosido | 0,3068  | A 2784 ± 271      | A 2608 ± 249      | A 2998 ± 239     | A 2873 ± 337    |
| Apigenina 7-o-glucosido | 0,4236  | A 2097 ± 398      | A 1893 ± 240      | A 2466 ± 375     | A 2253 ± 215    |

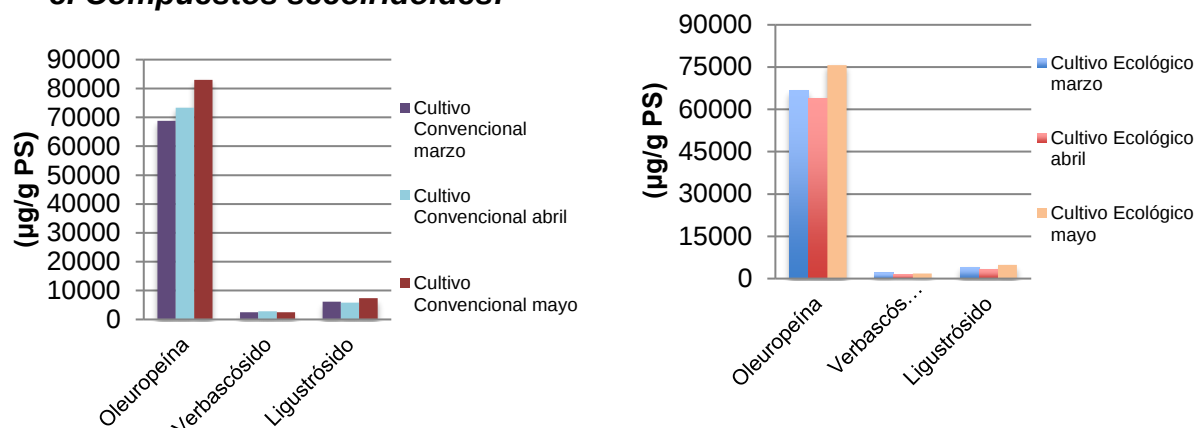
**Tabla 6.** Concentración de polifenoles cualitativos representados como µg/g PS de hojas de olivo procedentes de cultivo convencional y ecológico recogidas durante el periodo desde marzo hasta mayo de 2017. Las familias de fenoles identificados son: Alcoholes fenólicos: hidroxitiroso y tiroso; Ácidos fenólicos: ácido cafeico y ácido p-cumárico; Compuestos secoirídicos: oleuropeína, verbascosido y ligustrosido; Flavonoides libres y glucosilados: Apigenina, Luteolina, Apigenina-7-o-glucosido y Luteolina-7-o-glucosido.

| FENOLÉS µg/g            | Valor P | Conv ±SD      | Eco ±SD        | Valor P  | Conv ±SD      | Eco ±SD        | Valor P  | Conv ±SD     | Eco ±SD        |
|-------------------------|---------|---------------|----------------|----------|---------------|----------------|----------|--------------|----------------|
| Hidroxitiroso           | 0,0688  | 262 ± 68      | A 219 ± 22     | A 0,1566 | 424 ± 105     | A 353 ± 37     | A 0,7104 | 421 ± 58     | A 433 ± 43     |
| Tiroso                  | 0,0099  | 310 ± 59      | A 187 ± 212    | B 0,3379 | 210 ± 88      | A 158 ± 41     | A 0,7522 | 304 ± 45     | A 298 ± 22     |
| Ácido cafeico           | 0,509   | 37 ± 10       | A 42 ± 12      | A 0,2778 | 24 ± 7        | A 30 ± 7       | A 0,0144 | 52 ± 12      | A 98 ± 22      |
| Ácido p-cumárico        | 0,0037  | 86 ± 7        | A 67 ± 5       | B 0,0838 | 72 ± 12       | A 56 ± 7       | A 0,0030 | 73 ± 6       | A 51 ± 5       |
| Oleuropeína             | 0,6139  | 68755 ± 11700 | A 66657 ± 6398 | A 0,239  | 73314 ± 10807 | A 64019 ± 5397 | A 0,0686 | 82976 ± 9257 | A 74702 ± 4752 |
| Verbascosido            | 0,337   | 2455 ± 1106   | A 1988 ± 700   | A 0,1378 | 2784 ± 1238   | A 1582 ± 763   | A 0,2006 | 2496 ± 963   | A 1768 ± 575   |
| Ligustrosido            | 0,493   | 6112 ± 32     | A 4073 ± 619   | B 0,0163 | 5842 ± 1334   | A 3279 ± 521   | B 0,0255 | 7382 ± 1829  | A 4878 ± 876   |
| Apigenina               | 0,0316  | 185 ± 249     | A 234 ± 44     | B 0,6353 | 257 ± 27      | A 248 ± 35     | A 0,2288 | 384 ± 47     | A 349 ± 50     |
| Luteolina               | 0,0412  | 222 ± 35      | A 272 ± 47     | B 0,1137 | 271 ± 19      | A 271 ± 31     | A 0,0074 | 373 ± 27     | A 332 ± 28     |
| Luteolina 7-o-glucosido | 0,0414  | 2609 ± 1429   | A 2873 ± 337   | B 0,9536 | 2550 ± 293    | A 3010 ± 301   | A 0,0462 | 3046 ± 176   | A 2420 ± 258   |
| Apigenina 7-o-glucosido | 0,0106  | 1893 ± 240    | A 2253 ± 215   | B 0,0468 | 1857 ± 2870   | A 2337 ± 244   | B 0,0232 | 2583 ± 311   | A 2044 ± 242   |

**b. Ácidos fenólicos:**

Los ácidos fenólicos pueden ser divididos en dos clases, derivados del ácido benzoico como el ácido gálico y derivados del ácido cinámico como los ácidos caféico, ferúlico y cumárico. El ácido caféico es el ácido fenólico más abundante en muchas plantas, frutos y vegetales. Los ácidos fenólicos representan la fracción más pequeña de los compuestos fenólicos de la hoja de olivo, representados con un 0,15% en hojas de cultivo convencional y 0,14% en hojas de cultivo ecológico (Figura 11). Se observó una mayor concentración al inicio de la primavera, que luego disminuyó en el mes de abril, para luego aumentar en el mes de mayo (Tabla 6). Para la concentración de ácido caféico no se observaron diferencias significativas entre el cultivo convencional y ecológico (Valor  $P=0,509$ ) con excepción del mes de mayo, siendo mayor en el cultivo ecológico. El ácido caféico está relacionado con la síntesis de lignina y la cafeína, también está relacionado con propiedades antifúngicas y por su capacidad de inhibir aflatoxinas de hongos (Boerjan, 2003). Puede ser que al no aplicarse fitosanitarios en los cultivos ecológicos, las plantas tiendan a producir más ácido caféico como mecanismo de defensa contra posibles patógenos.

La relación de la concentración del ácido p-cumárico fue distinta. En cultivo convencional se observó una concentración significativamente mayor que en cultivo ecológico durante los meses de marzo y mayo (Valor  $P=0,0037$ ) (Tabla 6). El ácido p-cumárico está identificado como sustancia alelopática y que está altamente influenciado por las condiciones ambientales (Tanaka *et al.*, 1990; Olofsdotter *et al.*, 2001). Estos resultados son similares a los de Devanand L. *et al.* 2010, en los cuales no se encontraron diferencias significativas ni tendencias consistentes en el contenido de ácidos fenólicos en muestras de berenjenas cultivadas de manera convencional y ecológica. Sin embargo contradicen los hallados por Hakkinen y Torronen (2000) en fresas ecológicas, que presentaron cantidades mayores de ácidos fenólicos y flavonoides.

**c. Compuestos secoiridoides:**

**Figura 12.** Muestra la evolución de compuestos secoiridoides en hojas de olivo de cultivo convencional y ecológico muestreadas de marzo hasta mayo.

El grupo de los compuestos secoiridoides de las hojas está formado por: oleuropeína, verbascósido, ligustrósido y juntos conforman el grupo mayoritario de los fenoles del olivo con una fracción entre 92-93% (Figura 10), dependiendo de la variedad. Hay estudios que indican que estos compuestos varían en hojas de olivo dependiendo del momento de muestreo (Le Toutour & Guedon 1992). El compuesto secoiridoide mayoritario de la hoja del olivo es la oleuropeína con una concentración media de 75015 µg/g PS en cultivo convencional y 68460 µg/g PS en cultivo ecológico. En la Tabla 6 se observa un incremento durante el periodo muestreado (ver Figura 13). Sin embargo no se observaron diferencias significativas entre ambos sistemas de cultivo, aunque en general el cultivo ecológico mostró valores más bajos (Figura 11). Para el caso del verbascósido se observa que prácticamente permanece constante durante el periodo estudiado (Figura 13). Su concentración siempre fue menor en cultivo ecológico. Por el contrario, ligustrósido es el secoiridoide en el que se observó las diferencias más significativas. Con concentraciones medias de 6445 µg/g PS y 4076 µg/g PS, siendo inferior en el cultivo ecológico. Hay que estudiar más estos compuestos y ver como sus concentraciones varían a lo largo del año, ya sea estudiar muestras tomadas en diferentes estaciones y en localidades distintas para de una manera menos ambigua, probar el impacto que tiene el medio

ambiente y/o condiciones del cultivo en el contenido de polifenoles y así ver si realmente existe una diferencia entre un sistema u otro.

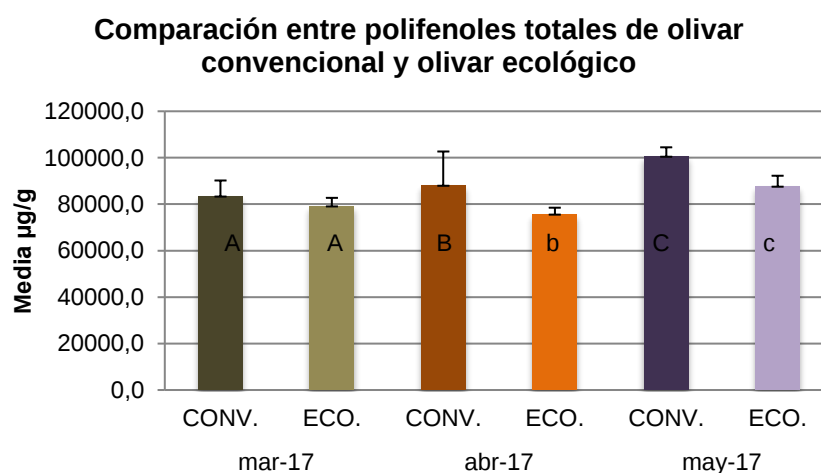
#### **d. Flavonoides libres y glucosilados**

El segundo grupo más importante de fenoles en hojas es el de los flavonoides (6-7%). En general los flavonoides presentes en una mayor concentración en la hoja son los glucosilados (Figura 10). Los flavonoides analizados fueron apigenina y luteolina y sus formas glucosiladas apigenina-7-o-glucosido y luteolina-7-o-glucosido. Durante el mes de marzo, se observó una mayor concentración de apigenina, luteolina y sus formas glucosiladas (valores  $P$ = Ap. 0,0316, Ap-7. 0,0106, Lut. 0,0412 y Lut-7. 0,0414). Las hojas de árboles cultivados en sistema ecológico tuvieron concentraciones superiores (cultivo ecológico: 1408  $\mu\text{g/g}$  PS, cultivo convencional: 1227  $\mu\text{g/g}$  PS) (Tabla 6). En el mes de abril las concentraciones de estos flavonoides estuvieron igualadas, con excepción del flavonoide glucosilado apigenina-7-o-glucosido, cuya concentración fue significativamente mayor en hojas de cultivo ecológico ( $P=0,0468$ ). Sin embargo, durante el mes de mayo ocurrió la inversa. La concentración de todos los flavonoides fue mayor en hojas de árboles de cultivo convencional, significativamente mayor para apigenina-7-o-glucosido, luteolina y luteolina-7-o-glucósido (Valores  $P$ = 0,0232, 0,0074 y 0,0462) (Tabla 6). No está bastante claro, pero hay estudios que muestran que las plantas producen más flavonoides cuando el nitrógeno orgánico está limitado. Tal vez, al no incorporar nitrógeno al suelo en cultivos ecológicos se está estimulando la síntesis de estos flavonoides (Mitchell et.al. 2007), las condiciones ambientales que provocan estrés en plantas durante el final de la primavera y comienzos del verano puede ser la razón del aumento en concentración de los flavonoides glucosilados en hojas de olivo ecológico.

### 5.3.4 Polifenoles totales:

**Tabla 7.** Polifenoles totales expresados como  $\mu\text{g/g PS} \pm \text{DE}$ . Las extracciones se realizaron con tres réplicas de cada muestra.

| Época                                  | marzo                 |                       | abril                  |                       | mayo                   |                       |
|----------------------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|
| Tratamiento                            | CONV.                 | ECO.                  | CONV.                  | ECO.                  | CONV.                  | ECO.                  |
| Media $\mu\text{g/g PS} \pm \text{DE}$ | 83286 $\pm$ 6920<br>A | 79028 $\pm$ 3705<br>A | 87933 $\pm$ 14750<br>A | 75507 $\pm$ 2988<br>B | 100421 $\pm$ 4065<br>A | 87524 $\pm$ 4724<br>B |
| VALORES P                              | P= 0,3428             |                       | P= 0,0179              |                       | P= 0,0048              |                       |



**Figura 13.** Comparación entre polifenoles totales de olivar convencional y olivar ecológico analizados durante los meses de marzo, abril y mayo de 2017.

Se comparó los polifenoles totales de hojas de ambos sistemas de cultivo, ecológico y convencional. Los resultados muestran que el contenido total de polifenoles no varió significativamente durante marzo (Valor  $P= 0,3428$ ). Sin embargo durante los meses de abril y mayo la concentración de polifenoles totales para cultivo ecológico fueron significativamente menores que los totales en hojas de árboles procedentes de cultivo convencional (abril: C=75506 vs E=87933, mayo: C=100420 vs E=87523, Valores  $P= 0,0179$  y  $0,00048$ ) (Tabla 7). La concentración de polifenoles totales tuvo tendencia a aumentar a medida que finalizaba el mes de mayo de manera significativa para ambos sistemas de cultivo (Figura 13). En otras especies vegetales se han puesto de manifiesto relaciones entre el estado de nutrición de las plantas y el contenido de fenoles

en sus distintos órganos o su proporción con relación a otros componentes orgánicos (Alcubilla *et.al.* 1990). Estos resultados parecen en parte coincidir con un estudio sobre los polifenoles en el zumo de tomate en el cual no se encontraron diferencias significativas en el contenido de fenoles totales y la capacidad antioxidante entre los cultivados en convencional y ecológico. Por otro lado otros estudios afirman que la presión que ejercen los patógenos en cultivos ecológicos pueden explicar el aumento en los fenoles totales en general (Vallverdú-Queralt *et.al.* 2012), pero tampoco coinciden del todo con los datos obtenidos en este proyecto.

Por otra parte hay estudios que demuestran la relación entre la calidad del aceite y los factores agronómicos a través del estado nutricional del olivo. Éste depende, para las diferentes variedades, de la fertilidad del suelo, de las características del medio físico (geología, topografía, factores climáticos, etc.), de los sistemas de producción (secano o regadío) y de las técnicas de cultivo empleadas (fertilizantes, fitosanitarios, etc.). El abonado en el olivar es una práctica muy extendida y poco regulada, a pesar de que existe una normativa. En ausencia de utilización de métodos de diagnóstico que sirvan de guía y control; el empleo nulo o excesivo de fertilizantes lleva a desequilibrios nutritivos, y suele provocar efectos negativos tanto en la producción como en la calidad del producto además de que afecta negativamente al medio ambiente. El estado nutricional puede influir de manera significativa en la composición orgánica de hojas y frutos, y de manera particular en lo referente a la composición de compuestos fenólicos. De ahí su repercusión en la calidad del aceite (Fernández-Escobar, 1998). Hay que estudiar más a fondo el entramado de factores que afecta la producción de metabolitos secundarios en el olivo y buscar metodologías que aporten fiabilidad a los datos obtenidos. No parecen existir suficientes estudios que demuestren de manera clara como la síntesis de polifenoles depende del tipo de manejo de cultivo en términos agronómicos y la relación con el estado nutricional del olivo. Se necesitan investigaciones más profundas al respecto para poder diferenciar a nivel agronómico, un sistema de

cultivo convencional de uno ecológico. Por ahora la pregunta sigue en pie: ¿realmente el manejo ecológico de los cultivos mejora o no las características nutricionales de los cultivos y sus productos?

### 5.3.5 CONCLUSIONES:

- Las condiciones de secado de la hoja no afectó al contenido total de fenoles, sin embargo, un tiempo de secado de 30 minutos garantiza la máxima extracción de algunos compuestos fenólicos.
- El porcentaje de humedad de la hoja no fue afectado por el tiempo de desecado en ningún caso.
- En general, no se han observado diferencias en la concentración de hidroxitirosol y tirosol en las hojas procedentes de olivos cultivados en condiciones ecológica y convencional.
- En mayo se observaron cantidades mayores de ácido caféico en olivos procedentes de cultivo ecológico, sin embargo, no se observaron diferencias para el resto de épocas de muestreo..
- Para los compuestos secoiridoides no se observaron diferencias significativas entre sistemas de cultivo con excepción de ligustrósido, presente en mayor concentración en hojas procedentes de cultivo convencional.
- Los flavonoides mostraron mayores concentraciones durante el mes de marzo en hojas procedentes de cultivo ecológico y en abril y mayo en hojas procedentes de cultivo convencional.
- Para el periodo de tiempo analizado, la fracción fenólica de las hojas no puede ser utilizada como marcador para la diferenciación de olivos cultivados en condiciones convencionales y ecológicas.

## BIBLIOGRAFÍA:

- ALCUBILLA, M.; HEIBL, R.; REHFUESS, K.E. (1990). "Los efectos a largo plazo de los fertilizantes en la composición química de la corteza de abeto y la madera y su actividad inhibidora en *Heterobasidion annosum* (Brf Bre.)." Una contribución a la investigación de la podredumbre roja ". Informes de investigación forense Munich, n.º 102, 182 pp
- ÁVALOS Y PÉREZ-URRÍA E. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.
- Análisis multifuncional de sistemas agrarios. Partell: Descripción de los sistemas de producción objeto de estudio. Caracterización, zonificación y tipificación del olivar en Andalucía. Obtenido de: <http://www.economiaandaluza.es/sites/default/files/cap224.pdf>
- BOERJAN, W., WOUT R., BAUCHER, M. (2003). «Ligninbiosynthesis». Annual Review of Plant Biology 54: 519-46. PMID 14503002. doi:10.1146/annurev.arplant.54.031902.134938.
- BUCHANAN B., GRUISSEM, W., JONES, W. (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD
- BERVILLÉ, A., BARADAT, PH., KHADARI, B. BRETON, C. (2001). «Origine et domestication de l'olivier. In: Actes des 1ères Rencontres Internationales de l'olivier (19 et 20 octobre 2000)». *L'olivier dans l'espace et dans le temps* (Institut du monde de l'olivier): 8-9.
- BEART, J., LILLEY, T., HSLAN, E. (2000) Plant Polyphenols. Secondary Plant Metabolism and Chemical Defense. *Phytochemistry*, **24**, 33-38.
- CARBONARO, M., MATTERA, M., NICOLI, S., BERGAMO, P. CAPPELLONI, M. (2002) Modulation of antioxidant compounds in organic vs conventional fruit (peach, *Prunus persica* L., and pear, *Pyrus communis* L.). *Journal of Agri- cultural and Food Chemistry*. 50(19):5458–62. PMID: 12207491
- CASADO-MOTILVA, A., ROMERO-FEBREGAT, M., SOLER-CANTERO, A. (2009). Estudio de la capacidad antioxidante y la biodisponibilidad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. Primeras etapas en el desarrollo de un aceite de oliva funcional. Universidad de Lleida. Escola Técnica Superior d'Enginyeria Agraria. Departament de Tecnologia d'Aliments.
- Consorcio para la Tutela del aceite extravirgen de oliva DOP Umbria. Historia de la olivicultura. (17 abril 2017) Le Fucine.it. Revisado: 25 de julio 2017. Obtenido de: <http://oliodopumbria.it/historia-de-la-olivicultura/>
- DE CANDOLLE, A. (2006). *Origin Of Cultivated Plants* (en inglés) (1.ª edición). Nueva York: Kessinger Publishing. ISBN 1428609466.
- DEY, P. & HARBORNE, J. (1989). "Methods in plant biochemistry". Plant phenolics. Academic Press. Vol. 1. Pp. 552.
- ESTI, M.; CINQUANTA, L.; LA NOTTE, E. (1998). "Phenolic compounds in different olive varieties". *J. Agric. Food Chem.* 46, 32-35

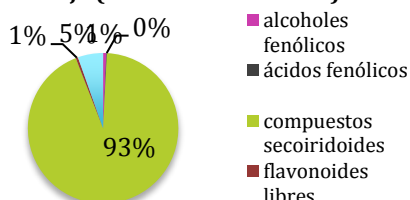
- EBERHARDT, M., LEE, C., LIU, R. (2000). Antioxidant activity of fresh apples, *Nature*, 405, 903-904.
- FERNÁNDEZ - ESCOBAR, R. (1998). "Fertilización". En "El cultivo del olivo". Barranco, D.; Fernández Escobar, R.; Rallo, L. 2ª Ed. Coedición. Junta de Andalucía-Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- GÓMEZ-CALERO, J. (2009) Sostenibilidad de la Producción de Olivar en Andalucía. CSIC Córdoba. Pp. 13-30
- GHANBARI, R. (2012). Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.)-A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, no. 3 [viewed 11 September 2013]. pp. 1291-1340. Available from: SCOPUS. ISSN 14220067. DOI 10.3390/ijms13033291.
- GUINDA, Á. (2006). Use of Solid Residue from the Olive Industry. *Grasas y Aceites*, vol. 57, no. 1 [viewed 11 November 2013]. pp. 107-115. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-33845778543&partnerID=40&md5=298b9a8223750a4108d078ea987c70e1> SCOPUS. ISSN 00173495.
- GATES, D. (1980). *Biophysical Ecology*. New York - Heidelberg - Berlin, Springer-Verlag.
- HERRERO, M. (2011). New Possibilities for the Valorization of Olive Oil by- Products. *Journal of Chromatography A*, vol. 1218, no. 42 [viewed 11 September 2013]. pp. 7511-7520. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-80053305619&partnerID=40&md5=065c9c9d9c13be9b88fe03f535c2c466> SCOPUS. ISSN 00219673. DOI 10.1016/j.chroma.2011.04.053.
- MOTE, G., TALIB, M. (2013) *International Journal of Science and Research (IJSR)* ISSN (Online): 2319-7064 Index Copernicus Value (2013): 6.14 | Impact Factor (2013): 4.438 Volume 4 Issue 5, May 2015 [www.ijsr.net](http://www.ijsr.net)
- JIN DAI and MUMPER R. (2010) Plant Phenolics: Extraction, Analysis and Their Antioxidant and Anticancer Properties *Molecules*. 15, 7313-7352; doi:10.3390/molecules15107313
- LE TOUR, B. & GUEDON, D. (1992). Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds, *Phytochemistry*, 31, 1173-1178
- LIPSCHITZ N., GOPHNA, R., HARTMAN, M., & BIGER (1991). «The beginning of olive (*olea europaea*) cultivation in the old world: A reassessment». *Journal of Archaeological Science* **18** (4): 441-453. doi:10.1016/0305-4403(91)90037-P.
- MAIANI, G., CASTÓN, M. CATASA, G. & TOTI (2010); Systematic analysis of the content of 502 polyphenols in 452 foods and beverages: an application of the phenol-explorer database. *J Agric Food Chem* 58(8):4959-4969.
- MORAN, M., CLARKE, T. & INOUE (1994). Estimating crop water deficit using the relation between surface-air temperature and spectral vegetation index. *Remote Sensing of Environment* 49: 246-263.

- MAESTRO-DURÁN, R., LEÓN-CABELLO, R. & GUTIERREZ, R. (1994) Compuestos Fenólicos del Olivo (Olea europea) Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) Grasas y Aceites. (45)4, pp. 265-269
- Manual de olivicultura ecológica*. Instituto de Sociología y Estudios Campesinos Universidad de Córdoba. Proyecto Equal-Adaptagro, 2004.
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, P. (2001) Sistemas de cultivo, Factores agronómicos, Climático-Ambientales, Técnicos y Socioculturales. Capítulo 5
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, P. & GARCÍA TRUJILLO, R. (2001) Integración entre olivar y ganadería: La finca ecológica Santa Casilda en los Pedroches.
- Muestreo hoja olivo <http://cmeuropa.com/laboratorio-analisis-de-aceites/analisis-foliar/el-muestreo-para-el-analisis-foliar>
- PASTOR, M. & CASTRO, M. (2001). Sistemas de manejo en olivar de Andalucía. Edafología vol. 8, pág.75-98.
- RANALLI, A., CONTENUTO, S., LUCERA, S., DI FEBBO, M., MARCHEGIANI, D. & DI FONZO, D. (2006) Factors affecting the contents of iridoid oleuropein in olive leaves (Olea europaea L.). Journal of Agricultural and Food Chemistry. 54: 434-440.
- RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A. & PROHENS, J. (2010) Effects of organic and conventional cultivation methods on composition of eggplant fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 58(11):6833–40. doi: 10.1021/jf904438n PMID: 20443597
- TEKAYA, M., MECHRI, B., BCHIR, A., ATTIA, F., CHEHEB, H., DAASSA, M., HAMMAMI, M., (2000) Meriem DOI: 10.1002/jsfa.6015 Effect of nutrient-based fertilisers of olive trees on olive oil quality
- TORRES RUIZ, A. (2013) Trabajo Fin de Máster: Estudio de la relación de la fracción fenólica de la hoja de olivo (Olea europea L.) y la susceptibilidad varietal al repilo (Spilocaea oleagina) Universidad de Jaén, Máster Universitario Olivar, Aceite de Oliva y Salud.
- TOUS, J., ROMERO, A., PLANA, J., GUERRERO, L., DIAZ, I. & HERMOSO, F. (1997). "Características de los aceites de oliva virgen de la variedad 'arbequina'". Fruticultura Profesional, nº88, Especial Olivicultura, II.
- VICENZO- LATTANZIO, LATTANZIO, V. & CARDINALI, A. (2006) Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects Phytochemistry: Advances in Research. 23-67 ISBN: 81-308-0034-9 Editor: Filippo Imperato
- YOUNG, J., ZHAO, X., CAREY, E., WELTI, R., YANG, S. & WANG, W. (2005) Phytochemical phenolics in organically grown vegetables. Molecular Nutrition & Food Research. 49(12):1136–42.

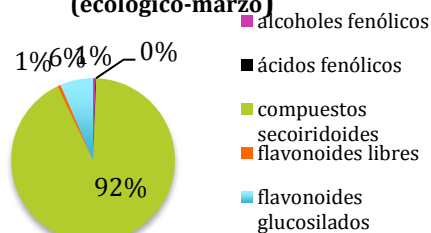
## ANEXOS

### ANEXO 1

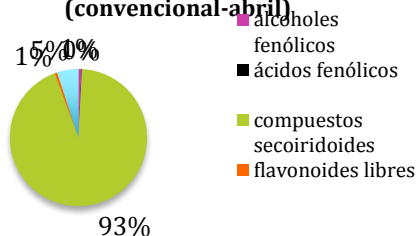
**Fracción del total de las distintas familias de fenoles extraídos de hoja (convencional-marzo)**



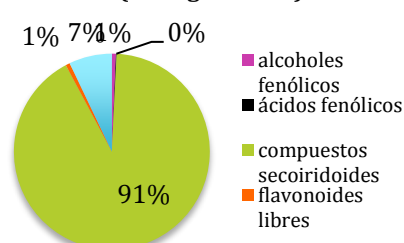
**Fracción del total de las distintas familias de fenoles extraídos de hoja (ecológico-marzo)**



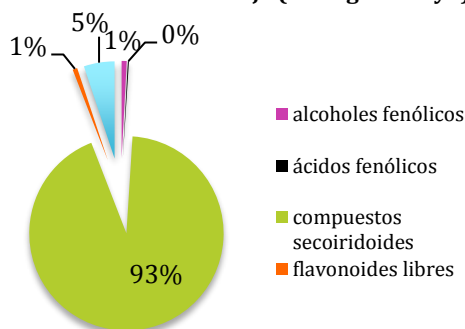
**Fracción del total de las distintas familias de fenoles extraídos de hoja (convencional-abril)**



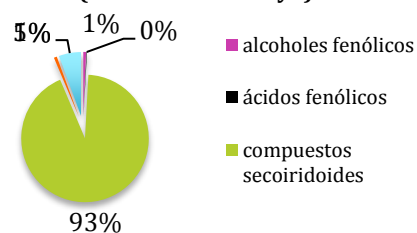
**Fracción del total de las distintas familias de fenoles extraídos de hoja (ecológico-abril)**



**Fracción del total de las distintas familias de fenoles extraídos de hoja (ecológico-mayo)**



**Fracción del total de las distintas familias de fenoles extraídos de hoja (convencional-mayo)**

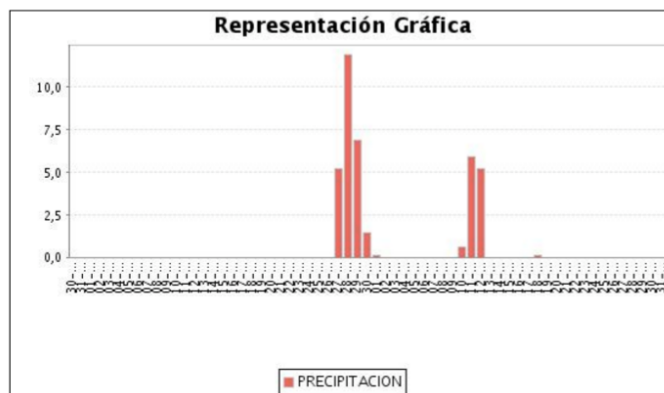


## ANEXO II

### RESULTADOS DE LA CONSULTA

#### Estación Meteorológica de IFAPA Centro Mengibar

|                   |                                                 |                         |                       |
|-------------------|-------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Provincia         | Jaén                                            | Estación                | IFAPA Centro Mengibar |
| Periodo de Medida | Desde <b>30-03-2017</b> hasta <b>31-05-2017</b> |                         |                       |
| Acumulado ETo     | 273.5                                           | Acumulado Precipitación | 37.3                  |



### RESULTADOS DE LA CONSULTA

#### Estación Meteorológica de IFAPA Centro Mengibar

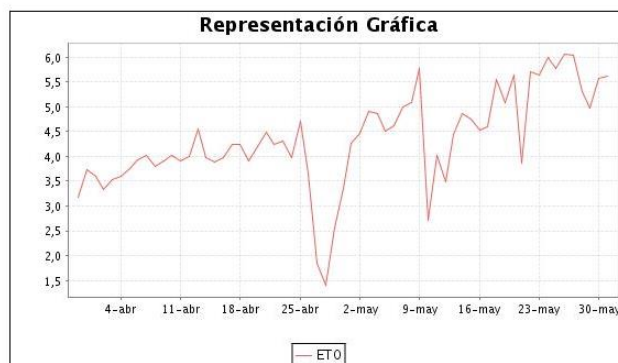
|                   |                                                 |                         |                       |
|-------------------|-------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Provincia         | Jaén                                            | Estación                | IFAPA Centro Mengibar |
| Periodo de Medida | Desde <b>30-03-2017</b> hasta <b>31-05-2017</b> |                         |                       |
| Acumulado ETo     | 273.5                                           | Acumulado Precipitación | 37.3                  |



### RESULTADOS DE LA CONSULTA

#### Estación Meteorológica de IFAPA Centro Mengibar

|                   |                                                 |                         |                       |
|-------------------|-------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Provincia         | Jaén                                            | Estación                | IFAPA Centro Mengibar |
| Periodo de Medida | Desde <b>30-03-2017</b> hasta <b>31-05-2017</b> |                         |                       |
| Acumulado ETo     | 273.5                                           | Acumulado Precipitación | 37.3                  |



**Figura 9.** Resultados de consulta de la búsqueda de evapotranspiración (ET<sub>o</sub>), temperaturas medias y precipitaciones en la Estación Meteorológica de IFAPA Mengíbar durante los meses marzo, abril y mayo de 2017.

### ANEXO III

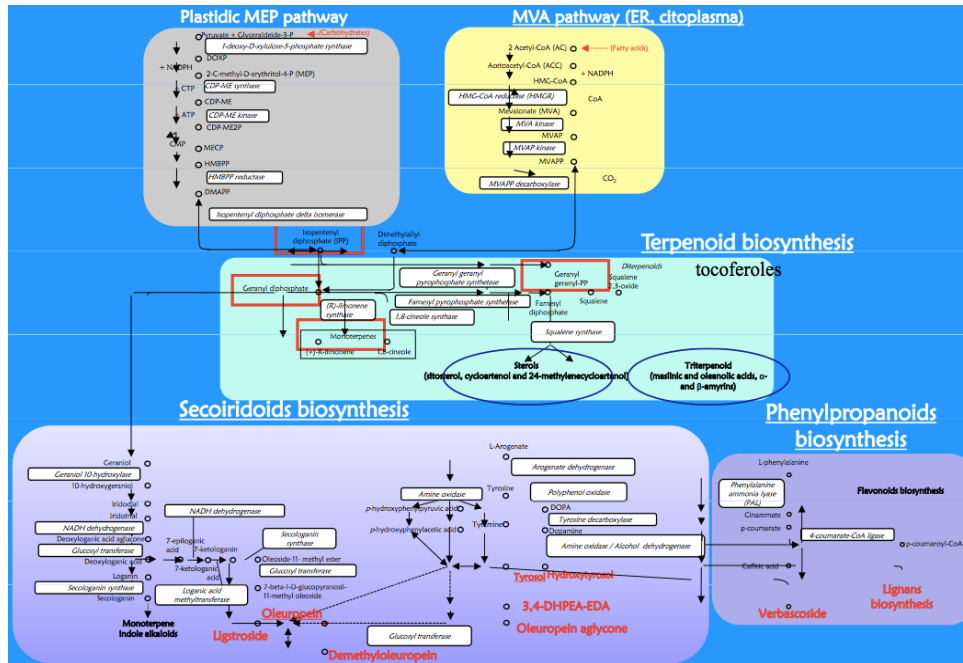
Clasificación general de los compuestos fenólicos de las plantas:

Secondary Metabolites and Plant Defense". En: Taiz, Lincoln y Eduardo Zeiger. *Plant Physiology, Fourth Edition*. Sinauer Associates, Inc. 2006. Capítulo 13.

| Clase                                                                  | Esqueleto de carbonos                                          | Número de átomos de carbono |
|------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Fenoles simples, Benzoquinonas                                         | C <sub>6</sub>                                                 | 6                           |
| Ácidos fenólicos                                                       | C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>                                 | 7                           |
| Ácido hidroxicinámico, Cromonas, Cumarinas, Isocumarina y Polipropenos | C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>                                 | 8                           |
| Naftoquinonas                                                          | C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>                                 | 9                           |
| Xantonas                                                               | C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>                                 | 10                          |
| Antraquinonas, Estilbenos                                              | C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>                 | 14                          |
| Flavonoides, Isoflavonoides                                            | C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>                 | 15                          |
| Lignanós, Neolignanós                                                  | C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>                 | 18                          |
| Biflavonoides                                                          | (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub> | 30                          |
| Ligninas                                                               | (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>                 | n                           |
| Catecolmelanina                                                        | (C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>                                 | n                           |
| Taninos condensados                                                    | (C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub> | n                           |

## ANEXO IV

Esquema de síntesis de fenoles. Tomado de fisiología y morfología del olivo



## ANEXO V



Centrífuga y molino IKA T25 digital ULTRA

