



Universitat de Lleida
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN
DE DIFERENTES ESTRATEGIAS DE RIEGO
AL OLIVO (*Olea europaea* L.) DE LA
VARIEDAD ARBEQUINA SOBRE LA
COMPOSICIÓN DEL ACEITE**

M^a JESÚS TOVAR DE DIOS
Tesis Doctoral
Diciembre 2001



Universitat de Lleida
Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària
Departament de Tecnologia d'Aliments

**ESTUDIO DEL EFECTO DE LA APLICACIÓN DE DIFERENTES
ESTRATEGIAS DE RIEGO AL OLIVO (*Olea europaea* L.) DE LA
VARIEDAD ARBEQUINA SOBRE LA COMPOSICIÓN DEL ACEITE**

Memoria presentada por:
M^a Jesús Tovar de Dios
para optar al grado de Doctora

Directoras de tesis: M^a José Motilva Casado
Mari Paz Romero Fabregat

Lleida, Diciembre de 2001

Este trabajo ha sido realizado en el laboratorio de Aceites y Grasas del Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universidad de Lleida. Ha recibido la financiación de la CIRIT (Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica), la CICYT (Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología) y de La Paeria (Ayuntamiento de Lleida).

ABREVIATURAS

3,4-DHPEA	Hidroxitirosol
3,4-DHPEA-AC	4-(acetoxietil)-1,2-dihidroxibenceno
3,4-DHPEA-EA	Oleuropeina aglicona
3,4-DHPEA-EDA	Forma dialdehídica del ácido elenólico unida al hidroxitirosol
ET ₀	Evapotranspiración de referencia
ET _c	Evapotranspiración del cultivo
KAS	Sistema enzimático ácido graso sintetasa
K ₂₂₅	Índice de amargor
K ₂₇₀	Absorbancia a 270 nm
K _c	Coefficiente de cultivo
K _r	Coefficiente de reducción por superficie sombreada
P	Pluviometría
PAL	Enzima fenilalanina amonio liasa
p-HPEA	Tirosol
p-HPEA-EDA	Forma dialdehídica del ácido elenólico unida al tirosol
T max abs	Temperatura máxima absoluta
T min abs	Temperatura mínima absoluta
RDC	Riego deficitario controlado

RESUMEN

El olivo ha sido considerado como un cultivo de secano por ser un árbol que dispone de suficientes recursos para adaptarse satisfactoriamente a las zonas áridas de la cuenca mediterránea. Desde un punto de vista productivo, responde muy favorablemente a pequeñas aportaciones de agua complementarias a la lluvia, a pesar de que sus requerimientos hídricos son elevados.

Considerando que la disponibilidad de agua para el riego es un factor limitante en agricultura, resulta importante, por una parte, determinar los requerimientos hídricos del olivo para la correcta utilización de este recurso, y por otra, estudiar estrategias de riego tendentes a disminuir los aportes hídricos con el menor impacto posible en la producción y en la calidad de la cosecha.

Es en este último punto, la calidad de la cosecha y concretamente la calidad del aceite de oliva, en el que se centra el objetivo general del presente trabajo. Se ha estudiado el efecto de la aplicación de dos estrategias de riego, una estrategia de riego deficitario controlado y una estrategia de riego lineal, a olivos de la variedad *Arbequina* cultivados en la zona de producción amparada bajo la Denominación de Origen Protegida 'Les Garrigues' (Lleida), sobre la calidad, composición química y evaluación organoléptica de los aceites obtenidos.

El ensayo de riego deficitario controlado se realizó en una plantación comercial de olivos adultos durante los años 1996-1998, aplicándose 4 tratamientos de riego consistentes en un tratamiento control (100% ET_c), y tres tratamientos deficitarios regados igual que el control, excepto desde el inicio de endurecimiento del hueso (mediados de julio) hasta finales de septiembre, en los que se aplicó el 75%, 50% y 25% de la dosis del tratamiento control (tratamientos RDC-75, RDC-50 y RDC-25 respectivamente).

A partir de los resultados obtenidos y desde el punto de vista de la calidad y composición química del aceite, podemos decir que los aceites procedentes de la estrategia de riego más deficitaria (RDC-25) son los que difieren significativamente, tomando siempre como referencia a los aceites del tratamiento control. Los aceites del tratamiento RDC-25 se caracterizan por un mayor contenido de polifenoles y por lo tanto una mayor estabilidad frente a la oxidación, pero con el riesgo subsiguiente, en función de la climatología del año, en especial el régimen de lluvias, de presentar una excesiva intensidad del atributo amargo. Los aceites de las estrategias RDC-50 y RDC-75, que suponen un importante ahorro del agua de riego, incrementan el contenido de polifenoles respecto a los aceites del tratamiento control, aunque no la estabilidad oxidativa. El índice de amargor en los aceites de estas dos estrategias es ligeramente superior que en el tratamiento control, hecho igualmente patente en los resultados de la cata sensorial, donde además destacan estos aceites por una mayor intensidad del atributo frutado y una puntuación global ligeramente superior. Como conclusión de esta parte del estudio, se puede

afirmar que con la aplicación de las estrategias RDC-50 y RDC-75 se puede conseguir un importante ahorro del agua de riego sin afectar a la calidad del aceite y obtener aceites ligeramente más estables y más frutados.

El ensayo de riego lineal se realizó en una plantación comercial de olivos jóvenes durante los años 1998-1999, aplicándose 7 tratamientos basados en una variación lineal de los valores del coeficiente de cultivo (K_c) ($K_c = 0.25, 0.38, 0.50, 0.57, 0.64, 0.71$ y 0.85 , correspondientes a los tratamientos T1 a T7 respectivamente).

A partir de los resultados obtenidos y desde el punto de vista de la calidad y composición química del aceite podemos decir que la aplicación de dosis crecientes de agua de riego a olivos jóvenes de la variedad *Arbequina* en las condiciones del ensayo, aunque no afecta a los parámetros clásicos de calidad del aceite de oliva, sí que tiene un claro efecto sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos del aceite y sobre el contenido de polifenoles. Es en los aceites correspondientes a los tratamientos con mayor aporte de agua T6 ($K_c=0.71$) y T7 ($K_c=0.85$) donde la disminución de pigmentos clorofílicos y carotenoides es notablemente superior, así como en el contenido de polifenoles, lo que implica una disminución de la estabilidad de los aceites frente a la oxidación y un menor índice de amargor. En el extremo opuesto se encuentran los aceites de los tres tratamientos menos regados, T1 ($K_c=0.25$), T2 ($K_c=0.38$) y T3 ($K_c=0.50$), que presentan un elevado contenido de polifenoles y por lo tanto una mayor resistencia a la oxidación, pero con el inconveniente de resultar aceites amargos. Sobre la base de estos resultados y desde el punto de vista de composición del aceite, los tratamientos más adecuados parecen encontrarse en las posiciones intermedias, que corresponderían a los tratamientos T4 ($K_c=0.57$) y T5 ($K_c=0.64$).

RESUM

L'olivera ha sigut considerada com un cultiu de secà per ser un arbre que disposa de suficients recursos per adaptar-se satisfactòriament a les zones àrides de la conca mediterrània. No obstant, des d'un punt de vista productiu respon molt favorablement a petites aportacions d'aigua complementàries a la pluja, malgrat que els seus requeriments hídrics són elevats.

Considerant que la disponibilitat d'aigua per al reg és un factor limitant en agricultura, resulta important, per una part, determinar els requeriments hídrics de l'olivera per a la correcta utilització d'aquest recurs, i per una altra, estudiar estratègies de reg tendents a disminuir els aports hídrics amb el menor impacte possible en la producció i en la qualitat de la collita.

És en aquest últim punt, la qualitat de la collita i concretament la qualitat de l'oli d'oliva, en el que es centra l'objectiu general del present treball. S'ha estudiat l'efecte de l'aplicació de dos estratègies de reg, una estratègia de reg deficitari controlat (RDC) i una estratègia de reg lineal, a oliveres de la varietat *Arbequina* cultivades a la zona de producció amparada sota la Denominació d'Origen Protegida 'Les Garrigues' (Lleida), sobre la qualitat, composició química i avaluació organolèptica dels olis obtinguts.

L'assaig de reg deficitari controlat es va realitzar en una plantació comercial d'oliveres adultes durant els anys 1996-1998, aplicant-se 4 tractaments de reg consistents en un tractament control (100% ET_c), i tres tractaments deficitaris regats igual que el control, excepte des de l'inici d'enduriment de l'os (mitjans de juliol) fins a finals de setembre, en els que es va aplicar el 75%, 50% y 25% de la dosis del tractament control (tractaments RDC-75, RDC-50 i RDC-25 respectivament).

A partir dels resultats obtinguts i des del punt de vista de la qualitat i composició química de l'oli, podem dir que els olis procedents de la estratègia de reg més deficitària (RDC-25) són els que difereixen significativament, agafant sempre com a referència els olis del tractament control. Els olis del tractament RDC-25 es caracteritzen per un major contingut de polifenols i en conseqüència per una major estabilitat en front l'oxidació, però amb el risc, en funció de la climatologia de l'any, en especial el règim de pluges, de presentar una excessiva intensitat de l'atribut amarg. Els olis de les estratègies RDC-50 i RDC-75, que suposen un important estalvi de l'aigua de reg, incrementen el contingut de polifenols respecte als olis del tractament control, encara que no l'estabilitat oxidativa. L'índex d'amargor en els olis d'aquestes dos estratègies és lleugerament superior que en el tractament control, fet igualment patent en els resultats del tast sensorial, on a més a més destaquen aquests olis per una major intensitat de l'atribut fruitat i una puntuació global lleugerament superior. Com a conclusió d'aquesta part de l'estudi es pot afirmar que amb l'aplicació de les estratègies RDC-50 y RDC-75 es pot aconseguir un important estalvi de l'aigua de reg sense afectar la qualitat de l'oli i obtenir olis lleugerament més estables i més afruitats.

L'assaig de reg lineal es va realitzar en una plantació comercial d'oliveres joves durant els anys 1998-1999, aplicant-se 7 tractaments basats en una variació lineal dels valors del coeficient de cultiu (K_c) ($K_c = 0.25, 0.38, 0.50, 0.57, 0.64, 0.71$ y 0.85 , corresponents als tractaments T1 a T7 respectivament).

A partir dels resultats obtinguts i des del punt de vista de la qualitat i composició química de l'oli podem dir que l'aplicació de dosis creixents d'aigua de reg a oliveres joves de la varietat *Arbequina* en les condicions de l'assaig, encara que no afecta als paràmetres clàssics de qualitat de l'oli d'oliva, sí que té un clar efecte sobre el contingut de pigments fotosintètics de l'oli i sobre el contingut de polifenols. És en els olis corresponents als tractaments amb major aport d'aigua, T6 ($K_c=0.71$) i T7 ($K_c=0.85$), on la disminució de pigments clorofil·lics i carotenoides és notablement superior, així com en el contingut de polifenols, el que implica una disminució de l'estabilitat dels olis en front l'oxidació i un menor índex d'amargor. En l'extrem oposat es troben els olis dels tres tractaments menys regats, T1 ($K_c=0.25$), T2 ($K_c=0.38$) i T3 ($K_c=0.50$), que presenten un elevat contingut de polifenols i per tant una major resistència a l'oxidació, però amb l'inconvenient de resultar olis amargs. Sobre la base d'aquests resultats i des del punt de vista de composició de l'oli, els tractaments més adequats semblen trobar-se en les posicions intermitges, que correspondrien als tractaments T4 ($K_c=0.57$) i T5 ($K_c=0.64$).

SUMMARY

Olive tree has been regarded as a dry farmed crop since it has enough resources to adapt to the arid zones of the Mediterranean basin. From a productive point of view, it responds favourably to small additional amounts of water besides the rain, despite being its water requirements high.

Taking into account that water availability is a considerable constraint in agriculture, it is important on the one hand to determine the olive tree water requirements for a correct use of this resource and on the other hand, to evaluate irrigation strategies tending to reduce water supplies without affecting production and quality.

The main objective of the present work is based on the assessment of olive oil quality. The effect of two irrigation strategies has been studied: a regulated deficit irrigation strategy (RDC) and a linear irrigation strategy, in olive trees cv. *Arbequina* grown under the area of the Protected Denomination of Origin 'Les Garrigues' (Lleida), on the quality, chemical composition and organoleptic characteristics of the oils obtained.

Regulated deficit irrigation strategy experiment was located in a commercial orchard of mature olive trees during three years (1996-1998), applying 4 irrigation treatments corresponding to a control treatment (100% ET_c) and three RDC treatments, irrigated like the control but applying only the 75%, 50% and 25% of the control dose during the period ranging from the massive pit hardening (mid July) to the end of September (treatments RDC-75, RDC-50 and RDC-25 respectively).

From the olive oil quality point of view, it can be said that oils from the most deficitary irrigation treatment (RDC-25) are the ones which significantly differ from those of the control treatment. Oils from RDC-25 treatment are characterised by a higher level of polyphenols and consequently, by a higher oxidative stability. The bitter index of these oils is slightly higher than for the control treatment, a fact confirmed by the results of the sensorial analysis. These oils are also characterised by a higher intensity of the fruity attribute and a slightly higher overall grading. As a conclusion of this part, it can be affirmed that RDC-50 and RDC-75 strategies lead to important savings of irrigation water without affecting oil quality and oils slightly more stables and fruity are obtained.

The linear irrigation experiment was located in a commercial orchard of young olive trees for two years (1998-1999), applying 7 irrigation treatments defined according to the crop coefficient (K_c) ($K_c = 0.25, 0.38, 0.50, 0.57, 0.64, 0.71$ and 0.85 , corresponding to T1 to T7 treatments respectively).

From the quality point of view it can be said that the supply of increasing amounts of irrigation water to young olive trees cv. *Arbequina* under these trial conditions, although has no effect on

the classical quality parameters of olive oil, it does have a clear effect on the photosynthetic pigments and phenolic content of the oil. In the oils from the most irrigated treatments, T6 ($K_c=0.71$) and T7 ($K_c=0.85$), there is a marked decrease of chlorophyll and carotenoid pigments content as well as phenolic content, which implies a decrease on oxidative stability and a lower bitter index. On the other hand, oils from the less irrigated treatments, T1 ($K_c=0.25$), T2 ($K_c=0.38$) y T3 ($K_c=0.50$), show a high level of phenols and consequently a higher resistance against oxidation, but with the disadvantage of being excessively bitter oils. From the quality point of view, the most suitable treatments are located in the intermediate conditions, which would correspond to T4 ($K_c=0.57$) and T5 ($K_c=0.64$) treatments.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1.- El olivo.....	5
2.1.1.- El ciclo vegetativo y reproductor del olivo.....	5
2.2.- La oliva.....	6
2.3.- Biosíntesis de lípidos en la oliva.....	7
2.4.- Biosíntesis de compuestos fenólicos.....	10
2.4.1.- La ruta del ácido siquímico.....	11
2.4.2.- La ruta del ácido mevalónico.....	13
2.4.3.- Enzima fenilalanina amonio liasa.....	15
2.5.- La fracción fenólica.....	16
2.5.1.- Compuestos fenólicos en la oliva.....	18
2.6.- Composición química del aceite de oliva.....	19
2.6.1.- Fracción saponificable.....	21
2.6.2.- Fracción insaponificable.....	23
2.6.2.1.- Pigmentos.....	24
2.6.2.2.- Tocoferoles.....	25
2.6.2.3.- Polifenoles.....	27
2.6.3.- Estabilidad del aceite de oliva.....	29
2.7.- Influencia de los factores agronómicos y tecnológicos sobre la composición del aceite.....	31
2.7.1.- Influencia de la variedad y del grado de maduración de la oliva.....	31
2.7.2.- Influencia de los factores ambientales.....	33
2.7.3.- Influencia del riego.....	34
2.7.4.- Influencia de la tecnología de extracción del aceite.....	35
3.- OBJETIVOS.....	37
3.1.- Estrategia de riego deficitario controlado.....	37
3.2.- Estrategia de riego lineal.....	37
3.3.- Relaciones de interdependencia entre los componentes del aceite.....	38
4.- PLAN DE TRABAJO.....	39
4.1.- Experiencia de riego deficitario controlado.....	40
4.1.1.- Efecto del riego deficitario controlado sobre la composición del aceite durante el período de maduración del fruto.....	40
4.1.2.- Efecto del riego deficitario controlado sobre la composición del aceite en campañas oleícolas consecutivas (1996-1998).....	40

4.1.3.- Efecto del riego deficitario controlado sobre la acumulación de compuestos fenólicos en el fruto durante su crecimiento y maduración.....	40
4.2.- Experiencia de riego lineal.....	41
4.2.1.- Efecto del riego lineal sobre la composición del aceite en campañas oleícolas consecutivas (1998-1999).....	41
4.2.2.- Efecto del riego lineal sobre la acumulación de compuestos fenólicos y la actividad PAL en el fruto durante su maduración.....	41
5.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	42
5.1.- Dispositivo experimental de riego deficitario controlado.....	42
5.1.1.- Localización de la parcela.....	42
5.1.2.- Caracterización climática.....	43
5.1.3.- Material vegetal.....	43
5.1.4.- Tratamientos de riego.....	43
5.1.5.- Toma de muestras.....	45
5.1.5.1.- Muestreo de frutos durante la maduración en el año 1996.....	45
5.1.5.2.- Muestreo de frutos en cosecha.....	47
5.1.5.3.- Muestreo de frutos durante la maduración en el año 1998.....	47
5.2.- Dispositivo experimental de riego lineal.....	48
5.2.1.- Localización de la parcela.....	48
5.2.2.- Caracterización climática.....	49
5.2.3.- Material vegetal.....	49
5.2.4.- Tratamientos de riego.....	49
5.2.5.- Toma de muestras.....	52
5.2.5.1.- Muestreo de frutos en cosecha.....	52
5.2.5.2.- Muestreo de frutos durante la maduración en el año 1999.....	52
5.3.- Métodos analíticos.....	53
5.3.1.- Aceite.....	53
5.3.1.1.- Obtención del aceite y cálculo del rendimiento.....	53
5.3.1.2.- Humedad de la pasta de olivas.....	54
5.3.1.3.- Determinación del contenido de grasa de la pasta de olivas.....	54
5.3.1.4.- Grado de acidez.....	55
5.3.1.5.- Índice de peróxidos.....	55
5.3.1.6.- Absorbancia en el UV (K ₂₇₀).....	56
5.3.1.7.- Perfil de ácidos grasos.....	57
5.3.1.8.- Pigmentos fotosintéticos.....	58
5.3.1.9.- Coordenadas instrumentales de color.....	58
5.3.1.10.- α -Tocoferol.....	59
5.3.1.11.- Polifenoles totales.....	59
5.3.1.12.- Estabilidad frente a la oxidación.....	60
5.3.1.13.- Índice de amargor (K ₂₂₅).....	60

5.3.1.14.- Determinación de compuestos fenólicos por HPLC	61
5.3.1.15.- Análisis sensorial.....	62
5.3.2.- Olivas.....	63
5.3.2.1.- Índice de madurez.....	63
5.3.2.2.- Humedad de la pulpa.....	64
5.3.2.3.- Materia grasa de la pulpa.....	65
5.3.2.4.- Polifenoles totales de la pulpa.....	65
5.3.2.5.- Actividad enzimática PAL.....	65
5.4.- Análisis estadístico.....	66
6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	67
6.1.- Riego deficitario controlado.....	67
6.1.1.- Efecto del riego deficitario controlado sobre la composición del aceite durante el período de maduración del fruto.....	67
6.1.1.1.- Índice de madurez y humedad de las olivas.....	67
6.1.1.2.- Perfil de ácidos grasos del aceite.....	69
6.1.1.3.- Contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides del aceite.....	71
6.1.1.4.- Coordenadas instrumentales de color.....	73
6.1.1.5.- Polifenoles y estabilidad oxidativa.....	75
6.1.2.- Efecto del riego deficitario controlado sobre la calidad, composición química y características organolépticas del aceite en campañas oleícolas consecutivas.....	77
6.1.2.1.- Índice de madurez y humedad de las olivas.....	78
6.1.2.2.- Parámetros de calidad comercial del aceite.....	79
6.1.2.3.- Perfil de ácidos grasos del aceite.....	80
6.1.2.4.- Pigmentos clorofílicos y carotenoides y coordenadas instrumentales de color.....	82
6.1.2.5.- Contenido de α -tocoferol y de polifenoles totales, estabilidad oxidativa e índice de amargor (K_{225}) de los aceites.....	86
6.1.2.6.- Características organolépticas del aceite.....	90
6.1.3.- Efecto del riego deficitario controlado sobre la acumulación de compuestos fenólicos en el fruto durante su crecimiento y maduración.....	92
6.1.3.1.-Índice de madurez de los frutos y humedad de la pulpa.....	92
6.1.3.2.- Polifenoles totales de la pulpa de las olivas.....	94
6.1.4.- Discusión global de efecto del riego deficitario controlado sobre la calidad y composición del aceite de oliva.....	95
6.2.- Riego lineal.....	100
6.2.1.- Efecto del riego lineal sobre la calidad, composición química y características organolépticas del aceite en campañas oleícolas consecutivas.....	101
6.2.1.1.- Índice de madurez y humedad de las olivas.....	101

6.2.1.2.- Parámetros de calidad comercial del aceite.....	102
6.2.1.3.- Perfil de ácidos grasos del aceite.....	104
6.2.1.4.- Pigmentos clorofílicos y carotenoides y coordenadas instrumentales de color.....	106
6.2.1.5.- Contenido de α -tocoferol y de polifenoles totales, estabilidad oxidativa e índice de amargor (K_{225}) de los aceites.....	110
6.2.1.6.- Características organolépticas del aceite.....	114
6.2.1.7.- Perfil cromatográfico de los compuestos fenólicos del aceite.....	116
6.2.2.- Efecto del riego lineal sobre la acumulación de polifenoles y la actividad del enzima PAL en el fruto durante el período de maduración.....	122
6.2.2.1.- Índice de madurez de la oliva y contenido de humedad y grasa de la pulpa.....	123
6.2.2.2.- Actividad del enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5)..	125
6.2.2.3.- Polifenoles totales de la pulpa de las olivas.....	127
6.2.3.- Discusión global del efecto del riego lineal sobre la calidad y composición del aceite de oliva.....	128
7.- CONCLUSIONES.....	132
7.1.- Experiencia de riego deficitario controlado.....	132
7.2.- Experiencia de riego lineal.....	134
7.3.- Relaciones de interdependencia entre los componentes del aceite.....	136
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	138

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Composición química de las principales partes de la oliva.....	7
Tabla 2.- Las principales clases de compuestos fenólicos en las plantas.....	11
Tabla 3.- Parámetros de calidad de los aceites de oliva vírgenes.....	20
Tabla 4.- Composición de ácidos grasos del aceite de oliva expresado en porcentaje.....	21
Tabla 5.- Principales componentes de la fracción insaponificable del aceite de oliva.....	23
Tabla 6.- Temperaturas, evapotranspiración y pluviometría durante el período 1996-1998. Datos procedentes de la estación climática de La Granadella (Lleida).....	43
Tabla 7.- Fechas correspondientes al inicio y final del período de RDC durante los tres años del ensayo.....	44
Tabla 8.- Cantidades de agua de riego aplicadas en la parcela experimental de Bovera.....	45
Tabla 9.- Temperaturas, evapotranspiración y pluviometría durante el período 1998-1999. Datos procedentes de la estación agroclimática de Raïmat (Lleida).....	49
Tabla 10.- Coeficientes de reducción aplicados durante los dos años de ensayo de la experiencia de riego lineal.....	50
Tabla 11.- Cantidades de agua de riego aplicadas durante los dos años de ensayo de la experiencia de riego lineal.....	50
Tabla 12.- Índice de madurez , contenido de humedad (%) y de materia grasa (% en base seca) de las olivas de la variedad <i>Arbequina</i> en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos en las diferentes fechas de muestreo.....	68
Tabla 13.- Perfil de ácidos grasos, expresado en %, del aceite de la variedad <i>Arbequina</i> en relación con la fecha de muestreo y con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.....	69

Tabla 14.- Contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides, expresados como mg de feofitina <i>a</i> y mg de luteína kg ⁻¹ de aceite, respectivamente, del aceite de la variedad <i>Arbequina</i> en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos, en las diferentes fechas de muestreo.....	72
Tabla 15.- Coordenadas cromáticas L*, a* y b* del aceite de la variedad <i>Arbequina</i> en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos, para cada fecha de muestreo.....	74
Tabla 16.- Contenido de polifenoles totales (mg de ácido cafeico kg ⁻¹ de aceite) y estabilidad (horas) del aceite de la variedad <i>Arbequina</i> en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos, en las diferentes fechas de muestreo.....	76
Tabla 17.- Índice de madurez, contenido de humedad (%) y de materia grasa (%) de las olivas de la variedad <i>Arbequina</i> los años 1996, 1997 y 1998 en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.....	78
Tabla 18.- Parámetros de calidad del aceite de la variedad <i>Arbequina</i> de los años 1996, 1997 y 1998 en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.....	79
Tabla 19.- Perfil de ácidos grasos, expresado en %, del aceite de la variedad <i>Arbequina</i> de los años 1996, 1997 y 1998 en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.....	81
Tabla 20.- Contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides, expresados como mg de feofitina <i>a</i> y mg de luteína kg ⁻¹ de aceite, respectivamente, de los aceites de la variedad <i>Arbequina</i> en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.....	83
Tabla 21.- Coordenadas cromáticas L*, a* y b* del aceite de la variedad <i>Arbequina</i> en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.....	84
Tabla 22.- Matriz de correlación entre las coordenadas cromáticas del espacio CIELAB y la concentración de pigmentos clorofílicos y carotenoides del aceite de la variedad <i>Arbequina</i> (coeficiente de correlación y nivel de significación).....	85

Tabla 23.- Contenido de α -tocoferol (mg kg^{-1}) y de polifenoles totales (mg de ácido cafeico kg^{-1} de aceite), estabilidad (horas) e índice de amargor (K_{225}) del aceite de la variedad <i>Arbequina</i> de los años 1996, 1997 y 1998 en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.....	86
Tabla 24.- Análisis de regresión múltiple para la estabilidad.....	88
Tabla 25.- Análisis de regresión entre las variables polifenoles totales e índice de amargor.....	90
Tabla 26.- Puntuación global y atributos sensoriales del aceite de la variedad <i>Arbequina</i> de la campaña 1998 en relación con el tratamiento de riego aplicado al olivo.	91
Tabla 27.- Índice de madurez del fruto y humedad (%) de la pulpa de las olivas de la variedad <i>Arbequina</i> en relación con la fecha de muestreo y con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.....	93
Tabla 28.- Contenido de polifenoles totales de la pulpa (g de ácido cafeico kg^{-1} de pulpa seca) de las olivas de la variedad <i>Arbequina</i> en relación con la fecha de muestreo y con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.....	94
Tabla 29.- Valores medios de los parámetros índice de madurez y contenido de humedad (%) de las olivas de la variedad <i>Arbequina</i> y el correspondiente nivel de significación del análisis de regresión en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.....	101
Tabla 30.- Valores medios de los parámetros de calidad del aceite y el correspondiente nivel de significación del análisis de regresión en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.....	103
Tabla 31.- Perfil de ácidos grasos del aceite y el correspondiente nivel de significación del análisis de regresión en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.....	105
Tabla 32.- Valores medios del contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides, expresados como mg de feofitina <i>a</i> y mg de luteína kg^{-1} de aceite, respectivamente, y el correspondiente nivel de significación del análisis de regresión en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.....	106

Tabla 33.- Valores medios de las coordenadas cromáticas L*, a* y b* de los aceites y el correspondiente nivel de significación del análisis de regresión en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.....	108
Tabla 34.- Matriz de correlación entre las coordenadas cromáticas del espacio CieLab y la concentración de pigmentos clorofílicos y carotenoides de los aceites (coeficiente de correlación y nivel de significación).....	110
Tabla 35.- Valores medios del contenido de α -tocoferol (mg kg^{-1}) y de polifenoles totales (mg de ácido cafeico kg^{-1} de aceite), estabilidad (horas) e índice de amargor (K_{225}) de los aceites y el correspondiente nivel de significación del análisis de regresión en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.....	111
Tabla 36.- Análisis de regresión múltiple para la estabilidad.....	113
Tabla 37.- Análisis de regresión entre las variables polifenoles totales e índice de amargor.....	114
Tabla 38.- Puntuación global y atributos sensoriales de los aceites de la campaña 1999 en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.....	115
Tabla 39.- Sumario de los compuestos fenólicos identificados, tiempos de retención (TR) (min), valores medios y rango de concentraciones (mg kg^{-1}).....	117
Tabla 40.- Valores medios del contenido de los compuestos fenólicos (mg kg^{-1}) de los aceites y el correspondiente nivel de significación del análisis de regresión en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.....	120
Tabla 41.- Ecuaciones de regresión que muestran el efecto del tratamiento de riego (K_c) aplicado a los olivos sobre algunos compuestos fenólicos de los aceites.....	121
Tabla 42.- Efecto del tratamiento de riego (K_c) y de la fecha de muestreo sobre la actividad PAL ($\mu\text{mol g}^{-1}$ peso seco h^{-1}) en la pulpa de las olivas.....	123
Tabla 43.- Efecto del tratamiento de riego (K_c) y de la fecha de muestreo sobre el índice de madurez de las olivas.....	124
Tabla 44.- Efecto del tratamiento de riego (K_c) y de la fecha de muestreo sobre el contenido de polifenoles totales (g kg^{-1} peso seco) en la pulpa de las olivas...	126

Tabla 45.- Efecto del tratamiento de riego (K_c) y de la fecha de muestreo sobre la humedad (%) de la pulpa de las olivas.....	126
Tabla 46.- Efecto del tratamiento de riego (K_c) y de la fecha de muestreo sobre el contenido graso de la pulpa (% en base seca) de las olivas.....	128

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Localización de la zona geográfica amparada bajo la Denominación de Origen Protegida ‘Les Garrigues’.....	4
Figura 2.- Representación esquemática de la biosíntesis de los ácidos grasos.....	9
Figura 3.- Representación esquemática de las diversas clases de compuestos fenólicos originados a partir de la ruta del ácido siquímico.....	12
Figura 4.- Ruta biosintética propuesta para la oleuropeina.....	14
Figura 5.- Mapa de localización de la parcela experimental de Bovera en Cataluña.....	42
Figura 6.- Croquis de la parcela experimental de Bovera.....	46
Figura 7.- Mapa de localización de la parcela experimental de Seròs en Cataluña.....	48
Figura 8.- Croquis de la parcela experimental de Seròs.....	51
Figura 9.- Valores predichos frente a observados para la estabilidad (RDC).....	89
Figura 10.- Valores predichos frente a observados para la estabilidad (Riego lineal).....	114
Figura 11.- Cromatogramas (a 278 nm) de los extractos fenólicos del aceite de la variedad <i>Arbequina</i> de la campaña 1999.....	118

1.- INTRODUCCIÓN

El olivo, *Olea europaea* L., es la única especie de la familia botánica *Oleaceae* con fruto comestible. Se le considera como uno de los árboles más antiguos que ha cultivado el hombre. Tuvo su origen en la zona de Oriente Medio, conocida como el 'Fértil creciente', Mesopotamia, pasando después a Egipto, Asia Menor, Palestina y Grecia, desde donde se propagó por toda la cuenca del Mediterráneo. Con el descubrimiento de América pasó al Nuevo Mundo y en la actualidad, su cultivo se ha extendido a todos los continentes.

El patrimonio oleícola existente se estima en aproximadamente 750 millones de olivos, de los que el 95% se sitúa en los países de la cuenca mediterránea, ocupando una superficie de 8.2 millones de hectáreas de cultivo especializado (Civantos, 1999). La producción mundial de olivas, según datos de la FAO, se ha situado en el año 2000 por encima de los 13 millones de toneladas. De esta producción, aproximadamente un 90% se destina a la producción de aceite y el 10% restante se destina a aceituna de mesa. La industria oleícola mundial ha obtenido, en el año 2000, una producción cercana a los 2.5 millones de toneladas de aceite de oliva. Es de remarcar la aportación de España como principal país productor, muy por delante de otros países destacados como Italia y Grecia.

El olivar español es, de todos los cultivos arbóreos, el primero en extensión superficial, ocupando 2.2 millones de hectáreas, de las que más del 80% se encuentran en condiciones de secano (MAPA, 1999). Cataluña ocupa el cuarto lugar en importancia superficial y productiva, aunque a gran distancia de Andalucía, principal comunidad autónoma productora de aceite de oliva. La producción de aceite en Cataluña representa sólo un 3% del total del aceite producido en España, sin embargo, desde el punto de vista cualitativo, Cataluña ocupa un lugar destacado en la producción de aceite de oliva virgen. Las zonas de mayor concentración de olivar son las comarcas de Lleida y las comarcas de Tarragona. A efectos de producción y comercialización del aceite podemos distinguir tres zonas: las zonas de Siurana y Garrigues y la zona de las comarcas tarraconenses colindantes con el Ebro. En las dos primeras zonas cultivan principalmente olivas de la variedad *Arbequina* y elaboran aceites con Denominación de Origen, aceites de reconocida calidad que destacan por su carácter frutado y por su baja acidez.

La variedad *Arbequina* es la más extendida en Cataluña, cultivada en unas 50.000 ha, principalmente en la provincia de Lleida. Se cree que su nombre proviene del pueblo leridano de Arbeca que fue donde se inició el cultivo, hacia el siglo XVI. Se la conoce también con los nombres de *Arbequí* o *Arbequín*. Esta variedad tiene un gran interés por las buenas características sensoriales de sus aceites vírgenes y por su buen comportamiento agronómico. Se trata de un árbol rústico que tiene una elevada productividad, una rápida entrada en fructificación, escasa alternancia y un vigor reducido que permite aumentar las densidades de plantación. Se adapta a terrenos pobres y es resistente al frío. Es autofértil. Sus frutos tienen una

maduración escalonada y son de tamaño pequeño, con forma esférica y se presentan en racimos (Tous y col., 1999).

Tradicionalmente se ha considerado al olivo como un cultivo de secano debido a que es un árbol que dispone de suficientes mecanismos para adaptarse satisfactoriamente a las zonas áridas de la cuenca mediterránea. Sin embargo, no se ha de confundir esta resistencia a la sequía con el hecho de que el olivo responde favorablemente a aportaciones de agua complementarias a la lluvia, rentabilizando cualquier aportación de agua sobretodo en zonas y años de baja pluviometría (Solé Riera, 1990), a pesar de que sus requerimientos hídricos son considerablemente elevados (Girona, 1996).

Hasta hace muy poco tiempo solamente se regaba un porcentaje muy pequeño de las más de 2 millones de hectáreas que se dedican en España al olivar, tratándose en su mayoría de riegos de apoyo más o menos puntuales. En los últimos años han coincidido una serie de circunstancias entre las que destacan la subida del precio del aceite, la intensa sequía sufrida en las zonas productoras y la difusión de las técnicas de riego localizado (Orgaz y Fereres, 1998) que junto con la escasez de los recursos hídricos disponibles en la agricultura de la cuenca mediterránea española, han originado el interés hacia la determinación de los requerimientos hídricos del olivo mediante la aplicación de distintas fracciones de las necesidades hídricas totales a lo largo del año para estimar sus requerimientos óptimos con el fin de asegurar un uso eficiente del agua, y hacia el estudio de nuevas estrategias de riego tendentes a disminuir los aportes hídricos con el menor impacto posible en la producción y en la calidad de la cosecha.

En las propuestas de los Planes Hidrológicos de Cuenca, se recogen lo que se consideran las líneas generales de la política nacional de regadíos. Las prioridades, en orden decreciente, son: la consolidación de los regadíos infradotados, la mejora y modernización de los regadíos existentes, y las nuevas transformaciones en regadío. En este último punto destacan los riegos de apoyo para el olivar en las zonas de Garrigues-Sud, Segrià-Sud y el futuro margen izquierdo del canal Segarra-Garrigues, con dotaciones entre 100 y 250 mm anuales (Generalitat de Catalunya, 1999).

La aplicación de estrategias de riego deficitario controlado (RDC) (Mitchell y col., 1984) supondría una alternativa en situaciones como esta, en la que las dotaciones son insuficientes para cubrir la demanda hídrica de plantaciones intensivas de olivar. El RDC trata de adecuar los aportes hídricos al estado fisiológico del árbol y se basa en la idea de reducir los aportes hídricos en aquellos períodos fenológicos en los que un déficit hídrico controlado no afecta sensiblemente a la producción y calidad de la cosecha y de cubrir plenamente la demanda durante el resto del ciclo del cultivo. Es necesario verificar en condiciones locales los datos de la bibliografía antes de asumir unos determinados períodos críticos para la elaboración de estrategias de RDC en un cultivo concreto y en una zona determinada.

Resulta fundamental conocer la respuesta del olivo a dosis crecientes de agua así como al déficit hídrico, no sólo sobre la producción sino también sobre la calidad del producto, el aceite de oliva, que debe ser uno de los objetivos prioritarios del agricultor. El consumidor es un factor clave en el diseño de cualquier estrategia comercial. En los países desarrollados, el consumidor actual tiene por lo general cubiertas sus necesidades de alimentos en términos cuantitativos, centrandose sus preocupaciones en los atributos relacionados con el equilibrio nutricional, la imagen y la calidad. Asimismo, existe una creciente tendencia hacia el mayor cuidado de la salud, lo cual implica que se demanden cada vez más productos saludables y naturales. Gracias a las recientes investigaciones en el campo médico, bioquímico y de la nutrición, el aceite de oliva ha sido notablemente revalorizado y situado, por sus propiedades biológicas y sus características organolépticas, en una importante posición de la alimentación humana. Uno de los pilares en los que ha de sustentarse la supervivencia económica del sector es por tanto la calidad del aceite.

De hecho, el futuro de la agricultura y del mundo rural en el ámbito de la Unión Europea sitúa la calidad en el centro del proyecto que ha de conformar el futuro de la sociedad rural. Una de las actuaciones de la política alimentaria española se orienta hacia productos de alta calidad, que puedan satisfacer las crecientes exigencias de los consumidores y que, al mismo tiempo, supongan una mayor diversificación de la oferta alimentaria. Sobre el conjunto de esta oferta destaca un grupo de productos caracterizados por la relación directa de sus cualidades como alimentos con una zona determinada de producción y con particularidades técnicas de elaboración. Este grupo de productos constituye un valor estratégico que se ha venido reconociendo desde las administraciones públicas a través de las figuras de reconocimiento de calidad (Denominación de Origen Protegida, Indicaciones Geográficas Protegidas...).

La definición legal de Denominación de Origen, nombre de una región o lugar determinado, sirve para designar un producto agrícola o un producto alimenticio originario de dicha región o lugar y cuya calidad o características se deban fundamental o exclusivamente al medio geográfico, con sus factores naturales o humanos, y cuya producción, transformación y elaboración se realicen en la zona geográfica delimitada. Asimismo, constituye un vínculo sociocultural que reactualiza en el consumo de alimentos el conjunto de hábitos culturales de una sociedad localizada en un territorio (Tallarico, 2000). El presente estudio se localiza en la zona de producción amparada bajo la Denominación de Origen Protegida 'Les Garrigues', que corresponde a las comarcas de Les Garrigues, El Segrià y Urgell, situadas al sur de la provincia de Lleida (Figura 1). El área geográfica delimitada abarca una extensión de terreno de características topográficas y climáticas similares, de manera que el aceite de oliva producido es prácticamente homogéneo en cuanto a la influencia del medio físico, tal como pretende la reglamentación de las Denominaciones de Origen. El aceite de oliva virgen producido tiene unas características organolépticas muy peculiares, derivadas de la variedad del fruto de origen (cv *Arbequina*) y de su cuidada elaboración, que permiten mantener el grado de acidez del aceite por debajo de 0.5%. Es un aceite frutado, de oliva fresca, verde cuando proviene de una

cosecha más temprana, de color verde-amarillento, denso, con aroma limpio de hoja y hierba y sabor almendrado, ligeramente amargo y picante al final. A medida que la oliva madura, el color del aceite pasa a ser más amarillento, con el sabor algo más suave y más dulce. Esta calidad no se habría de ver en modo alguno comprometida ni modificada por la aplicación de riego a los olivos, dirigiéndose más bien las expectativas hacia una regularización de la producción y a una estandarización de la calidad, que se ve afectada de unos años a otros en función de las condiciones climáticas, especialmente en función de la pluviometría.



Figura 1.- Localización de la zona geográfica amparada bajo la Denominación de Origen Protegida 'Les Garrigues'.

2.1.- EL OLIVO

El olivo cultivado es un árbol de tamaño mediano, de unos 4 a 8 metros de altura, según la variedad. Puede permanecer vivo y productivo durante cientos de años. El tronco es grueso y la corteza de color gris a verde grisáceo. La copa es redondeada, aunque más o menos lobulada, la ramificación natural tiende a producir una copa bastante densa, pero las diversas prácticas de poda sirven para aclararlo y permitir la penetración de la luz.

El olivo es un árbol polimórfico, con fase juvenil y adulta. Las diferencias entre estas fases se manifiestan en la capacidad reproductiva, en el potencial para el enraizamiento y en diferencias morfológicas en hojas y ramos.

El olivo fructifica en ramos del año anterior. Por su parte, las hojas duran dos o tres años. Esto supone que la parte aérea del árbol está constituida por una estructura de sostén y almacenamiento y otra fotosintética, donde se localizan los procesos de asimilación de carbono y de crecimiento de brotes y reproductor.

2.1.1.- EL CICLO VEGETATIVO Y REPRODUCTOR DEL OLIVO

Tanto el crecimiento de brotes como el desarrollo de frutos son fenómenos cíclicos en el olivo. Ambos se repiten con carácter anual, pero mientras el crecimiento de brotes se completa dentro del mismo año, los procesos que conducen a la fructificación requieren dos estaciones consecutivas. En la primera tiene lugar la formación de las yemas y su inducción floral. Tras el reposo, en la segunda, tienen lugar el desarrollo de las flores, la floración y el crecimiento y desarrollo de los frutos que concluye con su maduración.

Las yemas vegetativas brotan al final de marzo, algo más tarde que las yemas florales. El flujo de crecimiento vegetativo de primavera, que es el más importante, dura aproximadamente hasta mitad de julio. Un segundo flujo puede ocurrir entre septiembre y mitad de octubre, cuando llueve a comienzos de otoño o cuando el cultivar es de regadío. El crecimiento de brotes está muy afectado por la cosecha presente, ya que los frutos acaparan la mayor parte de los asimilados de la planta.

En las axilas de las hojas de los brotes en crecimiento se forman yemas. El destino de éstas, floral o vegetativo, depende probablemente de los estímulos que reciben desde mediados de junio hasta finales de octubre. El proceso por el que las yemas experimentan cambios fisiológicos que conducen a la formación de yemas de flor se llama inducción floral. El fruto en desarrollo representa un factor inhibitor de la inducción floral.

Se denomina iniciación floral a la modificación de la condición de una yema tras la inducción floral que se percibe por cambios histoquímicos o morfológicos. Por su parte, la latencia se

define como la ausencia de crecimiento visible en cualquier estructura que contiene un meristemo, en este caso la yema. Se reconocen dos causas fundamentales de latencia a partir de la mitad de otoño. Una es endógena y consiste en la incapacidad de la propia estructura para crecer aunque las condiciones ambientales sean favorables al crecimiento. La segunda se debe a condiciones ambientales desfavorables que impiden el crecimiento en el meristemo de las yemas.

La brotación de las yemas de flor inicia el crecimiento y desarrollo de las inflorescencias y de las flores. Estos procesos avanzan secuencialmente y sin pausa hasta la floración, durante la cual tiene lugar la polinización, es decir, la transferencia de polen desde las anteras de la flor donante al estigma de la flor receptora. Una vez tiene lugar la fecundación de uno de los cuatro primordios seminales del ovario, éste inicia su crecimiento.

Desde la fecundación hasta su madurez el fruto atraviesa una serie de etapas. Desde el punto de vista cuantitativo el crecimiento de la oliva se ajusta a una doble sigmoide. Durante la primera fase de crecimiento contribuyen al aumento de tamaño tanto la división como la expansión celulares. Esta fase concluye aproximadamente con el final de la esclerificación o endurecimiento del endocarpo. Tras un período durante el cual el crecimiento se ralentiza o se detiene, el fruto experimenta un nuevo incremento de tamaño, en cuya fase final ocurre el enverado o cambio de color de la epidermis que determina el comienzo de la maduración.

2.2.- LA OLIVA

La oliva es un fruto de forma elipsoidal a globosa, su tamaño oscila normalmente entre 1 y 4 cm de longitud y 0.6 a 2 cm de diámetro. Botánicamente la oliva es una drupa, un fruto de pulpa carnosa que contiene un solo hueso. Está formada por tres tejidos principales: endocarpo, mesocarpo y exocarpo. El endocarpo es el hueso, el mesocarpo la pulpa o carne, y el exocarpo la piel o capa externa. El conjunto de estos tres tejidos recibe el nombre de pericarpo y tiene su origen en la pared del ovario. Los tejidos del fruto se desarrollan del ovario por los procesos de división, expansión y diferenciación celular, a partir de la fecundación y el cuajado inicial.

El endocarpo es la parte leñosa de la oliva y contiene la semilla. Comienza a crecer a partir de la fecundación y aumenta de tamaño los dos meses siguientes. En el estado maduro el endocarpo está totalmente compuesto por células esclerificadas, las cuales deben su dureza a la deposición de una doble pared secundaria con alto contenido en lignina.

El mesocarpo es un tejido carnoso que comienza a desarrollarse a partir de la fecundación y que sigue creciendo hasta la maduración. Sus células son parenquimáticas, poco diferenciadas, pero con una gran capacidad de crecimiento. Desde el interior al exterior del mesocarpo existe un

creciente aumento del tamaño celular. El almacenamiento de aceite se realiza en las vacuolas de las células parenquimáticas del mesocarpo.

El exocarpo o epicarpo es la capa exterior y más fina del fruto. Este tejido está compuesto por la epidermis y su cutícula. La cutícula es fina en la época de floración y polinización, cuando el ovario se encuentra todavía protegido por los pétalos, pero rápidamente se desarrolla para formar una gruesa capa protectora.

Cuando la oliva está completamente desarrollada, la pulpa representa un 70-90%, el hueso un 9-27% y la semilla un 2-3% del peso total del fruto. La composición del fruto varía en función de la variedad, y dentro de una misma variedad en función del estado de desarrollo y madurez del fruto. Los componentes mayoritarios de la pulpa y de la semilla son el agua y el aceite, le siguen en importancia los azúcares y polisacáridos. En la pulpa, los azúcares más importantes son los reductores destacando la glucosa, seguida de fructosa y sacarosa. Entre los polisacáridos se encuentran fundamentalmente celulosa, lignina y hemicelulosa. Relacionado igualmente con la textura de los frutos se encuentran las sustancias pécticas. En el hueso, la celulosa y otros hidratos de carbono son los componentes mayoritarios. En la semilla el contenido de proteínas es más elevado que en la pulpa. Por último, como componente mayoritario de la pulpa se encuentran los compuestos fenólicos (Fernández, 1971).

Tabla 1.- Composición química de las principales partes de la oliva (% en peso).

	Pulpa	Hueso	Semilla
Agua	50-60	9.3	30
Aceite	15-30	0.7	27.3
Azúcares	3-7.5	41	26.6
Celulosa	3-6	38	1.9
Materia nitrogenada	2-5	3.4	10.2
Cenizas	1-2	4.1	1.5
Polifenoles	2-2.5	0.1	1-1.5
Indeterminados		3.4	2.4

Fuente: Maestro Durán y Borja (1990)

2.3.- BIOSÍNTESIS DE LÍPIDOS EN LA OLIVA

El precursor en la síntesis de los ácidos grasos, el acetyl-CoA, es producto del metabolismo de los azúcares en el fruto, existiendo una correlación negativa entre el contenido graso de la pulpa y el contenido de azúcares reductores de la misma a lo largo del desarrollo y maduración de la oliva (Sánchez y col., 1991). Sin embargo, la acumulación de aceite en la pulpa de la oliva no se puede justificar tan solo basándose en los cambios en el contenido de azúcares (Wodner y col.,

1988), sino que otros factores como la presencia de los ácidos málico y cítrico deberían ser considerados en la biosíntesis de lípidos (Patumi y col., 1990).

Diversos estudios han establecido la existencia de dos posibles rutas en la síntesis del acetil-CoA. La primera conllevaría la degradación de azúcares de seis átomos de carbono vía glicolisis por acción del enzima piruvato deshidrogenasa localizado en el plastidio. La vía alternativa consistiría en la producción de acetil-CoA por acción de un enzima piruvato deshidrogenasa mitocondrial, seguido por el transporte del acetato libre al plastidio donde sería transformado en acetil-CoA por acción del enzima acetil-CoA sintasa (Ohlrogge y Browse, 1995). La contribución relativa de estas dos vías en la biosíntesis de los ácidos grasos no ha sido todavía estudiada en la oliva, sin embargo, su capacidad para incorporar tanto acetato como piruvato ha sido demostrada, sugiriendo que cualquiera de las dos vías puede ser operativa en la pulpa de este fruto (del Cuvillo, 1994).

La síntesis “de novo” de los ácidos grasos es un proceso que tiene lugar en los plastidios y necesita la actividad conjunta de dos enzimas, acetil-CoA carboxilasa y el sistema enzimático ácido graso sintetasa (KAS) (Figura 2). La primera cataliza la condensación, con consumo de ATP, de una molécula de bicarbonato y de una molécula de acetil-CoA para producir malonil-CoA, que es el intermediario clave en la síntesis de ácidos grasos. Antes de entrar en la ruta de síntesis, el grupo malonil es transferido del CoA a un factor proteico (ACP, proteína transportadora de acilos) por el enzima malonil transacilasa.

El sistema enzimático ácido graso sintetasa que cataliza la síntesis de ácidos grasos de cadena larga saturada a partir de acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH, puede ser considerado como un complejo disociable de tipo II en el cual las proteínas que catalizan las diferentes reacciones parciales pueden ser aisladas y purificadas. Estos enzimas son β -acilsintasas I, II y III (KAS I, II y III). La primera condensación de acetil-CoA y malonil-ACP para formar un producto de cuatro átomos de carbono está catalizada por KAS III. Las siguientes condensaciones están catalizadas por KAS I, que a diferencia de KAS III utiliza acil-ACPs como sustratos iniciales en vez de acetil-CoA. El producto final es palmitil-ACP. Este compuesto puede ser elongado a estearil-ACP en un ciclo posterior que conlleva la participación de KAS II. El producto final del complejo multienzimático ácido graso sintetasa es casi siempre una mezcla de palmitato y estearato. La relación entre ellos depende de la actividad de KAS II y está directamente relacionada con el grado de insaturación del producto oleoso final ya que el palmitato es el ácido graso saturado más abundante del aceite de oliva y los ácidos grasos de dieciocho átomos de carbono son prácticamente en su totalidad insaturados.

El proceso de elongación de los ácidos grasos termina con la liberación de los grupos acílicos de las proteínas transportadoras de acilos, mediante la acción de tioesterasas presentes en los plastidios o con su transferencia a lípidos complejos mediante aciltransferasas.

Los ácidos grasos insaturados se forman a partir de los ácidos palmítico y esteárico. En el estroma del plastidio se encuentra el enzima estearil-ACP $\Delta 9$ -desaturasa, lo que implica que el estearato no se acumula, siendo el oleato el principal producto en la formación de ácidos grasos. La importancia de este enzima puede deducirse de la elevada concentración de oleato en el aceite de oliva (Harwood, 1996). Desaturaciones posteriores del oleato para producir ácidos grasos poliinsaturados pueden tener lugar en el plastidio o en el retículo endoplasmático. En muchas plantas, incluyendo el olivo, la desaturación del oleato conlleva su transporte fuera del plastidio hacia el citosol. Los intermediarios acil-CoA son incorporados a la fosfatidilcolina en el retículo endoplasmático por la ruta Kennedy o pueden ser transferidos directamente. Las cadenas acílicas de oleato pueden ser posteriormente desaturadas a linoleato y después a α -linolenato mediante $\Delta 12$ y $\Delta 15$ -desaturasas (Harwood, 1996).

La acumulación de aceite en la oliva tiene lugar paralelamente al ensanchamiento activo de las células del pericarpio. Se segregan pequeñas gotas de aceite en los extremos del retículo endoplasmático que se fusionan seguidamente para formar gotas mayores que son impulsadas hacia la vacuola y se incorporan lentamente a ella. La curva que representa la pauta de acumulación de aceite en la oliva es una sigmoidea que permite distinguir tres fases. Una fase de acumulación lenta de aceite que caracteriza los frutos recién formados, una fase de acumulación rápida donde la cantidad de aceite aumenta rápida y linealmente, y una fase de ralentización de la síntesis lipídica caracterizada por una tasa casi estable de materia grasa (Lavee y Wodner, 1991; Zarrouk y col., 1996; Alegre, 2001). Esta última fase estacionaria, favorable para una buena recolección cualitativa y cuantitativa, abarca unas cuatro semanas y precede al fenómeno de sobremaduración de la oliva.

Diversos factores, entre ellos la luz y la disponibilidad de agua por parte del cultivo, pueden influir en la biosíntesis de lípidos en la oliva. Estudios realizados por Ortega (1962) mostraron que el rendimiento en aceite del olivo está relacionado con la posición de los frutos en la cubierta del árbol, observándose una mayor acumulación de aceite en aquellas olivas situadas en las zonas superiores de la cubierta, que recibían una mayor irradiación. En relación con la disponibilidad de agua por parte del cultivo, cabe destacar que el carácter lineal del proceso de acumulación de aceite varía si los árboles se cultivan en condiciones limitantes y si se producen períodos de sequía durante el desarrollo del fruto, observándose un retraso en el proceso de acumulación de aceite (Lavee y Wodner, 1991; Pastor y col., 1996).

2.4.- BIOSÍNTESIS DE COMPUESTOS FENÓLICOS

Los compuestos fenólicos de las plantas forman un extenso grupo de sustancias, habiéndose descrito varios miles hace ya dos décadas (Harborne, 1980). Con el término “compuesto fenólico” hacemos referencia a aquellas sustancias que poseen uno o más sustituyentes OH unidos a un anillo aromático. Los compuestos que tienen varios sustituyentes hidroxilos de

carácter fenólico son normalmente denominados polifenoles. Estos compuestos se pueden agrupar en función del número de átomos de carbono presentes en su esqueleto (Tabla 2).

Tabla 2.- Las principales clases de compuestos fenólicos en las plantas

Nº de Carbonos	Esqueleto básico	Denominación
6	C ₆	Fenoles
7	C ₆ -C ₁	Hidroxibenzoatos
8	C ₆ -C ₂	Acetofenonas Fenilacetatos
9	C ₆ -C ₃	Hidroxicinamatos Fenilpropenos Cumarinas Isocumarinas Cromonas
10	C ₆ -C ₄	Naftoquinonas
13	C ₆ -C ₁ -C ₆	Xantonas
14	C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenos Antraquinonas
15	C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonoides
18	(C ₆ -C ₃) ₂	Lignanós Neolignanós
30	(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonoides
n	(C ₆) _n (C ₆ -C ₁) _n :Glc (C ₆ -C ₃) _n (C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Catecol melaninas Taninos hidrolizables Ligninas Taninos condensados

Fuente: Strack (1997)

Todos estos compuestos, excepto flavonoides y estilbenos, provienen de un intermediario biosintético común, L-fenilalanina, o su precursor inmediato, el ácido siquímico. En el caso de los flavonoides, uno de sus anillos aromáticos y la cadena lateral de tres átomos de carbono proviene de la L-fenilalanina, mientras que el resto proviene del acetyl-CoA, por la ruta policétida.

2.4.1.- LA RUTA DEL ÁCIDO SIQUÍMICO

Los componentes esenciales implicados en la ruta del ácido siquímico son eritrosa-4-fosfato y fosfoenol piruvato. Estos dos compuestos se unen mediante una serie de reacciones dando lugar al ácido siquímico. La adición de otra molécula de fosfoenol piruvato conduce a la formación de del ácido corísmico y es en este momento en el que la ruta se bifurca en una dirección hacia el

aminoácido L-triptófano y en la otra hacia L-tirosina y L-fenilalanina (Figura 3). La transición de fenilalanina a hidroxicinamatos es definida como “metabolismo general fenilpropanoide”. Los enzimas que catalizan las reacciones parciales de esta ruta son tres: fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5), cinamato-4-hidroxilasa (C4H, EC 1.14.13.11) y hidroxicinamato CoA ligasa (EC 6.2.1.12).

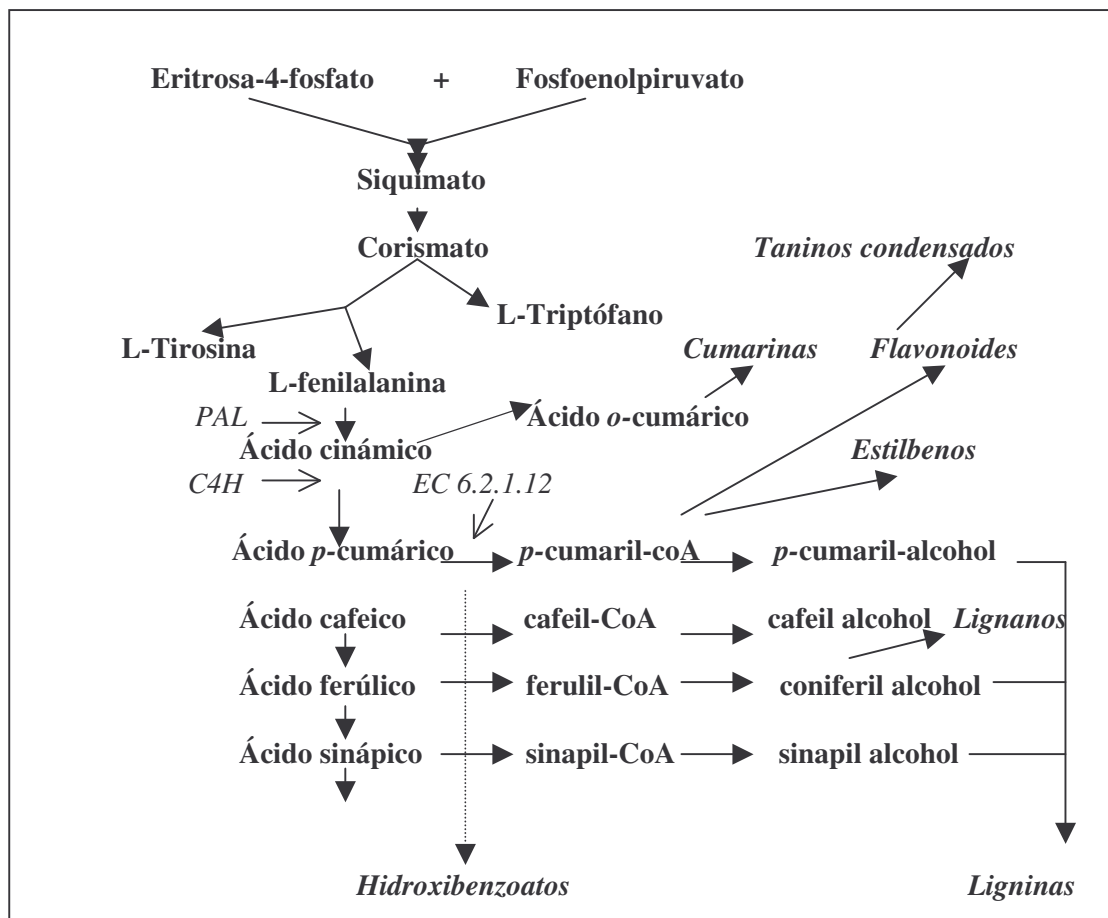


Figura 3.- Representación esquemática de las diversas clases de compuestos fenólicos originados a partir de la ruta del ácido siquímico.

El enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5), clave en la biosíntesis de los compuestos fenólicos, cataliza la desaminación no oxidativa de la L-fenilalanina para formar ácido *trans*-cinámico y fue descrito por primera vez en *Hordeum vulgare* (Koukol y Conn, 1961).

El enzima cinamato-4-hidroxilasa (C4H, EC 1.14.13.11) responsable de la conversión del ácido *trans*-cinámico a ácido *p*-hidroxicinámico, fue caracterizado por primera vez en *Pisum sativum* (Russel y Conn, 1967). Esta reacción requiere oxígeno y NADPH. La hidroxilación en posición orto lleva a la formación de ácido *o*-cumárico, un precursor en la biosíntesis de las cumarinas.

El enzima hidroxicinamato CoA ligasa (EC 6.2.1.12) permite la formación de CoA ésteres de ácidos hidroxicinámicos en presencia de CoA, ATP y en la mayoría de los casos de iones Mg^{2+} . Los CoA ésteres de ácidos hidroxicinámicos tienen un importante papel en la biosíntesis de varios grupos de compuestos fenólicos mediante cuatro tipos de reacciones:

- Condensación mediante el alargamiento de la cadena lateral con moléculas de malonil-CoA. Por ejemplo reacciones secuenciales con tres moléculas de malonil-CoA conducen a la síntesis de flavonoides.
- Degradación. Por eliminación de una unidad de acetato se obtienen hidroxibenzoatos.
- Reducción. Reacción dependiente de NADPH que lleva a la formación de los precursores de ligninas y lignanos, los hidroxicinamil alcoholes.
- Conjugación. Normalmente se trata de una condensación de varios compuestos monoméricos o oligoméricos. La parte conjugada puede ser un carbohidrato, una proteína, un lípido, un aminoácido, una amina, un ácido carboxílico, un terpenoide, un alcaloide o un flavonoide. La síntesis de verbascósido sería un ejemplo de este tipo de reacción y ha sido identificado en oliva como el principal derivado cafeico (Fleuriet y col., 1984). Se trata de un cafeil disacárido unido por enlace éster a una molécula de dihidroxifeniletanol.

2.4.2.- LA RUTA DEL ÁCIDO MEVALÓNICO

Otro compuesto fenólico de gran importancia en el olivo y en el aceite de oliva es la oleuropeina. En 1960 fue caracterizada como un compuesto secoiridoide (Panizzi y col., 1960). Los secoiridoidees son compuestos glucosídicos obtenidos a partir del metabolismo secundario de los terpenos, por la ruta del ácido mevalónico. Desde un punto de vista biogenético los secoiridoidees se pueden dividir en cuatro grupos, concretamente aquellos presentes en *Oleaceae* pertenecen al grupo oleósido, y se caracterizan por la combinación de ácido elenólico y un residuo glucosídico (Figura 4).

Macheix y col. (1990) agruparon este tipo de compuestos (oleuropeina, ligustrósido...) bajo el nombre genérico de derivados del feniletanol, caracterizándolos como compuestos cuyas moléculas contenían una estructura C_6-C_2 correspondiente o bien al 3,4-dihidroxifeniletanol o al 4-hidroxifeniletanol.

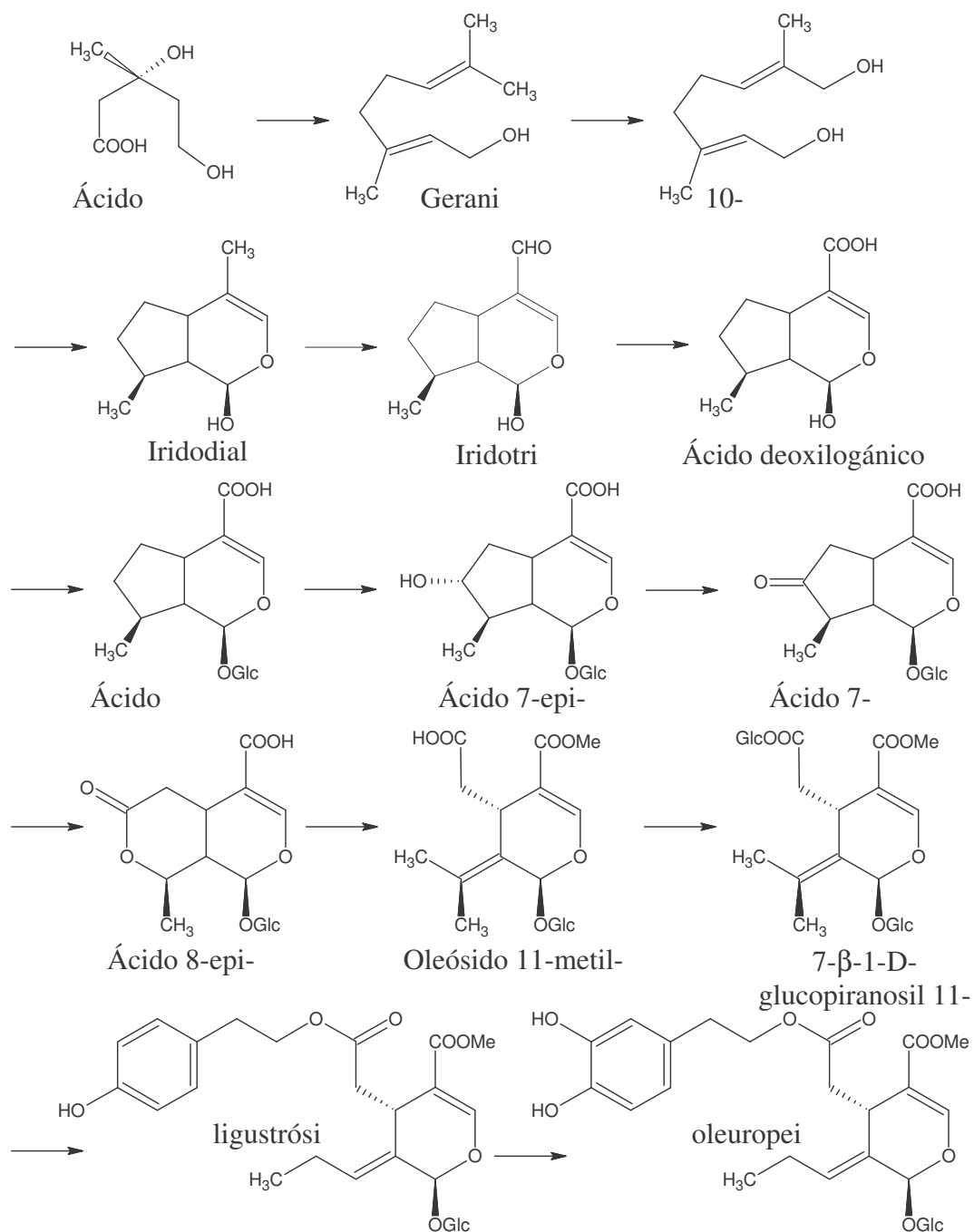


Figura 4– Ruta biosintética propuesta para la oleuropeina en *Oleaceae* (Damtoft y col., 1993).

2.4.3.- ENZIMA FENILALANINA AMONIO LIASA (PAL, EC 4.3.1.5)

La complejidad de la ruta biosintética de los compuestos fenólicos implica una dificultad en el estudio de la regulación en la acumulación de estas sustancias en los tejidos vegetales. Sin embargo, está ampliamente aceptado el importante papel que el enzima PAL juega en la síntesis de estos compuestos, habiéndose considerado el enzima clave en el metabolismo fenilpropanoide (Jones, 1984; Hahlbrock y Scheel, 1989).

La actividad del enzima PAL está estrechamente relacionada con el estado fisiológico o de desarrollo de la planta y se han observado importantes incrementos en los niveles de PAL asociados a la acumulación de antocianos, flavonoides y otros compuestos fenólicos en los tejidos de diversas especies vegetales como pera (Billot y col., 1978), uva (Kataoka y col., 1983), tomate (Fleuriet y Macheix, 1984), manzana (Arakawa y col., 1986), fresa (Given y col., 1988) o mandarina (Oufedjikh y col., 2000). Sin embargo, el aparente exceso de la actividad PAL en diversas especies vegetales, que permitiría una mayor síntesis de compuestos fenólicos, sugiere que aun siendo el enzima PAL esencial para la síntesis de compuestos fenólicos puede que no sea limitante. Actuaría como el factor clave que controla la canalización de la fenilalanina en la síntesis de fenilpropanoides de acuerdo con los requerimientos fisiológicos del fruto o material vegetal. La actividad de este enzima en la ruta fenilpropanoide, se encuentra asimismo coordinada con la actividad de otras enzimas involucradas en la síntesis de flavonoides y antocianos (Cheng y col., 1991; Lister y col., 1996).

Se han realizado numerosos estudios centrados en el efecto de diversos factores sobre el metabolismo fenólico a través de la monitorización del enzima PAL. Entre los múltiples factores estudiados podemos citar la luz, la temperatura, la irradiación y el estrés hídrico entre otros. Existen evidencias, a través del marcaje radioactivo, del fotocontrol de la síntesis del enzima PAL en células de perejil y del fotocontrol de la degradación del enzima en hojas de *Xanthium* (Smith y col., 1977). Se ha observado que hojas de plantas que han crecido en condiciones de muchas horas de luz contienen elevados niveles de fenoles solubles mientras que si son transferidas a condiciones de pocas horas de luz los niveles de PAL, así como la capacidad para acumular compuestos fenólicos disminuye rápidamente (Balsa y col., 1979). En uvas, Roubelakis y Kliewer (1986) observaron que cuando eran mantenidas en condiciones de oscuridad, la actividad PAL disminuía y no se observaba acumulación de antocianos. Kubo y col. (1988) reportaron que en cuatro variedades de manzanas estudiadas, si los frutos se cubrían con un film impermeable a las radiaciones UV, tanto la acumulación de antocianos como la actividad PAL eran inhibidas o reducidas. Los datos disponibles sobre la relación entre la luz y los compuestos fenólicos, concernientes especialmente a los antocianos y en menor grado a los flavonoides y a los derivados de los ácidos hidroxicinámicos, parecen indicar que la luz es un factor determinante en la acumulación de gran parte de los compuestos fenólicos en frutos y otras especies vegetales mediante, por una parte, la regulación debida a la contribución de las cadenas de carbono derivadas directamente de la fotosíntesis, y por otra parte y de una manera

más específica, mediante los enzimas del metabolismo fenólico, especialmente el enzima PAL (Macheix y col., 1990).

Las modificaciones de la actividad PAL en el transcurso de la aclimatación de las plantas a bajas temperaturas sugieren que el metabolismo fenilpropanoide podría tener un importante papel en la resistencia de las plantas a bajas temperaturas. Faragher (1983), en un estudio acerca de la acumulación de antocianos en la piel de manzanas concluía que la temperatura, junto con la luz, era un importante factor de regulación a través del efecto que ejercía sobre el nivel de actividad PAL. Asimismo, Chalker-Scott y Fuchigami (1989) observaron que la aclimatación de los manzanos a climas fríos estaba asociada a la acumulación estacional de ácido clorogénico. A partir de los resultados obtenidos al estudiar los cambios en la transcripción y en la actividad del enzima PAL en cítricos almacenados a temperaturas de 2 y 12 °C estos autores sugirieron que la transitoria inducción en la expresión del gen y en la actividad del enzima PAL podría ser parte de una rápida respuesta del tejido a las bajas temperaturas.

Trabajos realizados a cerca del efecto de la irradiación sobre el metabolismo de los compuestos fenólicos indican que este tipo de tratamientos, enfocados a alargar la vida útil del producto, causan un considerable incremento de la actividad PAL. En cítricos, la actividad PAL y los compuestos fenólicos aumentaron tras ser expuestos a irradiación por rayos catódicos (Chachin y col., 1974). En papaya y mango, la aplicación de radiación gamma conllevó un aumento en la actividad PAL y en la concentración de los compuestos fenólicos (Tan y Lam, 1985; Frylinck y col., 1987). Estudios en champiñones (Benoit y col., 2000) y en cítricos (Oufedjikh y col., 2000) mostraron igualmente que los tratamientos ionizantes estimulaban la actividad PAL y la síntesis de compuestos fenólicos.

Un factor ambiental capaz de influir en el metabolismo fenólico es la disponibilidad de agua. Se ha estudiado el efecto de la aplicación de diferentes niveles de riego a olivos sobre la actividad PAL de los frutos observándose una mayor actividad enzimática cuanto menor es el volumen de agua aplicada a los árboles (Patumi y col., 1998). Estos resultados estaban de acuerdo con los obtenidos por Kubota (1996) en melocotonero, en los que se evidenciaba que el metabolismo fenólico estaba afectado por la humedad del suelo. Estudios sobre el pardeamiento del pericarpio del lichi han mostrado que la pérdida de agua del fruto induce un aumento en la actividad PAL en el fruto almacenado a baja humedad relativa (Jiang y Fu, 1999). -Todos estos resultados experimentales son consistentes con la hipótesis de que el enzima PAL es un buen indicador del estrés ambiental en los tejidos de diversas plantas.

2.5.- LA FRACCIÓN FENÓLICA

En las últimas décadas se ha desencadenado un gran interés por los compuestos fenólicos de las plantas, habiendo aparecido diversas revisiones y monografías dedicadas a diferentes aspectos

de estos compuestos (Macheix y col., 1990; Leibovitz y Mueller., 1993; Antolovich y col., 2000; Parr y Bolwell, 2000; Soler y col., 2000).

En el caso concreto de la oliva, los compuestos fenólicos presentes en ella son reconocidos, entre otros aspectos, por su actividad antimicrobiana (Fleming y col., 1973; Mahjoub y Bullerman, 1987; Tranter y col., 1993; Tassou y Nychas, 1995; Aziz y col., 1998), por sus propiedades molusquicidas (Kubo y Matsumoto, 1984), por su papel preventivo en las infecciones por *Dacus oleae* (Lo Scalzo y col., 1994) y por su inhibición de celulasa producida por *Basidiomicetos* y de enzimas celulolíticos de la propia oliva (Heredia y col., 1990). Basándose en este amplio espectro de actuación, los compuestos fenólicos son considerados por algunos autores como una parte importante del sistema químico de defensa del fruto del olivo. Otra función de un grupo de compuestos fenólicos presentes en la oliva, los flavonoides, en virtud de su espectro de absorción, es limitar los efectos de la luz UV y el consecuente daño oxidativo (Galli y Visioli, 1999).

Respecto a la calidad del fruto, la adquisición del color en la oliva es debida a la formación de antocianinas, y determinados atributos sensoriales, como el amargor, están asociados a la presencia de compuestos fenólicos. La oliva posee de forma natural un carácter amargo muy intenso que la hace inadecuada para el consumo sin un tratamiento previo. El principio amargo más importante es el secoiridoide glucósido oleuropeina. La oleuropeina aglicona probablemente es también amarga, mientras que los otros dos productos de degradación, el ácido elenólico y el hidroxitirosol, son juzgados como no amargos (Walter y col., 1973).

Los compuestos fenólicos de la oliva han atraído también la atención como agentes antioxidantes, habiendo mostrado su actividad en estudios 'in vitro' e 'in vivo' en animales de experimentación (de Pasquale y col., 1991; Le Tutour y Guedon, 1992; Capasso y col., 1993; Pennachio y col., 1996).

El aceite de oliva virgen se extrae mediante procedimientos físicos a partir de las olivas maduras. Por lo tanto, los compuestos responsables de las propiedades antioxidantes y de las cualidades organolépticas son transferidos, al menos en parte, al aceite. La presencia de compuestos fenólicos confiere al aceite de oliva una particular resistencia al desarrollo de la rancidez. Numerosos autores han puesto en evidencia la relación entre el contenido de compuestos fenólicos del aceite y su estabilidad frente a la oxidación (Vázquez y col., 1973; Gutfinger, 1981; Papadopoulos y Boskou, 1991; Tsimidou y col., 1992b; Baldioli y col., 1996).

El atributo amargo es una de las peculiaridades del aceite de oliva y su intensidad influye en su aceptación por parte del consumidor. Los principales componentes responsables de los atributos amargo y picante son compuestos fenólicos derivados de los secoiridoide glucósidos presentes en la oliva (Montedoro y col., 1992a; Angerosa y col., 2000).

En relación con los efectos biológicos de los compuestos fenólicos del aceite de oliva, se ha especulado sobre la posibilidad de que actúen igualmente como antioxidantes, evitando la oxidación de lípidos dentro de las arterias y evitando la acumulación de lipoproteínas de baja densidad oxidadas en las paredes de las arterias, una de las principales causas de enfermedades coronarias (Grignaffini y col., 1994; Petroni y col., 1995; Wiseman y col., 1996; Caruso y col., 1999).

2.5.1.- COMPUESTOS FENÓLICOS EN LA OLIVA

La oleuropeína, aislada de las hojas de olivo a principios del siglo XX por Bourquelot y Vintilesco (1908), es el componente fenólico más abundante y característico del fruto del olivo. Panizzi y col. (1960) establecieron que se trataba de un éster heterosídico del ácido elenólico y del hidroxitirosol. En 1974 Inouye y col. confirmaron su estructura por espectrometría de masas.

Un compuesto similar fue aislado en olivas maduras por Ragazzi y col. (1973) e identificado como demetiloleuropeína. En 1984 Kubo y Matsumoto aislaron de la pulpa de la oliva el secoiridoide ligustrósido, un éster heterosídico al igual que la oleuropeína, pero en su estructura está presente el tirosol en lugar del hidroxitirosol.

De los compuestos derivados del ácido hidroxicinámico, verbascósido es el más importante (Fleuret y col., 1984). Es un éster heterosídico del ácido cafeico y el hidroxitirosol. Otro derivado del ácido hidroxicinámico identificado en oliva es 1-cafeil-glucosa (Vázquez-Roncero y col., 1974).

Bianco y col. (1993) han descrito la presencia del compuesto fenólico cornósido, que parece estar relacionado con la molécula oxifeniletanol presente en oleuropeína y ligustrósido, y que puede ser fácilmente transformado en haloridona, también determinado este último por Bianchi y Pozzi (1994), los cuales han indicado asimismo la presencia de 3,4-dihidroxifenilglicol como el principal compuesto fenólico de estructura C₆-C₂ en el fruto de algunas variedades de olivo. Se ha determinado también la presencia en la oliva de glucósidos del hidroxitirosol (Vázquez-Roncero y col., 1974; Bianco y col., 1998).

A demás de estos compuestos fenólicos característicos de la oliva, el fruto contiene otros compuestos y algunos productos obtenidos de la hidrólisis de los precursores mencionados anteriormente. Han sido determinados los fenoles simples hidroxitirosol y tirosol, los derivados del ácido hidroxibenzoico, vainillina y ácidos *p*-hidroxibenzoico y vainílico, y los derivados del ácido hidroxicinámico, ácidos cafeico y *p*-cumárico (Brenes y col., 1992; Romani y col., 1999; Servili y col., 1999).

Los flavonoides también están presentes en la oliva, habiendo sido identificados luteolina-7-glucósido, luteolina-5-glucósido, apigenina-7-glucósido, apigenina-7-rutinósido y quercetin-3-

rutinósido (Vázquez-Roncero y col., 1974; Amiot y col., 1986; Vlahov, 1992; Esti y col., 1998; Romani y col., 1999; Servili y col., 1999).

Las antocianinas presentes en mayor proporción en las olivas maduras son cianidina-3-glucósido y cianidina-3-rutinósido (Vázquez-Roncero y Maestro-Durán, 1970; Romani y col., 1999). En 1976 Maestro-Durán y Vázquez-Roncero estudiaron la presencia de pigmentos antociánicos en la variedad *Manzanilla* e identificaron cianidina-3-rutinósido acilado al ácido cafeico y tres triósidos, cianidina-3-glucosilrutinosido linear, ramificado y un derivado acilado al ácido cafeico.

En la semilla del olivo se han descrito una serie de glucósidos secoiridoides de estructura muy parecida entre sí, formados exclusivamente por glucosa, ácido elenólico y tirosol. De ellos se ha establecido la estructura de uno que coincide con la de la nüzhenido, y otro que coincide con el salidrósido (León, 1990). Servili y col. (1999) han caracterizado por técnicas espectroscópicas el compuesto nüzhenido en la semilla de la oliva y han detectado asimismo la presencia de un derivado secoiridoide, la forma dialdehídica del ácido elenólico unido al hidroxitirosol.

2.6.- COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL ACEITE DE OLIVA

La Comunidad Económica Europea estableció en el Reglamento del Consejo 136/66 las denominaciones y definiciones de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva, comercializados dentro de cada estado miembro, así como en los intercambios intracomunitarios y con terceros países. Haciendo un resumen de las denominaciones y definiciones aplicables al aceite de oliva podemos decir que sólo se considera aceite de oliva al aceite que procede exclusivamente del tratamiento de las aceitunas, con exclusión del aceite de oliva reesterificado o sintetizado y cualquier mezcla de aceite de oliva con aceites de otra naturaleza. Se consideran aceites de oliva vírgenes a los obtenidos del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos u otros procedimientos físicos, en condiciones, sobretudoo térmicas, que no impliquen la alteración del aceite, y que no hayan sufrido tratamiento alguno distinto del lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado.

Con fecha 5 de septiembre de 1991, el diario Oficial de las Comunidades Europeas, publica el Reglamento 2568/91, en el que se fijan las características que definen cada tipo de aceite y establece los métodos comunitarios de análisis químico y de valoración organoléptica que se deben aplicar de manera uniforme en toda la Comunidad. Las características físico-químicas de los distintos tipos de aceite de oliva se recogen en un cuadro que figura como Anexo I al Reglamento 2568/91. Todos los aceites de oliva vírgenes han de tener unas características comunes, así, la composición acídica y esterólica debe corresponder al aceite de oliva. Respecto al perfil de ácidos grasos, se exigen unos porcentajes máximos de 0.1, 0.9, 0.7, 0.5, 0.3 y 0.5% para los ácidos mirístico, linolénico, araquídico, icosanoico, behénico y lignocérico,

respectivamente, salvo excepciones que son publicadas en la reglamentación. Por otra parte, el contenido de ácidos grasos saturados en posición 2 de los triglicéridos será inferior al 1.3%, la trilinoleína se encontrará en una proporción máxima de 0.5 y el contenido de alcoholes alifáticos será de 400 mg kg⁻¹ como máximo.

En cuanto al contenido en esteroides ha de ser como mínimo 1 mg kg⁻¹ de aceite y su perfil debe cumplir una serie de requisitos. Como mínimo un 93% del contenido total de esteroides debe ser β -sitosterol, el resto de esteroides, eritrodiool + uvaol, colesterol, brassicasterol, campesterol y Δ -estigmasterol deben estar en unas proporciones máximas de 4.5, 0.5, 0.2, 4.0 y 0.5% respectivamente. Además, el contenido en estigmasterol debe ser siempre inferior al de campesterol

Una vez definidas las características comunes a todos los aceites de oliva vírgenes, se clasifican en cuatro categorías comerciales:

- aceite de oliva virgen extra
- aceite de oliva virgen
- aceite de oliva virgen corriente
- aceite de oliva virgen lampante

Los tres primeros son aptos para el consumo directo, pero normalmente sólo el aceite virgen extra y el aceite virgen se destinan para el consumo directo. El aceite de oliva virgen corriente suele ser utilizado para la fabricación de aceite de oliva refinado. Su calidad viene definida por dos aspectos fundamentales, la valoración organoléptica y los índices físico-químicos de calidad.

Tabla 3.- Parámetros de calidad de los aceites de oliva vírgenes

Categoría	Acidez (%)	Índice de peróxidos (meq O ₂ kg ⁻¹)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	Δ K	Panel test
1. Aceite de oliva virgen extra	< 1.0	< 20	< 2.40	< 0.20	< 0.010	≥ 6.5
2. Aceite de oliva virgen	< 2.0	< 20	< 2.50	< 0.25	< 0.010	≥ 5.5
3. Aceite de oliva virgen corriente	< 3.3	< 20	< 2.50	< 0.25	< 0.010	≥ 3.5
4. Aceite de oliva virgen lampante	> 3.3	> 20	> 3.70	> 0.25	-	< 3.5

Fuente: Reglamento CEE 2568/91

Podemos dividir los compuestos químicos del aceite de oliva en dos grandes grupos: fracción saponificable y fracción insaponificable.

2.6.1.- FRACCIÓN SAPONIFICABLE

Representa entre el 98.5% y el 99.5% del peso del aceite de oliva. Está formado principalmente por glicéridos, diferenciándose entre ellos por los ácidos grasos que los forman y por el número de grupos alcohol de la glicerina que se han unido a ácidos grasos. Los mono y diglicéridos se encuentran en pequeña cantidad, 0.2% y 1.3% sobre ácidos grasos totales respectivamente, así como fosfátidos y algunos ácidos libres, constituyendo los triglicéridos el grupo mayoritario. La composición de ácidos grasos característica del aceite de oliva se detalla en la tabla 4.

Tabla 4.- Composición de ácidos grasos del aceite de oliva expresado en porcentaje.

Ácidos grasos		Límites (%)
Mirístico	C _{14:0}	0.0 - 0.1
Palmítico	C _{16:0}	7.5 - 20.0
Palmitoleico	C _{16:1}	0.3 - 3.5
Heptadecanoico	C _{17:0}	0.0 - 0.5
Heptadecenoico	C _{17:1}	0.0 - 0.6
Estearico	C _{18:0}	0.5 - 5.0
Oleico	C _{18:1}	55.0 - 83.0
Linoleico	C _{18:2}	3.5 - 21.0
Linolénico	C _{18:3}	0.0 - 1.5
Araquídico	C _{20:0}	0.0 - 0.8
Eicosanoico	C _{20:1}	no especificado
Behénico	C _{22:0}	0.0 - 0.2
Lignocérico	C _{24:0}	0.0 - 1.0

Fuente: Comisión del Codex Alimentarius (1993)

La composición en ácidos grasos del aceite de oliva varía ligeramente dependiendo de la variedad y del grado de madurez de las olivas, así como de las condiciones climáticas y la latitud. Debido en parte a la evolución en la noción de calidad y a la necesidad de aumentar el valor añadido del producto, ha crecido el interés en el estudio de las características químicas del aceite de oliva en función de su origen, entendido como conjunto de factores (cultivar, zona de producción, técnicas agronómicas, época de recogida...) que confluyen en la caracterización del mismo. El perfil de ácidos grasos del aceite, así como la composición en triglicéridos han sido utilizados por numerosos autores como parámetros de clasificación geográfica del aceite.

De hecho, los estudios realizados en torno a los ácidos grasos del aceite de oliva se centran en la posibilidad de utilizarlos como parámetros clasificatorios o distintivos de los aceites de oliva de diferentes zonas de procedencia. Por orden cronológico podemos citar a Forina y Tiscornia (1982) que aplicaron técnicas de análisis discriminante para clasificar aceites de oliva italianos en función de su región de origen, partiendo del análisis de la fracción de ácidos grasos. Derde y col. (1984) utilizaron el método SIMCA para clasificar aceites de dos regiones de Italia a partir de siete ácidos grasos. Sarrion y col. (1986) y Forcadell y col. (1988) clasificaron muestras de aceite de oliva de dos Denominaciones de Origen catalanas mediante análisis discriminante. Tsimidou y col. (1987) fueron capaces de separar aceites de oliva procedentes de dos zonas de Grecia en función de los ácidos grasos y de la composición en triglicéridos. Graciani (1987) estudió la caracterización de los aceites de oliva españoles en función del cultivar y de la zona de procedencia mediante el análisis de los triglicéridos. Alonso y Aparicio (1993) estudiaron la posibilidad de discriminación entre los aceites de oliva virgen procedentes de diferentes regiones de España, Italia y Portugal en base a su perfil ácido. Tsimidou y Karakostas (1993) aplicaron técnicas de análisis multivariante al perfil de ácidos grasos de aceites de oliva griegos procedentes de 10 zonas y obtenidos durante 24 campañas y Lanza y col. (1998) clasificaron aceites de oliva producidos en diferentes áreas de Sicilia en base a la composición ácida. Motilva y col. (2001) analizaron el perfil de ácidos grasos de 190 muestras de aceite de oliva virgen de la Denominación de Origen Protegida Les Garrigues (Lleida) durante tres campañas consecutivas, permitiendo en base a la representación de los aceites según sus componentes principales, la separación de aceites procedentes de dos subzonas con diferencias agroclimáticas.

Una de las razones básicas por las cuales el aceite de oliva es considerado un alimento cardiosaludable es su composición en ácidos grasos, siendo la principal característica su riqueza en ácido oleico ($C_{18:1}$). El papel de los ácidos grasos monoinsaturados en el metabolismo del colesterol ha sido planteado principalmente a partir de los estudios epidemiológicos de Keys sobre la influencia de dicho aceite en la salud humana, que fueron publicados el año 1986 como “El estudio sobre los 7 países”. Durante mucho tiempo el ácido oleico había estado considerado como neutro en relación al colesterol sanguíneo. Esta opinión fue revisada a la luz de diversos trabajos experimentales. Para resumir estos estudios se puede decir que si se compara una dieta rica en grasas saturadas, la dieta monoinsaturada reduce el colesterol total y el colesterol de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y no afecta al colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) responsables del transporte del colesterol sanguíneo al hígado para su posterior metabolismo. Si se compara con una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados, la dieta rica en monoinsaturados tiene el mismo efecto sobre el colesterol total y el colesterol de las LDL pero aumenta el colesterol HDL. En todos los casos considerados, el aceite de oliva aporta un resultado más satisfactorio (Jacotot, 1994).

Otra cuestión importante es el contenido en ácido linoleico, ácido graso poliinsaturado con dos enlaces dobles, de ellos, el más próximo al extremo metílico de la molécula está situado entre los carbonos 6 y 7. El organismo animal es incapaz de introducir enlaces dobles en esta posición, razón por la cual el ácido linoleico es indispensable para la nutrición humana.

2.6.2.- FRACCIÓN INSAPONIFICABLE

Es difícil determinar de forma precisa la totalidad de los constituyentes menores del aceite de oliva, debido a su naturaleza compleja y a su baja concentración. Una forma simple de resolver el problema es la determinación de la materia insaponificable. Se la define como el conjunto de productos presentes en la sustancia analizada que después de la saponificación con un hidróxido alcalino y de la extracción con un determinado disolvente, quedan como no volátiles. La fracción insaponificable representa un porcentaje menor o igual al 1.5% del peso del aceite, sin embargo, tiene una gran importancia desde el punto de vista del valor biológico del aceite y de la conservación del mismo.

La fracción no glicérica del aceite de oliva contiene hidrocarburos, esteroides, alcoholes triterpénicos, tocoferoles, fenoles, pigmentos, compuestos volátiles y aromáticos (Tabla 5).

Tabla 5.- Principales componentes de la fracción insaponificable del aceite de oliva.

Compuestos	Cantidad o proporción
Terpenos:	
Escualeno	300-700 mg /100 g
Carotenos	0.5-10 mg /kg (expresado como β -caroteno)
Clorofilas	0-9.7 ppm
Tocoferoles	7-30 mg / 100 g
α -tocoferol	$\geq 93\%$
β y γ -tocoferol	$\leq 10\%$ del total de tocoferoles
δ -tocoferol	$\leq 10\%$
Esteroides	80-240 mg / 100 g
Campesterol	2.0-3.0%
Estigmasterol	1.0-2.0%
β -sitosterol	95-97%
+ Δ ,5 avenasterol	
Compuestos fenólicos	50-500 mg / kg (expresado como ácido cafeico)
Alcoholes	
Cetonas	
Éteres	
Ésteres	
Derivados furánicos...	

Fuente: Mataix y Martínez de Victoria (1988)

Algunos de estos componentes minoritarios del aceite de oliva virgen están implicados en propiedades tan importantes como la estabilidad frente a la oxidación. Entre éstos, cabe destacar los pigmentos (clorofilas y carotenos), los tocoferoles y los fenoles.

2.6.2.1.- Pigmentos

Los pigmentos presentes en el aceite de oliva se dividen en dos grupos: los pigmentos clorofílicos y los carotenoides. Las clorofilas son los pigmentos fotosintéticos más importantes. La molécula de clorofila contiene básicamente cuatro anillos pirrólicos substituidos, uno de los cuales está reducido, y se hallan coordinados con un ión Mg^{2+} . Adicionalmente las clorofilas contienen un anillo isocíclico. El carácter hidrofóbico de estos compuestos se debe a la presencia del fitol, un alcohol isoprenoide monoinsaturado de estructura C_{20} que se encuentra esterificando el resto de ácido propiónico del carbono número 7 de la molécula de clorofila.

Los pigmentos clorofílicos, responsables del color verde de las plantas superiores, se localizan, junto a una serie de carotenoides, en los plastidios. En el caso de ser clorofilas los pigmentos mayoritarios, el plastidio se denomina específicamente cloroplasto. En las plantas superiores sólo están presentes las clorofilas *a* y *b*. La diferencia entre ellas estriba en que la clorofila *a* tiene un grupo metilo en el carbono número 3 mientras que la clorofila *b* posee un grupo formilo.

Los pigmentos carotenoides químicamente se clasifican como terpenoides y se consideran biosintéticamente derivados del ácido mevalónico, intermediario metabólico que aporta la unidad básica estructural. Están formados básicamente por 8 unidades de isopreno, de tal forma que la unión de cada unidad se invierte en el centro de la molécula. Los pigmentos carotenoides pueden dividirse en dos grandes grupos: los carotenos, que son estrictamente hidrocarburos, y las xantofilas, que contienen oxígeno. Los carotenoides son los pigmentos responsables de la mayoría de los colores amarillos y anaranjados de frutos y verduras, debido a la presencia en su molécula de un cromóforo consistente en una cadena de dobles enlaces conjugados.

En el aceite de oliva se ha observado la presencia de los pigmentos clorofílicos y carotenoides inicialmente presentes en el fruto, además de derivados de éstos formados por la liberación de ácidos durante el proceso de extracción del aceite (Gandul y Mínguez, 1996). Una proporción de los pigmentos clorofílicos de la oliva se transforma en feofitinas cuando el ión Mg^{2+} central del anillo porfirínico es substituido por un H^+ . Esta reacción afecta directamente al grupo cromóforo de la clorofila. Sólo una parte del contenido en clorofila del fruto permanece intacto en el aceite. Respecto a la fracción carotenoide, la acidez del medio causa la isomerización de los grupos 5,6-epóxidos a 5,8-furanoides. En el caso de aceites de la variedad *Arbequina* también se han detectado clorofilidas y feofórbidos. Estos compuestos son productos de la desesterificación enzimática del alcohol fitol en las moléculas de clorofila y feofitina respectivamente. En relación con la fracción carotenoide del aceite de esta variedad, el α -

caroteno y las xantofilas esterificadas son los compuestos típicos. En todos los aceites la feofitina *a* resultó ser el componente principal (44-58% de los pigmentos totales), seguido por luteína (18-38%) y β -caroteno (6-17%) (Gandul y Mínguez, 1996).

Se han encontrado marcadas diferencias en la composición de pigmentos fotosintéticos del aceite en función de la zona de origen, así, se ha observado que en los aceites griegos las relaciones luteína/ β -caroteno y pigmentos clorofílicos/pigmentos fotosintéticos es inferior a la unidad y oscila entre 2 y 11, respectivamente, (Psomiadou y Tsimidou, 2001) mientras que en aceites españoles el rango varía entre 1.3 y 5.1 para la relación luteína/ β -caroteno y se mantiene próxima a la unidad en la relación pigmentos clorofílicos/pigmentos carotenoides (Gandul y Mínguez, 1996).

La composición y el contenido total de pigmentos presentes de forma natural en el aceite de oliva, son importantes parámetros para la determinación de su calidad, ya que están relacionados con el color, un atributo fundamental en la evaluación organoléptica determinando el grado de aceptación del consumidor. La determinación de este parámetro, sin embargo, no está contemplada en el Reglamento de la CEE. Existen diversos métodos para la determinación del color del aceite. El índice ABT modificado está basado en la comparación visual del color del aceite con patrones preparados con solución de azul de bromotimol a diferentes valores de pH mediante mezcla de cantidades variables de tampones Na_2HPO_4 y KH_2PO_4 (Gutiérrez y Gutiérrez, 1986). Otro método es la determinación de las coordenadas instrumentales de color en el espacio CIELAB, calculadas a partir de los valores triestímulo X, Y, Z.

Desde un punto de vista nutricional, la fracción carotenoide, principalmente el β -caroteno, constituye el factor pro-vitamina A del aceite. Estudios epidemiológicos han mostrado que dietas ricas en carotenos están correlacionadas con una significativa reducción del riesgo de cáncer de pulmón, otras formas de cáncer, enfermedades coronarias y algunas patologías degenerativas (Bendich, 1994).

2.6.2.2.- Tocoferoles

Se conocen 8 compuestos en la serie de tocoferoles que se producen en la naturaleza, los cuales son derivados del 6-cromanol. Esta serie está formada por 4 compuestos con una estructura tocol que tiene una cadena saturada isoprenoide de C_{16} y 4 compuestos con una estructura tocotrienol que tiene 3 enlaces dobles en la cadena C_{16} .

Respecto al contenido de tocoferoles del aceite de oliva, el α -tocoferol representa aproximadamente el 90-95% de los tocoferoles totales, las formas β y γ se encuentran por debajo del 10% y la forma δ en proporciones muy bajas. Algunos autores, incluso, afirman que la forma δ -tocoferol no está presente en el aceite de oliva (Micali y Curro, 1984; Dionisi y col., 1995; Rovellini y col., 1997a), llegándolo a utilizar como patrón interno en el análisis de

tocoferoles del aceite de oliva (Aparicio y col., 1999). El tocoferol más activo biológicamente es el α -tocoferol por su acción como vitamina E, con lo que parte de la ingesta recomendada de esta vitamina puede ser cubierta con aceite de oliva virgen.

Se han realizado numerosas investigaciones de la presencia de tocoferoles en el aceite de oliva originario de diversos países y en todos los casos se observa un rango muy amplio de concentración. Psomiadou y col. (2000) analizaron el contenido en α -tocoferol de 90 aceites de oliva virgen de diferentes variedades y de diferentes regiones de Grecia durante tres campañas consecutivas y por encima de un 60% de las muestras contenían más de 200 ppm de α -tocoferol siendo los valores extremos 98 y 370 ppm; valores muy superiores a los reportados por Andrikopoulos y col. (1989) que oscilaban entre 81 y 142 ppm, con un valor medio de 113 ppm. El contenido en β -tocoferol y γ -tocoferol variaba entre trazas y 9 o 40 ppm respectivamente y el valor medio de δ -tocoferol era de 4 ppm.

En Italia se ha hecho referencia a valores del contenido de α -tocoferol también muy variables y comprendidos entre 55 y 315 ppm (Conte y col., 1993; Fedeli y Cortesi, 1993; Esti y col., 1996; Manzi y col., 1998).

Numerosos estudios realizados en España han mostrado un contenido medio de 230 ppm de α -tocoferol en aceites de la variedad *Arbequina* (Jiménez y Uceda, 1995). En aceites de la variedad *Cornicabra* el contenido en α -tocoferol cubre un rango entre 55 y 234 ppm, con un valor medio de 157 ppm, presentando sólo un 5% de los aceites analizados un contenido inferior a los 100 ppm (Salvador y col., 1998). Aceites de las variedades *Hojiblanca* y *Picual* tienen contenidos medios de α , β y γ -tocoferol de 187, 1.5 y 11 ppm para aceites de *Hojiblanca* y 208, 1.5 y 15 ppm para aceites de *Picual* (Aparicio y col., 1999). En general, si se comparan los aceites de oliva virgen de diferentes orígenes, los griegos son los que presentan concentraciones más elevadas de α -tocoferol.

Algunos autores han sugerido la determinación del contenido en tocoferoles y tocotrienoles para detectar la adulteración del aceite de oliva con aceite de semillas (Dionisi y col., 1995). En el aceite de oliva no se han detectado tocotrienoles, a excepción de la referencia de Agramont y col. (1986) en aceites de variedades españolas cultivadas en Tarragona, en el que se informa de la presencia de β y γ -tocotrienol. Este hecho no ha sido confirmado por otros investigadores. Los 4 homólogos tocotrienoles se detectan en aceite de palma siendo el γ -tocotrienol el más abundante, por lo que su presencia podría indicar la adición de aceite de palma en aceite de oliva. En aceite de semilla de uva se ha determinado la presencia de β y γ -tocotrienol, por lo que se podría detectar hasta un 2% de aceite de semilla de uva en aceite de oliva.

2.6.2.3.- Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva son parte de la fracción polar que se obtiene normalmente por extracción del aceite con metanol/agua. En numerosos trabajos se denominan polifenoles, aunque es un término convencional porque no todos ellos son polihidroxiderivados. Su papel ha sido extensamente investigado desde los años 60. En aquellos tiempos, los pioneros (Cantarelli, 1961; Montedoro y Cantarelli, 1969) establecieron una serie de prioridades en la investigación de los compuestos fenólicos basadas en:

- desarrollo de un procedimiento analítico para cuantificar los compuestos fenólicos en los aceites
- estimación de los niveles de compuestos fenólicos en aceites vegetales
- posible relación entre estos compuestos y las características del fruto (variedad, grado de madurez...)
- efecto de la tecnología de extracción y los procesos de refinado en el nivel de compuestos fenólicos
- importancia de los compuestos fenólicos como antioxidantes naturales.

Todavía hoy en día se está trabajando para dar respuesta a estos puntos. Hasta ahora no se ha propuesto ningún método estándar u oficial para la determinación de los compuestos fenólicos del aceite de oliva, y los valores encontrados por diversos investigadores apenas si pueden ser comparados, en lo referente al contenido de polifenoles totales y a los porcentajes individuales.

Las referencias que hay en relación con el contenido de polifenoles totales en el aceite de oliva presentan cifras muy variables en función de la ubicación del estudio y de la variedad de oliva. Un estudio realizado por Montedoro y col.(1992b) en aceites de variedades italianas reveló un amplio rango en el contenido de compuestos fenólicos (expresados en ppm de ácido gálico), subdividiéndolos en tres grupos: aceites de contenido bajo (50-200 ppm), medio (200-500) y alto (500-1000). En aceites españoles también se ha observado una gran variabilidad en el contenido de polifenoles (50-500 ppm de ácido cafeico) (Vázquez y col., 1975). Jiménez y Uceda (1995) obtuvieron, a partir de datos de 6 campañas, un valor medio de 184 ppm de ácido cafeico en aceites de la variedad *Arbequina*. En aceites de esta misma variedad producidos en diferentes zonas oleícolas de Cataluña, Aragón y Andalucía se obtuvieron valores medios expresados en ppm de ácido cafeico que oscilaron entre 113 en la región de Andalucía hasta 443 en una determinada zona de Cataluña (Tous y col., 1997). Un estudio realizado por Motilva y col. (1998) con 67 aceites de oliva procedentes de almazaras de la DOP "Les Garrigues" de la campaña oleícola 1995/96 mostró un contenido medio de polifenoles totales de 152 ppm de ácido cafeico, moviéndose los valores extremos entre 80 y 300 ppm. En aceites de otras variedades españolas como *Hojiblanca*, *Picual* y *Cornicabra*, se han reportado valores medios de 190 ppm para las dos primeras (Aparicio y col., 1999) y de 162 ppm para la última (Salvador

y col., 1999). En aceites israelíes se han reportado valores inferiores a 157 ppm de ácido cafeico (Gutfinger, 1981), en aceites turcos valores comprendidos entre 35 y 355 ppm de ácido cafeico (Nergiz y Ünal, 1991) y en aceites griegos valores entre 19 y 242 ppm de ácido cafeico (Tsimidou y col., 1992b).

Los métodos más ampliamente utilizados para evaluar el contenido en polifenoles del aceite de oliva son el ensayo colorimétrico con el reactivo Folin-Ciocalteu y la cromatografía líquida (HPLC). El primer método proporciona sólo información cuantitativa y el contenido ha de ser referido a un compuesto estándar, lo que supone una limitación debido al gran número de compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva. Por otro lado, la técnica cromatográfica es un método más sensible y específico, desde un punto de vista cualitativo y cuantitativo, sin embargo es un proceso largo que implica un procedimiento previo de extracción, además no todos los picos presentes en el cromatograma se han podido identificar y es difícil la cuantificación de algunos compuestos debido a la ausencia de patrones.

Los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva son en parte diferentes a los presentes en el fruto debido a causas físicas, por un reparto de los componentes entre la fase oleosa y el agua de vegetación así como por la incorporación a la pasta de componentes que proceden de las semillas, y también debido a reacciones de oxidación y hidrólisis favorecidas por el pH ácido del medio, a la puesta en contacto de los enzimas hidrolíticos con sus sustratos y a la acción de la polifenoloxidasas, muy abundante en la pulpa, la cual oxida y polimeriza parte de los compuestos fenólicos presentes.

Los estudios efectuados en referencia a la determinación de los compuestos fenólicos en el aceite de oliva virgen han puesto en evidencia la presencia de fenilacetatos, hidroxitirosol y tirosol, hidroxicinamatos, ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico, *o*-cumárico, y hidroxibenzoatos, ácidos siríngico, *p*-hidroxibenzoico, vainílico, homovainílico, protocateico y gálico (Nergiz y Ünal, 1991; Montedoro y col., 1992b; Tsimidou y col., 1992a). En los últimos años se ha determinado en aceite proveniente de variedades españolas de olivo la presencia de vainillina y del compuesto fenólico 4-acetoxietil-1,2-dihidroxibenzeno (Brenes y col., 1999).

Sin embargo, los compuestos fenólicos mayoritarios en el aceite de oliva virgen son derivados secoiridoides. Las agliconas de oleuropeina y ligustrósido, y la forma dialdehídica del ácido elenólico unida al hidroxitirosol o al tirosol (Montedoro y col., 1993; Angerosa y col., 1996a; Brenes y col., 1999; Owen y col., 2000b) que también ha sido descrita por Cortesi y col. (1995) como la aglicona de la forma deacetoxi de la oleuropeina o del ligustrósido. De hecho, ha sido descrita una reacción de isomerización entre las formas deacetoxi y dialdehídica (Limiroli y col., 1995; Pirisi y col., 1997).

En estos últimos años se han identificado dos lignanos, pinosinol y 1-acetoxipinosinol (Brenes y col., 2000; Owen y col., 2000a), como compuestos mayoritarios del aceite de oliva

junto con los derivados secoiridoides citados anteriormente. También se ha descrito la presencia en el aceite de oliva de glucósidos del hidroxitirosol (Bianco y col., 1998) y de oleuropeina (Perri y col., 1999).

Las flavonas apigenina y luteolina, procedentes de la hidrólisis de los correspondientes glucósidos de la pulpa, fueron ya descritas en aceite de oliva en 1976 por Vázquez-Roncero y col. y posteriormente por Rovellini y col. (1997b) y Brenes y col. (1999).

2.6.3.- ESTABILIDAD DEL ACEITE DE OLIVA

La degradación del aceite origina el enranciamiento del mismo. El término enranciamiento se aplica para describir el desarrollo de olores y sabores indeseables como consecuencia de determinados cambios en la fracción grasa de los alimentos. La etapa inicial en el proceso de degradación es la liberación de ácidos grasos por las enzimas lipolíticas. Las lipasas que producen algunos microorganismos presentes en las olivas, así como lipasas naturales que se encuentran en las olivas hidrolizan los triglicéridos, liberando los correspondientes ácidos grasos, con el consecuente incremento de la acidez del aceite.

La autooxidación se debe a las reacciones de oxidación de los lípidos y es un proceso en el que intervienen radicales libres según un mecanismo en cadena. Los factores que influyen en la oxidación de las sustancias grasas son la cantidad y disponibilidad del oxígeno presente, el grado de insaturación de los ácidos grasos, la presencia de metales, de enzimas, de activadores como la luz y aportes energéticos en general. Es difícil evaluar el efecto de un factor específico en el proceso de oxidación ya que actúan simultáneamente.

Las teorías comúnmente más aceptadas en relación al mecanismo de autooxidación dividen el proceso en tres etapas: iniciación o etapa de formación de radicales libres, etapa de propagación o de reacción de los radicales libres y etapa de finalización o de constitución de productos no radicales. En la fase de iniciación se forman radicales libres orgánicos (R^\bullet) a partir de precursores no radicales, hidrocarburos insaturados. En la fase de propagación se forman radicales peróxido (ROO^\bullet) que posteriormente reaccionan con compuestos con hidrógeno reactivo ($R'H$). Los nuevos radicales (R'^\bullet) continúan la acción con oxígeno molecular. Finalmente, cuando todo el oxígeno o las moléculas con hidrógeno han reaccionado, empieza la etapa de finalización. En ésta, los radicales se combinan entre sí para dar productos inactivos.

La formación de un hidroperóxido mediante la reacción de una molécula de lípido con oxígeno en su estado base es bastante improbable, porque dicha reacción contraviene el principio de conservación del momento angular de giro. Sin embargo, los hidroperóxidos se pueden originar por la reacción de un ácido graso con la molécula de oxígeno en su estado singulete. Los fotosintetizadores absorben la luz en el espectro visible y alcanzan un nivel de excitación,

transfiriendo el exceso de energía a una molécula de oxígeno. El oxígeno singulete generado de esta forma reacciona con la molécula grasa y se forma un hidroperóxido.

En la actualidad se admite que la fotooxidación de los aceites vegetales, inducida por las clorofilas y sus productos de degradación, las feofitinas, provoca la formación de los radicales libres necesarios para la iniciación de las reacciones de autooxidación. Los resultados del estudio de Interesse y col. (1971) muestran que las clorofilas *a* y *b* y las feofitinas *a* y *b* tienen un poder prooxidante en las muestras de aceite expuestas a la luz, que no parece aumentar en proporción a la concentración del pigmento. Por el contrario, en la oscuridad tienen una capacidad antioxidante que depende sensiblemente de su concentración en el aceite. Según los trabajos de Kiritsakis y Dugan (1985) y de Rahmani y Csallany (1998), la velocidad de fotooxidación del aceite de oliva decolorado aumenta con la adición de clorofila o de feofitina. Estos resultados no son consistentes con los de Gutiérrez y col. (1992a) quienes en un trabajo sobre la influencia de las clorofilas en la estabilidad del aceite, no observaron una acción prooxidante de las mismas. En condiciones de oscuridad se evidenció una mayor estabilidad de las muestras que contenían clorofilas, indicando una cierta capacidad antioxidante, en especial de la clorofila *a*. El β -caroteno puede retrasar los efectos nocivos de la fotooxidación inducida por los pigmentos clorofílicos en el aceite de oliva, desactivando el oxígeno singulete (Kiritsakis y Dugan, 1985). Fakourelis y col. (1987) afirman que el efecto inhibitor del β -caroteno aumenta con su concentración en el aceite de oliva decolorado.

Diversos investigadores han estudiado el papel de determinados componentes del aceite de oliva en su estabilidad frente a la oxidación. Durante muchos años los tocoferoles han sido propuestos como aditivos en grasas y aceites por sus propiedades antioxidantes. Detienen las reacciones en cadena de los radicales libres donando un átomo de hidrógeno a los radicales hidroperóxido. El radical tocoferol resultante es relativamente estable. También inhiben las oxidaciones inducidas por el oxígeno singulete excitado electrónicamente. Satue y col. (1995) estudiaron el efecto de algunos antioxidantes naturales sobre la estabilidad oxidativa mediante el seguimiento de los productos de oxidación primaria (hidroperóxidos) y de oxidación secundaria (hexanal), y observaron que el α -tocoferol actuaba como prooxidante a concentraciones superiores a 250 ppm, de acuerdo con la determinación del índice de peróxidos, sin embargo, resultaba más efectivo que otros antioxidantes en la inhibición de la formación de hexanal. Martínez y col. (1995) estudiaron el enranciamiento oxidativo de aceites vegetales, entre ellos el de oliva, en presencia de α -tocoferol y dedujeron que alcanzaba su máxima actividad a niveles relativamente bajos y que no tenía efecto ninguno una vez pasado el período de inducción, cuando la oxidación rápida había empezado. Resultados experimentales del trabajo de Blekas y col. (1995) mostraron que el α -tocoferol actuaba como antioxidante en aceite de oliva purificado mantenido en la oscuridad a 40° C a concentraciones de 100, 500 y 1000 ppm, aunque el efecto era mayor a 100 ppm que a concentraciones superiores. En los estadios iniciales de oxidación se observó un cierto efecto prooxidante.

Baldioli y col. (1996) observaron una baja correlación entre la estabilidad del aceite y el contenido en α -tocoferol, sin embargo, pusieron de manifiesto el efecto sinérgico de una mezcla de hidroxitirosol y sus formas oleosídicas y α -tocoferol en aceites de oliva purificados. Estos resultados coinciden con los de Blekas y Boskou (1998) quienes estudiaron la actividad antioxidante del α -tocoferol sobre la matriz de triglicéridos del aceite de oliva llegando a la misma conclusión a cerca del sinergismo de compuestos ortodifenólicos y α -tocoferol.

Las propiedades antioxidantes y el consiguiente valor biológico del aceite de oliva también han sido atribuidos en gran medida a los compuestos fenólicos presentes de manera natural. En muchos trabajos se ha relacionado el contenido en polifenoles con algunos parámetros utilizados para determinar la estabilidad de los aceites frente a la oxidación. Montedoro y col. (1992b) encontraron una significativa correlación entre los polifenoles totales y la estabilidad del aceite medida como índice de peróxidos. Los resultados obtenidos por Baldioli y col (1996) y Salvador y col. (1999) muestran una clara influencia del contenido de polifenoles totales del aceite sobre su estabilidad, medida como tiempo de inducción en un equipo Rancimat. También se ha investigado la actividad antioxidante de determinados compuestos fenólicos presentes de forma natural en el aceite de oliva, poniendo de manifiesto su importante actividad antioxidante (Servili y col., 1996).

2.7.- INFLUENCIA DE LOS FACTORES AGRONÓMICOS Y TECNOLÓGICOS SOBRE LA COMPOSICIÓN DEL ACEITE

La composición del aceite es el resultante de una serie de interacciones entre factores genéticos, ambientales y tecnológicos que marcan tanto la fase de desarrollo y de maduración del fruto como su transformación (Montedoro y Servili, 1991).

2.7.1.- INFLUENCIA DE LA VARIEDAD Y DEL GRADO DE MADURACIÓN DE LA OLIVA

El aceite de oliva, como producto del metabolismo del olivo está fuertemente influenciado por la variedad. Esta influencia podría considerarse como directa si se hace referencia a las variaciones específicas de los constituyentes individuales, con un grado de madurez igual, y como indirecta si va unida a variaciones del modelo de maduración de los frutos o a interacciones en condiciones de crecimiento diversas. En un trabajo que data de 1972 sobre un numeroso grupo de cultivares de distintas zonas de Italia, se puso de manifiesto la influencia de la variedad en la composición acídica (Averna y col., 1972). Las mayores fluctuaciones correspondieron al contenido de ácido oleico y sobre todo, de ácido linoleico, con notables oscilaciones de la relación saturados/insaturados en los distintos aceites. Di Marco y col. (1991) señalaron que la amplitud de las variaciones observadas en lo referente al contenido de ácidos

grasos de los aceites de variedades diferentes cultivados en la misma parcela, es al menos equivalente al inducido por la época de recogida. Las fluctuaciones debidas a la época de recogida tienden a superponerse al efecto varietal. En España, en un estudio acerca del perfil de ácidos grasos del aceite realizado durante 5 años en tres épocas de campaña sobre unas 30 variedades, este último factor fue responsable del mayor porcentaje de variación del contenido en ácido palmítico, esteárico, oleico y linoleico (Uceda y Hermoso, 1998). El campo de variabilidad propio de los ácidos grasos y la amplitud de la “zona de indiferencia” (Fiorino y Grifi, 1991) que se deriva de ello son de tal tipo que no permiten su utilización como marcadores para una caracterización varietal precisa.

Otros componentes del aceite de oliva relacionados con la variedad son los compuestos fenólicos y los tocoferoles. En ambos la variedad tiene una notable influencia, aunque existen otros factores a tener en cuenta. Se ha señalado que el perfil fenólico de un aceite, desde el punto de vista cualitativo, es característico en función de la variedad de oliva de origen (Solinas, 1987; Brenes y col., 1999). En cuanto al contenido de α -tocoferol, también se ha observado su dependencia en función del cultivar, de acuerdo con los resultados obtenidos en un estudio realizado con variedades de olivo españolas (García y col.; 1996).

Un estudio de la fracción clorofílica y carotenoide de 9 aceites de oliva monovarietales de las principales zonas productoras de España mostró una composición de pigmentos cualitativamente semejante pero cuantitativamente diferente, por lo que se podría afirmar que la riqueza en pigmentos es inherente a la variedad (Gandul y Mínguez, 1996). Estudios posteriores han confirmado la dependencia entre el nivel de pigmentos fotosintéticos en el aceite y la variedad, teniendo siempre en cuenta que el grado de madurez es igualmente un importante factor a considerar y que implica una pérdida gradual de pigmentos clorofílicos y carotenoides y un incremento de compuestos antociánicos. Las velocidades relativas de desaparición de clorofilas y carotenos son marcadamente diferentes entre variedades, implicando que también su velocidad de catabolismo es una característica propia de cada variedad (Roca y Mínguez, 2001). Ranalli (1992) se centró en la composición carotenoide de aceites de 3 variedades italianas y observó diferentes concentraciones en función de la variedad de olivas de la que provenían los aceites

A medida que madura, la oliva va experimentando cambios fisiológicos, modificándose su textura, color y composición por lo que las características del aceite varían en función de la fase de madurez en que han sido recogidas las olivas. Así, a lo largo del proceso de maduración, una vez finalizada la lipogénesis o proceso de formación del aceite, se producen cambios en la composición ácida. Estudios realizados en la estación de Olivicultura y Elaiotecnia de Jaén, muestran que la composición ácida de los aceites evoluciona con la maduración de las olivas. Observaron que se producía una disminución del contenido de ácido palmítico y un aumento del contenido de ácido linoleico, permaneciendo bastante constante la proporción de ácido oleico,

por lo que la relación ácidos grasos monoinsaturados/poliinsaturados tiende a disminuir (Uceda y Hermoso, 1998).

Se ha observado una disminución del contenido de tocoferoles, polifenoles totales y pigmentos del aceite de diversas variedades españolas al avanzar el estado de maduración de las olivas (Agramont y col., 1986; Gutiérrez y col., 1999). Otro estudios han mostrado un aumento del contenido de polifenoles en los aceites procedentes de olivas en las fases de maduración desde verde a envero y una disminución en las fases de envero a maduro (Sánchez y col., 1999).

El proceso de maduración implica de igual modo una serie de cambios en los pigmentos presentes en las olivas. Desde un punto de vista cualitativo, la composición de pigmentos clorofílicos y carotenoides no se ve modificada al avanzar la maduración sin embargo, su concentración va disminuyendo gradualmente al llegar el momento de la causando la variación del color del aceite en función de las cantidades y proporciones de otros pigmentos, principalmente compuestos de degradación (Mínguez y Gallardo, 1995). La maduración de la oliva siempre implica una pérdida de pigmentos, que resulta más pronunciada cuando aumenta la presencia de compuestos antociánicos.

2.7.2.- INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES

El clima ejerce una gran influencia sobre la composición química y la calidad del aceite, se ha observado que existe una notable influencia de las condiciones meteorológicas sobre la evolución en el crecimiento del fruto y su maduración (Jacoboni y col., 1999). En un estudio sobre los efectos de los factores agronómicos y estacionales en la producción del olivo y las características cualitativas del aceite se puso de manifiesto que las condiciones climáticas, en particular las precipitaciones, influían en la composición química del aceite de oliva. Los compuestos que más se veían influidos eran los alcoholes alifáticos, los compuestos fenólicos y los componentes del espacio de cabeza, de particular importancia en lo que respecta a las características organolépticas y de calidad del aceite (Pannelli y col., 1994). Angerosa y col. (1996b) estudiaron la influencia de la variable ambiente en la composición del aceite de oliva y evidenciaron buenas correlaciones entre algunos compuestos como esteroides, escualeno, ácido oleico y fitol, y las temperaturas en los meses de otoño, la humedad relativa en los meses de verano y la precipitación durante todo el año. En un trabajo realizado por Ranalli y col. (1997) se observa que aceites provenientes de la misma variedad y cultivados en distintas áreas geográficas presentan características significativamente diferentes respecto a la composición aromática, concentración de compuestos fenólicos y composición ácida, mostrando que la tipicidad de los aceites está definida también por la zona de producción y consecuentemente por factores climáticos y edafológicos.

Generalmente las olivas de áreas más frías contienen aceite con ácidos grasos más saturados que en áreas más cálidas. Se ha observado que el ácido oleico aumentaba y el linoleico disminuía en

la pulpa del fruto cuando el clima es más frío (Lotti y col., 1982). De hecho, el aceite de oliva de los países mediterráneos de la zona norte es más rico en glicéridos líquidos, mientras que los de la zona sur son más ricos en glicéridos sólidos, principalmente de ácidos palmítico y esteárico. Como la temperatura disminuye al aumentar la latitud, dentro de una misma zona geográfica la relación ácidos grasos insaturados/ácidos grasos saturados es superior en los aceites procedentes de olivares cultivados a mayor latitud (Mousa y col., 1996).

2.7.3.- INFLUENCIA DEL RIEGO

Diversos investigadores han estudiado la influencia que tiene la aplicación de riego al olivo sobre la composición química y las características organolépticas del aceite de oliva, aunque los resultados obtenidos no siempre han sido concordantes.

Respecto a los parámetros analíticos clásicos que permiten clasificar el aceite de oliva en las diferentes categorías comerciales, grado de acidez, absorbancia en el ultravioleta (K_{270}) y índice de peróxidos, sólo acerca de este último coinciden en señalar los diferentes autores que no se ve afectado por la aplicación de riego (Dettori y Russo, 1993; Salas y col., 1997; Patumi y col., 1999; Faci y col., 2000). En relación al grado de acidez, tan sólo Salas y col. (1997) han observado un valor superior del mismo en aceite procedente de los árboles que tenían totalmente cubiertas sus necesidades hídricas.

En el experimento de riego realizado por Faci y col. (2000), donde los tratamientos de riego consisten en la aplicación de diversos porcentajes constantes de la demanda evaporativa, se observó un incremento lineal de la absorbancia a 270 nm al aumentar la cantidad de agua aplicada, mientras que en el trabajo de Salas y col. (1997) aunque se observa un menor valor del parámetro K_{270} en los aceites procedentes de árboles no regados, no se encontraron diferencias entre tratamientos de riego.

Resultados igualmente diversos se han presentado sobre la influencia del riego en el perfil ácido del aceite de oliva. Algunos autores no han detectado diferencias significativas en el contenido en ácidos grasos de los aceites en función del tratamiento de riego aplicado (Inglese y col., 1996; Patumi y col., 1999), mientras que otros como Salas y col. (1997) y Faci y col. (2000) han observado un menor porcentaje de ácido palmitoleico y esteárico en aceites de secano, encontrando tan sólo el último de ellos diferencias significativas en el contenido en ácido oleico, siendo inferior en los aceites de secano y no observándose diferencias entre los tratamientos de riego. Las mayores discrepancias hacen referencia a la relación Insaturados/Saturados (I/S). Por una parte, Dettori y Russo (1993) y Faci y col. (2000) han observado un menor valor de esta relación en los aceites procedentes de árboles no regados, mientras que Salas y col. (1997) señalan que la relación I/S es menor en los tratamientos con mayor aporte de agua.

La mayoría de los trabajos publicados coinciden en afirmar que la concentración de los compuestos fenólicos en el aceite disminuye a medida que aumenta la dosis de riego (Beltrán y col., 1995; Salas y col., 1997; Patumi y col., 1999; Faci y col., 2000), aunque los trabajos de Dettori y Russo (1993) e Inglese y col. (1996) muestran un mayor contenido de polifenoles en los aceites de árboles más regados.

El análisis sensorial de los aceites sometidos a estrategias de riego y de los aceites de secano han mostrado una ausencia de defectos en los mismos y han sido clasificados dentro de la categoría virgen extra independientemente de su procedencia, riego o secano (Salas y col., 1997; Patumi y col., 1999). Sin embargo, los aceites de secano obtuvieron una mayor puntuación en la valoración organoléptica. El atributo sensorial que se ve afectado en mayor medida por la aplicación de agua de riego es el amargor, mostrando intensidades menores en los aceites procedentes de árboles regados.

2.7.4.- INFLUENCIA DE LA TECNOLOGÍA DE EXTRACCIÓN DEL ACEITE

La tecnología de extracción tiene una gran influencia sobre las características del aceite de oliva. La molienda del fruto afecta a la composición del aceite, principalmente al color y a los compuestos fenólicos. El mayor contenido en pigmentos está relacionado con la acción del triturador sobre la piel de las olivas, donde los pigmentos clorofílicos y carotenoides están en mayor proporción. Ranalli (1992) estudió el efecto de la tecnología de extracción sobre la fracción carotenoide en aceites de 3 variedades italianas y observó que los aceites de percolación, obtenidos triturando las olivas en un molino de martillos móviles, en comparación a los aceites de decantación después de haber sido trituradas las olivas en un molino de empiedro, tienen mayor contenido en pigmentos clorofílicos y carotenoides. Los aceites obtenidos extrayendo la pasta con decánter y triturando con molino de martillos fijos contienen, en comparación con el mismo sistema pero utilizando martillos móviles, mayor concentración de pigmentos. Alloggio y Caponio (1997) llegaron a la conclusión de que los molinos de martillos mostraban una mayor capacidad de extracción de los compuestos fenólicos que los molinos de empiedro.

Cualquiera que sea el sistema de elaboración del aceite, el tiempo de batido y las temperaturas que se alcanzan durante todo el proceso, constituyen variables de regulación de gran importancia en su control en lo que se refiere a las características del aceite obtenido. Se ha evidenciado que un aumento en la temperatura favorece la disolución de los compuestos fenólicos de la pasta en el aceite, mientras que un aumento en el tiempo de batido implica una disminución del contenido de polifenoles independientemente de la temperatura de batido, debido probablemente a la intervención de la fenoloxidasas que cataliza la oxidación de los fenoles a quinonas y después a polímeros (Solinas y col., 1978; Jiménez y col., 1995).

En la fase de separación sólido-líquido hay que tener en cuenta que el sistema de centrifugación necesita adición de agua a la pasta de la oliva para facilitar la separación del aceite de las otras fases, mientras que los sistemas de presión y de percolación no necesitan esa adición de agua. Esto determina diferencias en algunas características del aceite de oliva, como el contenido en polifenoles totales y pigmentos clorofílicos (di Giovacchino 1996). El contenido de polifenoles totales es superior en los aceites obtenidos con los sistemas de presión y de percolación que en los extraídos con el sistema de centrifugación. El agua utilizada para diluir la pasta en la centrífuga disminuye la concentración de las sustancias fenólicas de la fase acuosa por dilución, y según la ley del equilibrio entre fases, provoca asimismo la disminución de la concentración de dichas sustancias en la fase oleosa inmisible. Las diferencias observadas en el contenido de pigmentos clorofílicos deben atribuirse al uso de trituradores metálicos en la molturación de las olivas cuando se ha efectuado la extracción del aceite con sistemas de centrifugación.

Los aceites de percolación o primera extracción, se caracterizan por niveles superiores de polifenoles totales, tocoferoles y componentes volátiles, y niveles inferiores de clorofilas, feofitinas, esteroides y alcoholes alifáticos y terpénicos. El mayor contenido de pigmentos en los aceites de segunda extracción es probablemente debida a la adición de agua a la pasta, que por medio de la acción mecánica podría favorecer el contacto de la fase oleosa con los tejidos superficiales del fruto, donde la mayoría de los pigmentos están localizados (Ranalli y col., 1999).

El aceite obtenido por el sistema de 2 fases, en relación con el de 3 fases, presenta un mayor contenido de polifenoles, tocoferoles, *trans*-hexenal y compuestos aromáticos y un menor contenido de pigmentos (Ranalli y Angerosa, 1996; Motilva y col., 1998). La mayor cantidad de agua que se adiciona a la pasta favorece que los compuestos fenólicos, de naturaleza hidrosoluble, pasen a la fase acuosa y se pierdan en los alpechines.

El objetivo global del trabajo se ha centrado en la evaluación del efecto de dos estrategias de riego (riego deficitario controlado y riego lineal) aplicadas a olivos (*Olea europaea* L.) de la variedad *Arbequina* sobre la calidad y composición del aceite de oliva virgen.

Los objetivos específicos para cada una de las estrategias se han concretado en:

3.1- Estrategia de riego deficitario controlado.

El objetivo del ensayo de riego deficitario controlado se ha centrado en el estudio del efecto de diferentes reducciones de la cantidad de agua aplicada durante la época estival a olivos (*Olea europaea* L.) de la variedad *Arbequina* sobre la calidad y composición del aceite, siendo los objetivos específicos los siguientes:

- 3.1.1- Analizar el efecto de las diferentes estrategias de riego deficitario controlado sobre la calidad y la composición del aceite a lo largo del período de maduración del fruto y en el momento de la campaña oleícola correspondiente al año 1996.
- 3.1.2- Confirmar el efecto del riego deficitario controlado sobre los parámetros de calidad y la composición química de los aceites en tres campañas consecutivas.
- 3.1.3- A la vista de que la aplicación de estrategias de riego deficitario controlado afectaba principalmente al contenido de polifenoles y a las propiedades del aceite relacionadas con el mismo, en la última campaña oleícola se planteó el objetivo de estudiar la evolución del contenido de polifenoles totales en la oliva durante y después de la aplicación de las estrategias de riego, y en relación con los tratamientos de riego aplicados al olivo.

A la vista de los resultados obtenidos, se pretende establecer la estrategia de reducción de agua de riego al olivo durante la época estival más adecuada para optimizar la producción sin afectar a la calidad del aceite.

3.2- Estrategia de riego lineal.

El objetivo del ensayo de riego lineal se ha centrado en el estudio del efecto de la aplicación de dosis crecientes de agua de riego, al variar los niveles del coeficiente de cultivo K_c en el cálculo de la evapotranspiración del cultivo, a olivos jóvenes (*Olea europaea* L.) de la variedad *Arbequina* sobre la calidad y composición del aceite, siendo los objetivos específicos los siguientes:

- 3.2.1- Evaluar el efecto de la aplicación, durante todo el año, de cantidades crecientes de agua al olivo, en función de diferentes valores del coeficiente de cultivo K_c , sobre

los parámetros de calidad y la composición química de los aceites en dos campañas oleícolas consecutivas.

3.2.2- Caracterizar la fracción fenólica del aceite de oliva virgen de la variedad *Arbequina* cultivada en la zona de producción oleícola de Lleida, y estudiar el efecto del riego lineal sobre el perfil fenólico.

3.2.3- Determinar la influencia de aplicaciones crecientes de agua de riego al olivo sobre la actividad del enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5), implicado en la síntesis de compuestos fenólicos, y el contenido de polifenoles totales del fruto a lo largo del período de maduración.

A la vista de los resultados obtenidos, se pretende establecer el nivel de riego más adecuado, en función del coeficiente de cultivo (K_c), para optimizar la producción de árboles jóvenes de la variedad *Arbequina*, sin afectar a la calidad del aceite.

3.3- Relaciones de interdependencia entre los componentes del aceite.

Se pretende estudiar, en cada una de las experiencias de riego, la existencia de relaciones de interdependencia entre los componentes del aceite analizados.

El plan de trabajo que se ha seguido a la hora de llevar a cabo la labor de investigación ha sido el siguiente:

➤ ***Revisión bibliográfica.***

Se ha realizado una búsqueda y recopilación de la literatura existente en relación con el aceite de oliva virgen. Principalmente se ha llevado a cabo una revisión sobre:

- la composición química del aceite de oliva y la repercusión de los factores agronómicos, como el riego, sobre la misma; haciendo especial hincapié en la fracción fenólica
- importancia de los diferentes constituyentes del aceite en la calidad del mismo
- la composición química de la oliva
- factores que afectan al metabolismo de los compuestos fenólicos en las plantas.

➤ ***Selección de las variables a determinar y puesta a punto de los métodos analíticos.***

Se han determinado los parámetros clásicos de calidad del aceite (grado de acidez, índice de peróxidos y absorbancia en el UV) y parámetros más específicos relacionados con el color y la estabilidad del aceite como son el perfil de ácidos grasos, los pigmentos fotosintéticos, las coordenadas instrumentales de color, los compuestos fenólicos (polifenoles totales y perfil cromatográfico), el α -tocoferol y la estabilidad frente a la oxidación. También se ha determinado el índice de amargor y se ha realizado la evaluación sensorial de los aceites. En el fruto se ha determinado el contenido de polifenoles totales y la actividad del enzima PAL.

➤ ***Obtención de las muestras y realización de las determinaciones analíticas.***

➤ ***Análisis de los datos experimentales y discusión de los resultados.***

Se han analizado los datos obtenidos mediante distintas técnicas estadísticas que permitan establecer o no diferencias entre tratamientos de riego y entre épocas de muestreo. Se han aplicado también técnicas de análisis multivariante para establecer relaciones entre los diversos parámetros analizados y la estabilidad del aceite. Se ha realizado un análisis de los resultados para establecer las conclusiones de la investigación.

➤ ***Redacción de la memoria de tesis.***

El último paso ha consistido en elaborar el documento de la tesis doctoral.

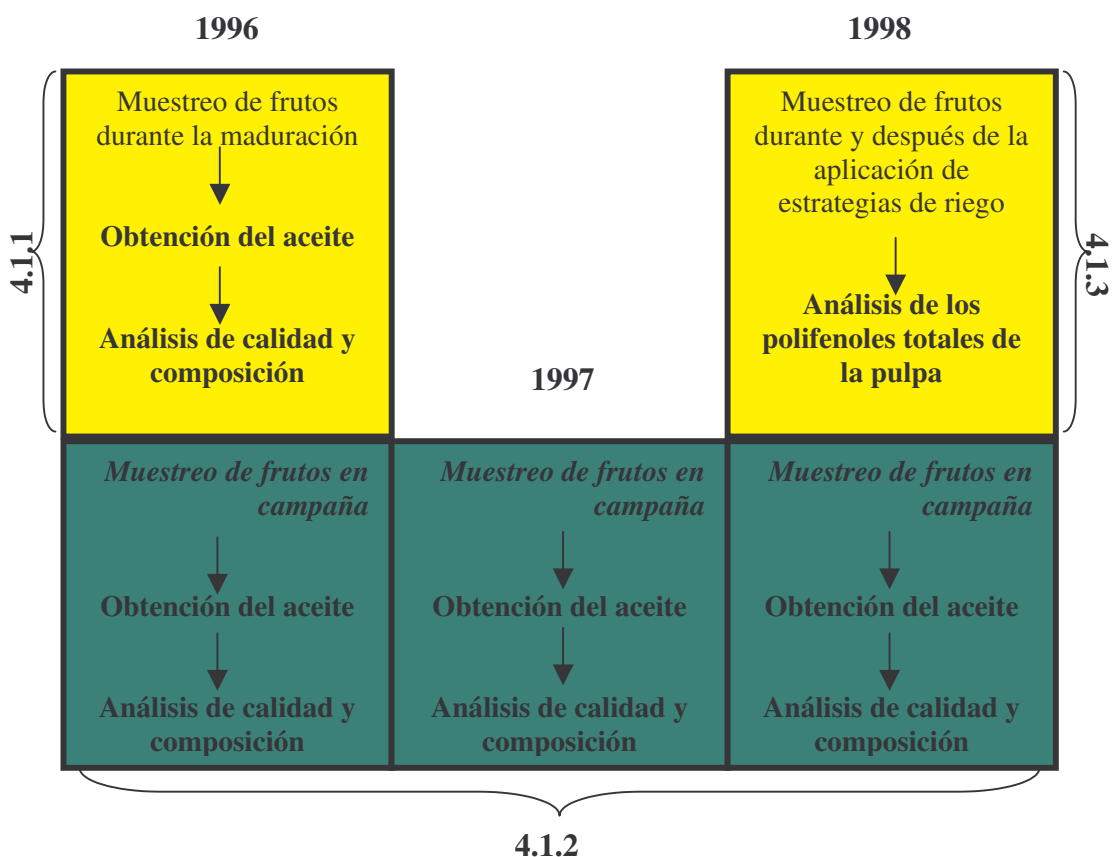
Con el objetivo de facilitar un mejor seguimiento de los objetivos planteados en el presente documento, se muestra a continuación un esquema general de las tomas de muestras y del trabajo experimental realizado.

4.1.- EXPERIENCIA DE RIEGO DEFICITARIO CONTROLADO

4.1.1.- Efecto del riego deficitario controlado sobre la composición del aceite durante el período de maduración del fruto (Año 1996).

4.1.2.- Efecto del riego deficitario controlado sobre la composición del aceite en campañas oleícolas consecutivas (1996-1998).

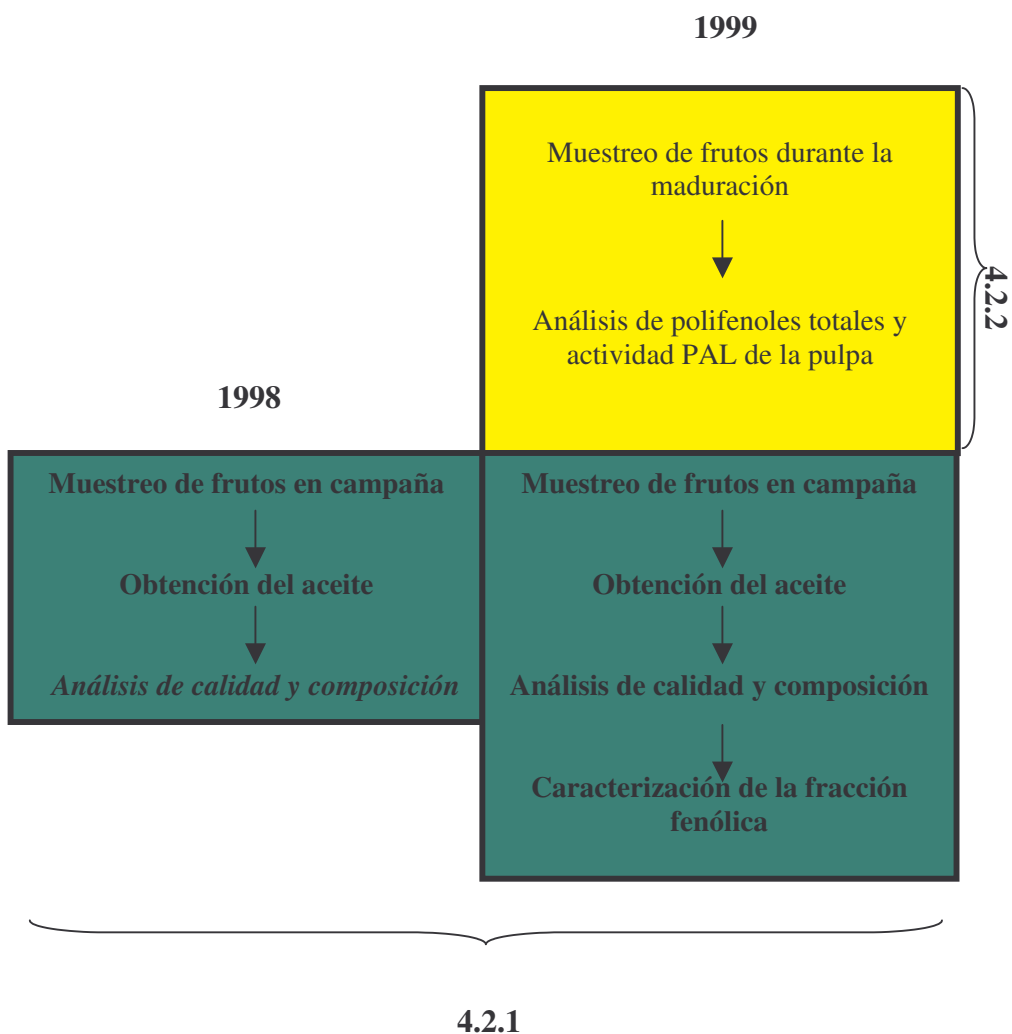
4.1.3.- Influencia del riego deficitario controlado sobre la acumulación de compuestos fenólicos en el fruto durante su crecimiento y maduración (Año 1998).



4.2.- EXPERIENCIA DE RIEGO LINEAL

4.2.1.- Efecto del riego lineal sobre la composición del aceite en campañas oleícolas consecutivas (1998-1999).

4.2.2.- Efecto del riego lineal sobre la acumulación de compuestos fenólicos y la actividad del enzima PAL en el fruto durante su maduración (Año 1999).



El diseño de las diferentes estrategias de riego deficitario controlado y de riego lineal, así como su aplicación y el control de las parcelas experimentales se ha llevado a cabo por personal del Área de Tecnología Frutícola del centro UdL-IRTA. Para más información de la que a continuación se expondrá, se puede consultar la tesis doctoral de Alegre (2001) para el dispositivo experimental de riego deficitario controlado y la de Luna (2000) para el dispositivo experimental de riego lineal.

5.1.- DISPOSITIVO EXPERIMENTAL DE RIEGO DEFICITARIO CONTROLADO

5.1.1.- LOCALIZACIÓN DE LA PARCELA

El ensayo se ha realizado en una plantación comercial de olivos de la variedad *Arbequina* en el término municipal de Bovera, comarca de Les Garrigues, provincia de Lleida (latitud N 41°19', longitud E 00°36') a una altura de unos 360 m sobre el nivel del mar (Figura 5).

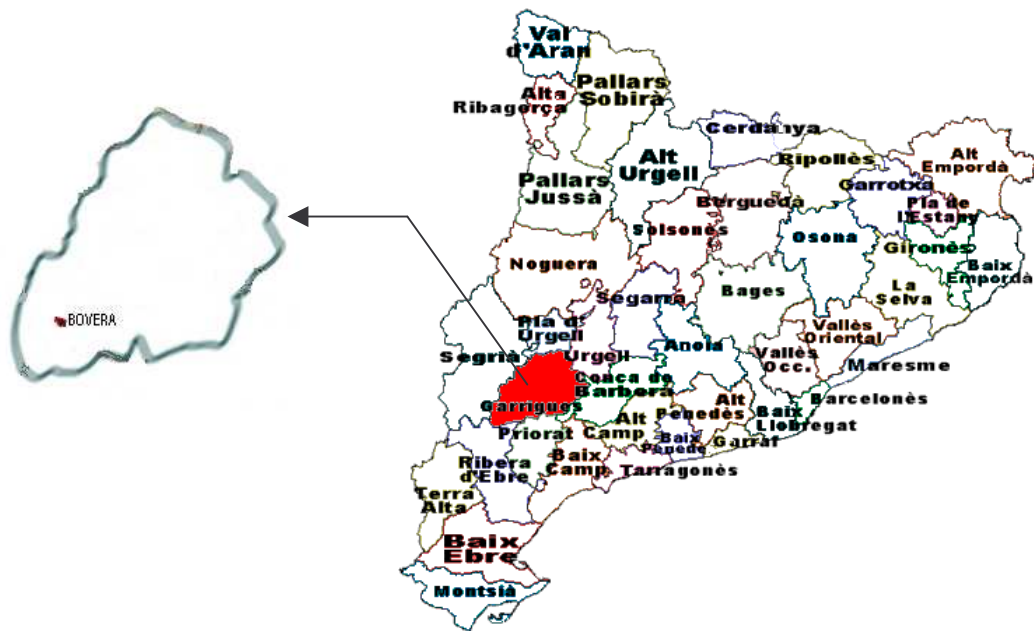


Figura 5.- Mapa de localización de la parcela experimental de Bovera en Cataluña.

5.1.2.- CARACTERIZACIÓN CLIMÁTICA

La clasificación climática según Papadakis es mediterráneo-continental, con otoños y primaveras lluviosos y veranos y inviernos secos o de baja pluviometría. La ET_0 y pluviometría medias de la zona son entorno a 950 mm y 400 mm respectivamente (Tabla 6). Se observaron diferencias entre años, siendo 1996 y 1997 más lluviosos que la media histórica, mientras que 1998 fue un año especialmente seco. El verano de 1997 fue atípicamente lluvioso, con 163 mm de pluviometría bien distribuida de junio a agosto. No existieron diferencias importantes en los valores de temperatura ni entre los años del ensayo ni respecto a la media histórica.

Tabla 6.- Temperaturas, evapotranspiración y pluviometría durante el período 1996-1998. Datos procedentes de la estación agroclimática de La Granadella (Lleida).

	Año			Media 1992-1998
	1996	1997	1998	
T (°C)	13.6	14.5	13.9	13.8
Tmax abs (°C)	37.2	35.5	37.3	39.2
T min abs (°C)	-3.6	-3.6	-2.6	-6.6
P (mm)	553	523	343	406
ET_0 (mm)	974	990	934	953

5.1.3.- MATERIAL VEGETAL

La experiencia se llevó a cabo en una plantación comercial de olivos (*Olea europaea* L.) de la variedad *Arbequina* de unos 90 años de edad, con un marco de plantación de 9.75 x 9.75 m.

5.1.4.- TRATAMIENTOS DE RIEGO

La programación de riego se realizó siguiendo la metodología propuesta por Doorenbos y Pruitt (1977) usando una simplificación del método del balance hídrico. Para el cálculo de la evapotranspiración del cultivo se utilizó la fórmula:

$$ET_c = ET_0 \times K_c \times K_r$$

Siendo,

ET_c : Evapotranspiración del cultivo.

ET_0 : Evapotranspiración de referencia calculada a partir de la fórmula de Penman modificada, con los datos de la estación climática de La Granadella situada a 5 Km de la parcela experimental.

K_c : Coeficiente de cultivo con un valor constante de 0.7 a lo largo del año (adaptado de los resultados de Goldhamer y col., 1994).

K_r : Coeficiente de reducción por superficie sombreada con un valor constante de 0.4 (adaptado de Fereres y col., 1981).

La estrategia de riego se ha basado en la reducción de agua durante el período de endurecimiento del hueso, que coincide con el período de máxima demanda evaporativa del cultivo. Se aplicaron 4 tratamientos de riego, un tratamiento control y 3 tratamientos correspondientes a estrategias de riego deficitario controlado, que se definen de la siguiente manera:

- Tratamiento control. Los árboles se riegan según las necesidades teóricas.
- Tratamiento RDC-75. Durante el período comprendido entre el inicio del endurecimiento de hueso y finales de septiembre se aplica un 75% de la dosis aplicada al tratamiento control. Durante el resto del ciclo vegetativo los árboles se riegan igual que los del tratamiento control.
- Tratamiento RDC-50. Durante el período comprendido entre el inicio del endurecimiento de hueso y finales de septiembre se aplica un 50% de la dosis aplicada al tratamiento control. Durante el resto del ciclo vegetativo los árboles se riegan igual que los del tratamiento control.
- Tratamiento RDC-25. Durante el período comprendido entre el inicio del endurecimiento de hueso y finales de septiembre se aplica un 25% de la dosis aplicada al tratamiento control. Durante el resto del ciclo vegetativo los árboles se riegan igual que los del tratamiento control.

En la tabla 7 se detalla el período de aplicación del riego deficitario controlado para los diferentes años.

Tabla 7.- Fechas correspondientes al inicio y final del período de RDC durante los tres años del ensayo.

Año	Período de RDC
1996	5/7 a 17/9
1997	17/7 a 5/10
1998	15/7 a 28/9

El volumen de agua aplicado se detalla en la tabla 8.

Tabla 8.- Cantidades de agua de riego aplicadas en la parcela experimental de Bovera.

Año	Agua total aplicada (mm)			
	Tratamientos			
	Control	RDC-75	RDC-50	RDC-25
1996	108	85	66	60
1997	153	106	90	71
1998	151	125	108	90

Fuente: Alegre, 2001

El diseño experimental es de bloques completos al azar con 5 repeticiones, con un modelo desequilibrado, que comprende entre 2 y 4 árboles por parcela (Figura 6).

5.1.5- TOMA DE MUESTRAS

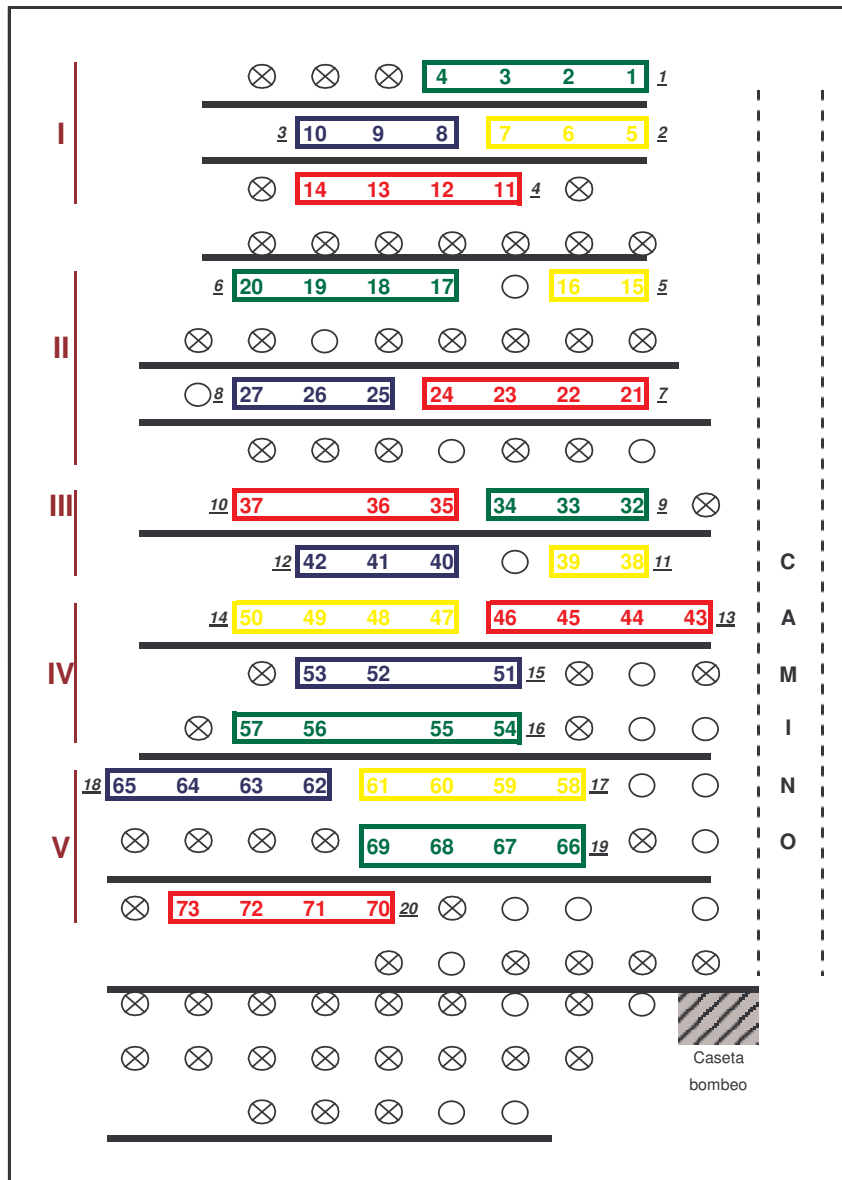
5.1.5.1.-Muestreo de frutos durante la maduración en el año 1996.

De acuerdo con lo indicado en el apartado 4.1.1 del Plan de trabajo, para estudiar la evolución de la composición química del aceite durante la maduración del fruto en función del tratamiento de riego deficitario aplicado se realizaron una serie de muestreos periódicos en el año 1996 tal y como se indica a continuación:

Los muestreos se realizaron en las siguientes fechas:

1 ^{er} muestreo	18/10/96
2 ^o muestreo	30/10/96
3 ^{er} muestreo	6/11/96
4 ^o muestreo	25/11/96

En cada muestreo se seleccionó una muestra representativa por parcela elemental en 3 de los 5 bloques de que consta el experimento, resultando un total de tres muestras por cada tratamiento de riego. Los bloques muestreados fueron el 1, 3 y 5. Los frutos se colocaron en bolsas de plástico convenientemente identificadas que se transportaron en nevera portátil al laboratorio, donde se realizaron determinaciones relacionadas con el fruto (índice de madurez y humedad). Posteriormente se extrajo el aceite en la planta piloto del Departamento de Tecnología de Alimentos de la ETSEA.



- Control
- RDC-75
- RDC-50
- RDC-25
- Número de repetición
- Número de parcela Elemental
- Límite del bancaleo

Figura 6.- Croquis de la parcela experimental de Bovera.

5.1.5.2.- Muestreo de frutos en cosecha.

Tal y como se indica en el apartado 4.1.2 del Plan de trabajo se realizaron muestreos de frutos en las campañas oleícolas 1996, 1997 y 1998. La cosecha de la finca en cada campaña se realizó manualmente por personal del área de Tecnología Frutícola del centro UdL-IRTA por peinado del árbol.

Los períodos de cosecha fueron los siguientes:

Año	Período de cosecha
1996	25/ 11 a 3/12
1997	9/12 a 22/12
1998	10/12 a 18/12

Del conjunto de frutos recolectados en cosecha se tomó una muestra de entre 2.1 y 2.5 kg por árbol que fue transportada a la planta piloto del Departamento de Tecnología de Alimentos en la ETSEA y conservadas en cámara frigorífica a 5° C, hasta la extracción del aceite con el sistema Abencor, sin que transcurriesen más de 24 horas entre la recolección y el procesado.

En 1996, para la obtención de aceite, se tomaron dos muestras representativas por parcela elemental en cada uno de los 5 bloques o repeticiones, con un total de 10 muestras por tratamiento de riego. En los años 1997 y 1998, las muestras para la obtención de aceite corresponden a cada uno de los árboles de las parcelas elementales que forman parte del diseño experimental, lo que supuso un total de 73 muestras (16 del tratamiento control, 19 del tratamiento RDC-75, 16 del tratamiento RDC-50 y 15 del tratamiento RDC-25).

Para la realización del análisis sensorial de los aceites de la campaña 1998, se enviaron 4 muestras de 1 litro, una por tratamiento de riego, en botellas de vidrio de color ámbar rellenándose el espacio de cabeza con N₂ para evitar fenómenos de oxidación, al Panel Oficial de Cata de aceite de oliva virgen de Cataluña, dependiente del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat de Cataluña.

5.1.5.3.-Muestreo de frutos durante la maduración en el año 1998.

De acuerdo con lo señalado en el apartado 4.1.3 del Plan de trabajo, para el estudio de la influencia del riego deficitario controlado sobre el contenido de polifenoles totales de la pulpa de la oliva, se tomaron periódicamente muestras de olivas de un árbol representativo de cada parcela elemental. Por lo tanto, de cada tratamiento se analizaron cinco muestras, correspondientes a cada uno de los bloques de que consta el diseño experimental.

Los muestreos se realizaron en las siguientes fechas:

1 ^{er} muestreo	4/9/98
2 ^o muestreo	28/9/98
3 ^{er} muestreo	20/10/98
4 ^o muestreo	18/11/98

La muestra consistió en 100 frutos por árbol, tomados a la altura del operador y alrededor de todo el árbol. Los frutos muestreados se colocaron en bolsas de plástico selladas y convenientemente identificadas que se transportaron en nevera portátil al laboratorio, donde se realizaron las pertinentes determinaciones.

5.2.- DISPOSITIVO EXPERIMENTAL DE RIEGO LINEAL

5.2.1.- LOCALIZACIÓN DE LA PARCELA.

El ensayo se ha realizado en una plantación comercial de olivos de la variedad *Arbequina* en el término municipal de Seròs, comarca del Segrià, provincia de Lleida (latitud N 41°26', longitud E 00°24') a una altura de unos 103 m sobre el nivel del mar (Figura 7).



Figura 7.- Mapa de localización de la parcela experimental de Seròs en Cataluña.

5.2.2.- CARACTERIZACIÓN CLIMÁTICA

La clasificación climática según Papadakis es mediterráneo-continental, con otoños y primaveras lluviosos y veranos y inviernos secos o de baja pluviometría. La ET_0 y pluviometría medias de la zona son entorno a 1000 mm y 400 mm respectivamente (Tabla 9). Se observaron diferencias entre años, siendo 1998 el menos lluvioso ya que durante los meses de verano y otoño los valores acumulados no fueron significativos. No existieron diferencias importantes en los valores de temperatura ni entre los años del ensayo ni respecto a la media histórica.

Tabla 9.- Temperaturas, evapotranspiración y pluviometría durante el período 1998-1999. Datos procedentes de la estación agroclimática de Raïmat (Lleida).

	Año		Media
	1998	1999	1990-1999
T (°C)	13.6	13.6	13.6
Tmax abs (°C)	36.6	34.6	38.8
T min abs (°C)	-6.0	-8.1	-8.1
P (mm)	316	424	400
ET_0 (mm)	1218	1073	1179

5.2.3.- MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron olivos (*Olea europaea* L.) de la variedad *Arbequina*. La plantación comercial se realizó en 1994 con un marco de plantación de 6 x 4 m.

5.2.4.- TRATAMIENTOS DE RIEGO

Con el fin de determinar la función de producción de olivos jóvenes de la variedad *Arbequina* en la zona de ensayo se plantearon 7 tratamientos basados en una variación lineal de los valores del coeficiente de cultivo (K_c).

La programación de riego se realizó siguiendo la metodología propuesta por Doorenbos y Pruitt (1977) usando una simplificación del método del balance hídrico. Para el cálculo de la evapotranspiración del cultivo se utilizó la fórmula:

$$ET_c = ET_0 \times K_c \times K_r$$

Siendo,

ET_c : Evapotranspiración del cultivo

ET_0 : Evapotranspiración de referencia calculada a partir de la fórmula de Penman modificada, con los datos de la estación climática de Raïmat

K_c : Coeficiente de cultivo que en esta experiencia de riego define los tratamientos

Tratamiento	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
K_c	0.25	0.38	0.50	0.57	0.64	0.71	0.85

K_r : Coeficiente de reducción por superficie sombreada variable debido al desarrollo del árbol. Los valores de este parámetro se encuentran detallados en la tabla 10

Tabla 10.- Coeficientes de reducción aplicados durante los dos años de ensayo de la experiencia de riego lineal.

		Tratamientos						
		T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1998	K_r	0.31	0.34	0.33	0.33	0.37	0.40	0.38
1999		0.35	0.36	0.36	0.40	0.42	0.44	0.40

Fuente: Luna, 2000

El volumen de agua aplicada se detalla en la tabla 11.

Tabla 11.- Cantidades de agua de riego aplicadas durante los dos años de ensayo de la experiencia de riego lineal.

Año	Agua total aplicada (mm)						
	Tratamientos						
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
1998	44	80	110	125	138	178	207
1999	46	84	117	146	171	219	259

Fuente: Luna, 2000

El diseño experimental es un strip-plot con 5 repeticiones, sin embargo no se ha tenido en cuenta la repetición II en la elaboración del presente documento de tesis debido a la existencia en la parcela de una ligera pendiente que provocaba una cierta acumulación de agua en dicha repetición, afectando a la programación de riego.. Cada parcela elemental consistió en 7 árboles, los dos extremos servían de guarda y los 5 centrales de observación base (Figura 8).

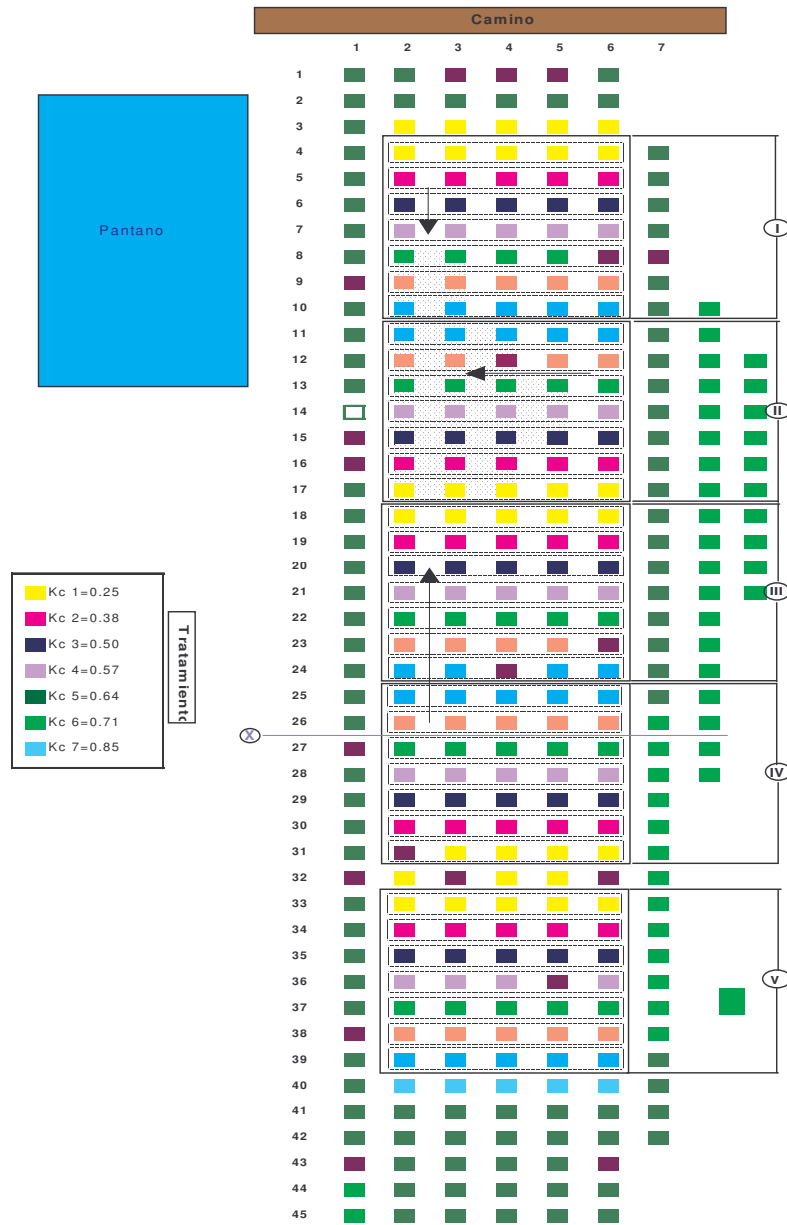


Figura 8.- Croquis de la parcel·la experimental de Seròs.

5.2.5.- MUESTREO DE FRUTOS

5.2.5.1.- Muestreo de frutos en cosecha.

Tal y como se indica en el apartado 4.2.1 del Plan de trabajo se realizaron muestreos de frutos en las campañas oleícolas 1998 y 1999. La cosecha de la finca en cada campaña se realizó manualmente por personal del área de Tecnología Frutícola del centro UdL-IRTA por peinado del árbol.

Los períodos de cosecha fueron los siguientes:

Año	Período de cosecha
1998	13/ 11 a 20/11
1999	20/11 a 27/11

Del conjunto de frutos recolectados en cosecha se tomó una muestra de entre 2.1 y 2.5 kg por árbol que fue transportada a la planta piloto del edificio de Tecnología de Alimentos en la ETSEA y conservadas en cámara frigorífica a 5 °C, hasta la extracción del aceite, sin que transcurriesen más de 24 horas entre la recolección y el procesado.

En el año 1998 se hizo un muestreo por parcela elemental. Para ello se tomaron 2 muestras representativas por parcela elemental y bloque, lo que supone un total de 8 muestras por tratamiento de riego. En 1999 se hizo un muestreo por árbol, seleccionando los 3 árboles centrales de cada una de las parcelas elementales que forman parte del diseño experimental, es decir, 3 árboles por parcela elemental y por 4 bloques muestreados (12 muestras por tratamiento de riego).

Se realizó el análisis cromatográfico de los compuestos fenólicos del aceite de la campaña 1999 de 2 de las 3 muestras disponibles por parcela elemental.

Para la realización del análisis sensorial, en la campaña 1999, se enviaron 7 muestras de 1 litro, una por tratamiento de riego, en botellas de color ámbar rellenándose el espacio de cabeza con N₂ para evitar fenómenos de oxidación, al Panel Oficial de Cata de aceite de oliva virgen de Cataluña, dependiente del Departamento de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Generalitat de Cataluña.

5.2.5.2.- Muestreo de frutos durante la maduración.

De acuerdo con lo expuesto en el apartado 4.2.2 del Plan de trabajo, para el estudio de la influencia del riego lineal sobre el contenido de polifenoles totales y la actividad enzimática de

la pulpa durante el período de maduración del fruto se tomaron periódicamente, en 1999, muestras de olivas de un árbol representativo de cada parcela elemental.

La muestra consistió en 40 frutos por árbol, tomados a la altura del operador y alrededor de todo el árbol. Los frutos muestreados se colocaron en bolsas de plástico selladas y convenientemente identificadas que se transportaron en nevera portátil al laboratorio, donde se realizaron las pertinentes determinaciones. La determinación de la actividad del enzima PAL en la pulpa de las olivas se realizó en las muestras correspondientes a los bloques II, IV y V, lo que supuso un total de 3 muestras por tratamiento.

Los muestreos se realizaron en las siguientes fechas:

1 ^{er} muestreo	30/9/99
2 ^o muestreo	14/10/99
3 ^{er} muestreo	4/11/99
4 ^o muestreo	22/11/99

5.3.- MÉTODOS ANALÍTICOS

5.3.1.- ACEITE

5.3.1.1.- Obtención del aceite y cálculo del rendimiento

El aceite obtenido a partir de las muestras de olivas procedentes de las fincas sometidas a las diferentes estrategias de riego ha sido elaborado en la planta piloto de la ETSEA de Lleida mediante un analizador de rendimiento Abencor (MC2 Ingenierías y Sistemas, Sevilla, España). Este método reproduce, a escala de planta piloto, el proceso industrial de obtención del aceite de oliva.

Las olivas se trituran mediante un molino de martillos accionado por un motor de 2 CV a 3000 rpm. De la pasta resultante, una vez homogeneizada, se toman dos muestras de unos 700 g que son procesadas independientemente. Una vez pesadas pasan a la fase de batido en una termobatidora a 25 °C durante 20 minutos. Transcurrido el tiempo se añaden 300 mL de agua caliente y se continúa el batido 10 minutos más. Posteriormente, la totalidad de la pasta batida se vierte dentro de la centrífuga vertical de tipo cesta que gira a 3500 rpm y se acciona durante 1 minuto. Se recoge el mosto oleoso, por el orificio inferior de salida de líquidos, en una probeta de plástico graduada. Se adicionan 100 mL de agua caliente en la centrífuga efectuándose una segunda centrifugación durante otro minuto. Se recoge el mosto en la misma probeta.

Después de un mínimo de 15 minutos de reposo se efectúa la lectura del volumen de aceite y se refiere al peso inicial de la pasta de olivas de acuerdo con la ecuación:

$$R = \frac{V \times d}{P} \times 100$$

Siendo,

R: Rendimiento de aceite en peso fresco (%)

V: Volumen de aceite obtenido (mL)

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

El aceite se recupera mediante una bomba peristáltica (DINKO d-21 FT) y tras ser filtrado se guarda en botellas de cristal de color ámbar en condiciones óptimas para realizar posteriormente los análisis correspondientes.

5.3.1.2.- Humedad de la pasta de olivas

Se ha realizado mediante el procedimiento de secado en estufa. En una cápsula previamente tarada se pesan 10 g de la pasta de oliva en una balanza analítica (Mettler AJ150) y se mantienen en estufa a 105 °C hasta peso constante.

La humedad de la pasta se calcula de la forma siguiente:

$$H = \frac{Ph - Ps}{Pm} \times 100$$

Siendo,

H: Humedad de la pasta (%)

Ph: Peso inicial de la cápsula con la muestra (g)

Ps: Peso final de la cápsula con la muestra desecada (g)

Pm: Peso de la muestra (g)

5.3.1.3.-Materia grasa de la pasta de olivas

Partiendo de la muestra de pasta de olivas desecada se procede a la determinación del contenido de grasa según la metodología Soxhlet. El fundamento de este procedimiento se basa en poner en contacto la materia desecada con un disolvente orgánico en caliente que produce la disolución de la grasa. Después de la extracción de la grasa se elimina el disolvente, quedando en el recipiente la grasa extraída de la muestra.

El equipo utilizado es un extractor recuperador de disolventes para la determinación de grasas y aceites en alimentos y otras materias de 6 plazas (Selecta 4000842 DET GRAS). El disolvente utilizado es éter de petróleo y la temperatura del calefactor 130 °C.

El contenido en materia grasa en base seca se calcula de la siguiente manera:

$$G = \frac{Pg}{Pm} \times 100$$

Siendo,

G: Materia grasa en base seca (%)

Pg: Peso de la grasa (g)

Pm: Peso de la muestra desecada (g)

5.3.1.4.- Grado de acidez

El grado de acidez determina la cantidad de ácidos grasos libres presentes en un aceite y se expresa en porcentaje de ácido oleico. El procedimiento consiste en disolver la muestra de aceite en una mezcla de éter etílico y etanol (1:1 v/v) previamente neutralizada y valorar con potasa alcohólica 0.1 N hasta el viraje del indicador fenolftaleina. El peso de la muestra se toma en función del grado de acidez previsto, 20 g si se prevé un grado de acidez inferior a 1 y 10 si el grado de acidez está comprendido entre 1 y 4 (Reg CEE 2568/91 Anejo II).

La acidez se calcula como:

$$A = \frac{V \times C \times M}{10 \times P}$$

Siendo,

A: Grado de acidez expresado en % de ácido oleico

V: Volumen de la solución de potasa alcohólica consumida en la valoración (mL)

C: Concentración exacta de la solución de potasa alcohólica (N)

M: Peso molecular del ácido en que se expresa el resultado (Ácido oleico 282.27)

P: Peso de la muestra de aceite (g)

5.3.1.5.- Índice de peróxidos

El índice de peróxidos valora el estado de oxidación inicial de un aceite y hace referencia a la cantidad (expresada como miliequivalentes de oxígeno activo por kg de grasa) de hidroperóxidos en la muestra que ocasionan la oxidación del yoduro potásico en las condiciones

de trabajo descritas en el Reglamento CEE 2568/91 Anejo II. El yodo liberado se valora con solución valorada de tiosulfato sódico.

En un matraz con cierre esmerilado se pesan 2 g de aceite y se disuelven en 25 mL de una solución de cloroformo:ácido acético (10:15 v/v) y se añade 1 mL de una solución saturada de yoduro potásico. Se cierra el matraz, se agita 1 minuto y se mantiene en la oscuridad 5 minutos. Transcurrido este tiempo se añaden 75 mL de agua destilada y se valora el yodo liberado con una disolución de tiosulfato sódico 0.01 N. Simultáneamente se realiza una prueba en blanco para comprobar el estado de los reactivos.

El índice de peróxidos se calcula mediante la fórmula siguiente:

$$IP = \frac{(V - V_0) \times N \times 100}{P}$$

Siendo,

IP: Índice de peróxidos expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de aceite

V: Volumen de la solución de tiosulfato sódico empleado en el ensayo (mL)

V₀: Volumen de la solución de tiosulfato sódico empleado en una prueba en blanco (mL)

N: Normalidad de la solución de tiosulfato sódico

P: Peso de la muestra de aceite (g)

5.3.1.6.- Absorbancia en el UV (K₂₇₀)

La prueba espectrofotométrica en el UV proporciona una indicación del estado de conservación de un aceite y de las modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos. La determinación de la absorbancia a 270 nm permite detectar la presencia de compuestos de la oxidación secundaria del aceite. El valor de esta absorbancia se expresa en extinción específica, extinción de una solución de la materia grasa al 1% en el disolvente determinado, en cubeta de 1 cm de espesor.

El procedimiento consiste en pesar 0.25 g de aceite en un matraz aforado de 25 mL. Se enrasa con ciclohexano y se homogeneiza. Se lee la absorbancia de la solución resultante a 270 nm frente a ciclohexano (Reg CEE 2568/91 Anejo IX).

Se expresa la extinción específica a 270 nm como:

$$K_{270} = \frac{E_{270}}{C \times E}$$

Siendo,

E_{270} : Extinción medida a 270 nm

C: concentración de la disolución (g/100 mL)

E: Espesor de la cubeta (cm)

5.3.1.7.- Perfil de ácidos grasos

El método se basa en la determinación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos del aceite de oliva mediante cromatografía de gases.

Preparación de los ésteres metílicos: La preparación de los ésteres metílicos se ha llevado a cabo de acuerdo con el Reglamento CEE 2568/91 Anejo XB, procedimiento b (con metilato sódico en tubo cerrado). En un tubo de vidrio se introducen 0.4 g de aceite, se añaden 2 mL de metilato sódico al 1.5 % y se cierra el tubo a la llama. Se mantiene el tubo al baño maría durante 2 horas a una temperatura entre 85 y 90 °C agitándolo de vez en cuando. La esterificación se habrá conseguido cuando se vuelva transparente el contenido del tubo tras la sedimentación de la glicerina y de los residuos de los reactivos. Se enfría a temperatura ambiente y se mantiene en refrigeración hasta el momento de la inyección (20 µL).

Análisis de los ésteres metílicos: Se ha determinado la composición cualitativa y cuantitativa de la mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos, obtenidos por el procedimiento anterior, por cromatografía de gases, según el método descrito en el Reg CEE 2568/91 Anejo XA. Su identificación se ha realizado por comparación de los tiempos de retención con una solución patrón de los ésteres metílicos de los ácidos grasos puros. Se han determinado los ésteres metílicos de los ácidos palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico

Se ha utilizado un cromatógrafo de la firma Hewlett Packard (HP 5890, Series II) equipado con un detector de ionización de llama y conectado a un integrador provisto del programa HP 3365 ChemStation. Se ha utilizado una columna capilar de sílice SP-2330 de 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.20 µm de espesor de fase (Supelco, USA).

Las condiciones cromatográficas han sido las siguientes:

Temperatura de la columna: 190 °C

Temperatura del inyector y el detector: 220 °C

Gas portador: Helio (1 mL min⁻¹)

Gas auxiliar: Nitrógeno (30 mL min⁻¹)

El tiempo total del análisis cromatográfico ha sido de 20 minutos.

Para su cuantificación se utiliza el método de normalización interna, es decir, se parte del principio de que todos los componentes de la muestra están representados en el cromatograma,

de manera que el total de las áreas debajo de los picos representa el 100 % de los constituyentes. Se calcula el porcentaje de un ácido dado mediante la determinación del porcentaje que representa el área de su pico en relación con la suma de las áreas de todos los picos.

5.3.1.8.- Pigmentos fotosintéticos

La valoración global del contenido en pigmentos clorofílicos y carotenoides se ha realizado siguiendo el método propuesto por Mínguez y col., (1991). El método consiste en determinar la absorbancia de una disolución de aceite de oliva a la longitud de onda de máxima absorción del componente mayoritario de la fracción clorofílica y carotenoides, es decir, la feofitina *a* y la luteína respectivamente.

El procedimiento consiste en disolver 7.5 g de aceite en ciclohexano, enrasando a 25 mL. Una vez homogeneizada la disolución se leen las absorbancias a 670 nm, para la determinación de los pigmentos clorofílicos, y a 472 nm para los pigmentos carotenoides. El espectrofotómetro es un Cecil 1000 Series.

La concentración de pigmentos clorofílicos y carotenoides, en mg de pigmento por kg de aceite, se calcula a partir de la expresión:

$$C = \frac{\epsilon \times V}{\epsilon_0 \times P}$$

Siendo,

C: Concentración de pigmento en la muestra en mg kg⁻¹ de aceite

ϵ : Absorbancia leída a 670 nm para los pigmentos clorofílicos y a 472 nm para los pigmentos carotenoides

ϵ_0 : Coeficiente de extinción específica del pigmento

ϵ_0 (feofitina *a*): 613

ϵ_0 (luteína): 2000

P: Peso de la muestra (g)

V: Volumen de la disolución de pigmentos (25 mL)

5.3.1.9.- Coordenadas instrumentales de color

Para la determinación del color se ha trabajado en el espacio cromático CIELAB, definido en 1974 por la "Commission de l'Éclairage". Se han obtenido las coordenadas L*, a* y b* deducidas a partir de los valores triestímulo X, Y, Z. La luminosidad viene representada por L* y la cromaticidad por los valores de a* y b* que corresponden respectivamente al paso de verde(-) a rojo(+) y de azul(-) a amarillo(+).

Se han determinado las coordenadas con un espectrofotómetro Macbeth Color-Eye 3000 dotado de la base informática Optiview versión 1.1. Se realizan lecturas de transmitancia con un iluminante C (luz equivalente a un día cubierto de nubes blancas) y un ángulo de observación de 10°.

5.3.1.10.- α -Tocoferol

El contenido de α -tocoferol de los aceites se ha determinado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El cromatógrafo es de la firma Waters (Waters, USA) con un sistema de gradientes Waters 600 acoplado a un detector de fotodiodos PDA (Waters 996) y a una unidad de control con el programa Millennium³².

Se realiza una inyección directa de una solución de aceite en hexano (1.5 g de la muestra de aceite enrasados a 10 mL con hexano). El volumen de inyección es 20 μ L. Se ha utilizado una columna Supelcosil LC-NH₂ (Supelco, USA) de 25 cm de largo, 0.46 cm de diámetro interno y 5 μ m de tamaño de partícula. El flujo es de 1 mL min⁻¹ y las fases móviles son hexano y acetato de etilo (70:30). La detección se realiza a 295 nm. El tiempo total del análisis cromatográfico es de 12 minutos.

La cuantificación se ha realizado mediante patrón externo y los resultados se expresan en mg de α -tocoferol por kg de aceite. Se ha comprobado la linealidad de la respuesta mediante el ajuste a una recta de los resultados del análisis de α -tocoferol (Sigma, USA) en seis muestras de patrón de concentración conocida.

5.3.1.11.- Polifenoles totales

La determinación de los polifenoles totales se ha realizado de acuerdo con el método descrito por Vázquez y col., (1973) introduciendo como modificación la utilización del reactivo Folin-Ciocalteu en vez de Folin-Denis. El procedimiento consta de dos partes, una extracción de los polifenoles del aceite de oliva y su posterior determinación colorimétrica.

Obtención del extracto de polifenoles: Se disuelven 10 g de la muestra de aceite en 50 mL de hexano y se extraen con un volumen de 3 x 10 mL de una solución de metanol:agua (60:40) en un embudo de decantación que se mantiene en agitación 2 minutos en un agitador orbital (Selecta, Rotabit). Se deja reposar para separar por decantación la fase hidroalcohólica que se recoge directamente en un matraz aforado de 50 mL que se enrasa con agua destilada.

Determinación colorimétrica de los polifenoles: El reactivo de Folin-Ciocalteu está constituido por una mezcla de ácidos fosfomolibdicos y fosfowolfrámicos que son reducidos por los polifenoles en medio básico generando una mezcla de óxidos azules de molibdeno y wolframio cuya intensidad es proporcional a la cantidad de polifenoles presentes.

El procedimiento es el siguiente: en un matraz aforado de 50 mL se adicionan 35 mL de agua destilada, 5 mL de extracto de polifenoles y 2.5 mL del reactivo Folin-Ciocalteu. Se agita para homogeneizar y tras 3 minutos se añaden 5 mL de una solución saturada de carbonato sódico. Se lleva el volumen a 50 mL con agua destilada, se mezcla todo bien y tras 1 hora de reposo se mide la absorbancia a 725 nm de una alícuota filtrada en una cubeta de 1 cm de paso. Como blanco se utiliza una solución preparada de la misma manera pero sin adicionar el extracto de polifenoles.

Para su cuantificación se realiza una curva patrón, procediendo de igual forma que en el análisis pero sustituyendo el extracto de polifenoles por disoluciones de ácido cafeico de concentración conocida. Las concentraciones de las disoluciones han estado comprendidas entre 30-450 μg de ácido cafeico por 50 mL de disolución. Los resultados se expresan como mg de ácido cafeico por kg de aceite.

5.3.1.12.- Estabilidad frente a la oxidación

La estabilidad frente a la oxidación proporciona una buena estimación de la susceptibilidad del aceite a la degeneración autoxidativa, que conduce fundamentalmente a su enranciamiento. Se ha utilizado el equipo Rancimat E-617 (Metrohm, Suiza) basado en el método desarrollado por Hadorn y Zürcher (1975), para obtener las medidas de estabilidad dinámica. El método analítico consiste en someter la muestra, 2.5 ± 0.1 g de aceite pesados en el tubo de reacción, a una oxidación forzada mediante una corriente de aire seco y filtrado a 20 L h^{-1} y a una temperatura de $120 \text{ }^\circ\text{C}$. Pasado un tiempo de inducción se desprenden componentes de degradación volátiles, mayoritariamente ácido fórmico (de Mann y col., 1987) que son retenidos en los vasos de medida conteniendo agua destilada y que se registran automáticamente mediante lecturas de la conductividad en función del tiempo. Se determina el punto final mediante el tiempo de inducción que es el tiempo necesario para llegar al punto de inflexión de la gráfica que representa la conductividad en función del tiempo y queda definido como el punto de intersección de las tangentes a las dos ramas de la gráfica. El resultado se expresa en horas.

5.3.1.13.- Índice de amargor (K_{225})

La determinación del índice de amargor se ha llevado a cabo siguiendo el método analítico desarrollado por Gutiérrez y col., (1992b) para evaluar la intensidad del atributo amargo del aceite de oliva.

El método se basa en la medida de la absorbancia de los constituyentes amargos del aceite extraídos con metanol:agua. El procedimiento de extracción de los componentes amargos consiste en hacer pasar una muestra de 1.0 ± 0.01 g de aceite disuelto en hexano a través de una columna de octadecilo de 6 mL de capacidad (Waters, USA), previa activación con metanol (6 mL) y lavado con hexano (6 mL). Después de la elución se pasan 10 mL de hexano para eliminar totalmente la grasa y finalmente los compuestos retenidos son eluidos con metanol:agua (1:1) hasta 25 mL en un matraz aforado. Se mide la absorbancia del extracto a 225 nm frente a metanol:agua (1:1) en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso. Los resultados se expresan como la absorbancia de 1 g de aceite en 100 mL.

5.3.1.14.- Determinación de compuestos fenólicos por HPLC

El procedimiento consta de dos fases, una extracción de los compuestos fenólicos del aceite de oliva y un análisis de los mismos mediante cromatografía líquida.

Extracción de los compuestos fenólicos: Los compuestos fenólicos se han extraído del aceite de oliva siguiendo el procedimiento descrito por Montedoro y col., (1992b). Se añaden 20 mL de metanol:agua (80:20 v/v) a 45 g de la muestra de aceite y se homogeneiza 2 minutos con un homogeneizador (Polytron, Kinematica AG). Se separan las dos fases por centrifugación a 3000 rpm 10 minutos (ALC 4218). Se repite una vez más este proceso. Los extractos hidroalcohólicos se combinan y se concentran a vacío a una temperatura inferior a 35 °C hasta alcanzar una consistencia de jarabe.

Se procede a la purificación del extracto añadiendo 5 mL de acetonitrilo y lavándolo 3 veces con 20 mL de hexano. Las fases apolares también se recogen y se purifican con 5 mL de acetonitrilo. Las soluciones resultantes de acetonitrilo se evaporan a vacío quedando un residuo que se disuelve en 1 mL de metanol. Antes de proceder a su inyección en el cromatógrafo se filtra el extracto a través de un filtro de jeringa de nylon de 0.45 μm y 25 mm de diámetro.

Análisis de los compuestos fenólicos por HPLC: El sistema cromatográfico está provisto de un procesador Millennium³² y consta de un inyector automático (Waters 717), un sistema de gradientes (Waters 600), un módulo calefactor y un detector de fotodiodos (Waters 996). Se ha utilizado una columna Spherisorb ODS-2 (5 μm , 25 cm x 4.6 mm).

El análisis cromatográfico se ha llevado a cabo según lo descrito por Brenes y col., (1999) con un ajuste en el gradiente de elución para mejorar la resolución de los picos. Los eluentes son 0.2% ácido acético (fase A) y metanol (fase B), y el flujo 1 mL min⁻¹. El gradiente de elución se muestra a continuación:

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	90	10
10	70	30
25	70	30
35	60	40
40	60	40
45	50	50
50	40	60
55	30	70
60	0	100
75	90	10

Los cromatogramas se procesan a 280 nm. La cuantificación se ha realizado mediante patrón externo a partir de las curvas de calibrado de cada uno de los patrones.

Compuestos de referencia: El tirosol y el ácido *p*-cumárico se han obtenido de Extrasynthèse Co. (Genay, Francia). El ácido vainílico y la vainillina de Fluka Co. (Buchs, Suiza). El hidroxitirosol ha sido proporcionado por el profesor Montedoro (Universidad de Perugia, Italia). El resto de los compuestos fenólicos se han obtenido mediante recolección de fracciones en una columna semipreparativa Spherisorb ODS-2 (5 µm, 25 cm x 10 mm) y un flujo de 4 mL min⁻¹. Las fases móviles y el gradiente de elución son los mismos que los descritos anteriormente para el análisis cromatográfico.

Por espectrometría de masas se ha verificado la identidad de los compuestos fenólicos obtenidos a partir de las fracciones purificadas. Se han realizado los espectros de masas en un modelo micromass ZMD (Waters). Los parámetros operativos específicos para la espectrometría de masas por electrospray son los siguientes:

Voltaje capilar: 2.5 KV
Voltaje del cono: 10 V
Voltaje del extractor: 5 V
Temperatura de desolvatación: 400 °C
Temperatura de la fuente: 120 °C
Temperatura de la fuente: 120 °C

5.3.1.15.- Análisis sensorial

El método clasifica el aceite de oliva en una escala numérica, relacionada con la percepción de los estímulos de su flavor, según el juicio de un grupo de catadores seleccionados constituidos en panel. La evaluación sensorial ha sido llevada a cabo por el Panel Oficial de Cata de aceite

de oliva virgen de Cataluña de acuerdo con los métodos de análisis oficiales de la Comunidad Europea (Reg CEE 2568/91 Anejo XII y posteriores modificaciones).

En primer lugar el catador huele y cata la muestra y valora la intensidad de los atributos tanto positivos como negativos, sobre una escala de intervalo estructurada de 6 puntos (Intensidad de la percepción: 0 Ausencia total, 5 Extrema) reflejándose en la hoja de valoración de la calidad del aceite donde están incluidas algunas de las percepciones sensoriales más características que suelen encontrarse con mayor frecuencia en los aceites de oliva y que describen su flavor (Atributos positivos: frutado, manzana, otras frutas maduras, verde, amargo, picante, dulce; Atributos negativos: agrio, avinado, avinagrado, ácido, basto, metálico, moho, borras, atrojado, rancio). En el caso de que se perciban otros estímulos que no se correspondan con los calificativos enumerados deberán ser anotados como “otros” empleando el calificativo/s que lo describa/n con mayor propiedad.

En segundo lugar, se establece una escala de 9 puntos (1 Calidad pésima, 9 Excepcional) para dar una puntuación única, conjunta, de las características del aceite. Esta puntuación debe ser consecuente con las virtudes y defectos encontrados en el aceite.

Para determinar la puntuación global de la muestra el jefe del panel tabulará las puntuaciones de todo el grupo y calculará la media aritmética y el error típico de la media. De acuerdo con la valoración global obtenida, los aceites se clasifican en Extra ≥ 6.5 , Virgen ≥ 5.5 , Corriente ≥ 3.5 , Lampante < 3.5 . El perfil de la muestra se obtiene calculando los valores medios de las intensidades de los distintos atributos. Proporciona una información importante para distinguir rasgos característicos de los distintos aceites.

Si el valor de la intensidad media de amargor y/o picante es superior a 2.5, al aceite se le dará la clasificación correspondiente y se hará constar que es especialmente amargo y/o picante.

5.3.2.-OLIVAS

5.3.2.1- Índice de madurez

Para la determinación del índice de madurez se toman 100 frutos de cada muestra según la metodología descrita por la estación de Olivicultura y Elaiotecnia de Jaén (Hermoso y col., 1991).

Se evalúa, de forma independiente por dos personas, la pigmentación del epicarpo y del mesocarpo de la oliva mediante una escala basada en 7 niveles de pigmentación.

Niveles de pigmentación	Color del epicarpo/mesocarpo
0	Epicarpo verde intenso
1	Epicarpo verde-amarillento
2	Epicarpo con manchas rojizas en menos de la mitad del fruto
3	Epicarpo con manchas rojizas por todo el fruto
4	Epicarpo negro sin color en el mesocarpo
5	Epicarpo negro con color en el mesocarpo sin llegar a la mitad
6	Epicarpo negro con color en el mesocarpo sin llegar al hueso
7	Epicarpo negro y mesocarpo morado hasta el hueso

El Índice de madurez se obtiene a partir de la siguiente fórmula:

$$IM = \frac{A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3 + E \times 4 + F \times 5 + G \times 6 + H \times 7}{100}$$

Siendo,

A: Número de frutos de nivel de pigmentación 0

B: Número de frutos de nivel de pigmentación 1

C: Número de frutos de nivel de pigmentación 2

D: Número de frutos de nivel de pigmentación 3

E: Número de frutos de nivel de pigmentación 4

F: Número de frutos de nivel de pigmentación 5

G: Número de frutos de nivel de pigmentación 6

H: Número de frutos de nivel de pigmentación 7

5.3.2.2.- Humedad de la pulpa

Se ha realizado mediante el procedimiento de secado en estufa. En una cápsula previamente tarada se pesan 3.0 ± 0.5 g de la pulpa de oliva en una balanza analítica (Mettler AJ150) y se mantienen en estufa a 105°C hasta peso constante.

La humedad de la pulpa se calcula de la forma siguiente:

$$H = \frac{Ph - Ps}{Pm} \times 100$$

Siendo,

H: Humedad de la pulpa (%)

Ph: Peso inicial de la cápsula con la muestra (g)

Ps: Peso final de la cápsula con la muestra desecada (g)

Pm: Peso de la muestra (g)

5.3.2.3.- Materia grasa de la pulpa

Se procede a la determinación del contenido de grasa siguiendo el mismo procedimiento que el descrito en el punto 5.3.1.3.

5.3.2.4.- Polifenoles totales de la pulpa

El procedimiento para determinar el contenido en polifenoles de la pulpa consta de dos fases, una extracción de los polifenoles de la pulpa de la oliva y su posterior determinación colorimétrica.

Obtención del extracto de polifenoles: La extracción de los polifenoles se ha llevado a cabo de acuerdo con la adaptación del método propuesto por Fantozzi y Montedoro (1978) descrito por Chimi y Atouati (1994). El procedimiento es el siguiente: se adicionan 40 mL de hexano a 1 g de pulpa triturada, y se agita durante 4 minutos. La fase superior se desecha y se repite dos veces la extracción de la fase inferior para eliminar pigmentos y grasa. La extracción de los polifenoles se lleva a cabo a partir de la pulpa desengrasada con 2 x 80 mL de metanol:agua (80:20) conteniendo 400 ppm de metabisulfito sódico. Se homogeneiza la mezcla durante 30 segundos con un homogeneizador (Polytron, Kinematica AG) y se centrifuga 5 minutos a 3000 rpm (ALC 4218). Se reúnen las fases hidrometanólicas, se enrasan a 250 mL con agua destilada y se filtran.

Determinación colorimétrica de los polifenoles: Se procede de igual manera que en el apartado 5.3.1.11 con pequeñas variaciones: el volumen de extracto adicionado es de 2 mL; las concentraciones de las disoluciones de ácido cafeico para crear la curva patrón están comprendidas entre 30-400 µg por 50 mL de disolución. El contenido en polifenoles se expresa como g de ácido cafeico por kg de peso seco de pulpa de oliva.

5.3.2.5.- Actividad enzimática del enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5)

El enzima PAL cataliza la desaminación reductora de la L-fenilalanina dando lugar a la formación de ácido *trans*-cinámico, por lo tanto para determinar su actividad se cuantifica la producción de ácido cinámico del extracto de enzima problema a partir de una concentración conocida de sustrato. La actividad enzimática PAL se expresa en µmol de ácido cinámico liberado por gramo de materia seca de pulpa de oliva por hora.

Previo a la determinación de la actividad del enzima PAL hay una fase de preparación del extracto enzimático (se realiza por duplicado). La oliva es congelada con nitrógeno líquido antes de ser triturada su pulpa y utilizada para el análisis bioquímico. El procedimiento es el siguiente: 1 g del triturado congelado es homogeneizado 30 segundos en 25 mL de tampón muy frío de fosfato potásico 0.05 M (pH 6.6) conteniendo 0.2 g de Triton X-100 con un homogeneizador

(Polytron, Kinematica AG). Se añade a la suspensión 25 mg de polivinilpirrolidona (PVPP) y se centrifuga a 4 °C, 15 minutos y 13000 rpm (Beckman, AvantiTM J-25). El sobrenadante se filtra a través de lana de vidrio y se utiliza como fuente de enzima crudo. Durante todo el análisis la muestra permanece a temperatura inferior a 4 °C.

La actividad del enzima PAL se determina de acuerdo con una adaptación del método de Zucker (1965) descrito por McCallum y Walker (1990). La solución para el ensayo enzimático (realizado por triplicado) consiste en una mezcla de 4.1 mL de tampón borato sódico 0.06 M (pH 8.8) y 0.4 mL de enzima crudo. La reacción es iniciada por la adición de 1 mL de L-fenilalanina (10 mg mL⁻¹). Los tubos de reacción son incubados a 37 °C 1 hora. La reacción se detiene por la adición de 0.5 mL de ácido trifluoroacético 35% (p/p). Los tubos son centrifugados 5 minutos a 5000g para permitir la sedimentación de las proteínas desnaturalizadas. Se realiza la medida de la absorbancia a 290 nm del sobrenadante en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso frente a un blanco que ha sido preparado de la misma manera pero sin adición de fenilalanina, para compensar los incrementos en la absorbancia en ausencia de sustrato añadido.

Para cuantificar el ácido cinámico formado en la reacción se realiza una curva patrón procediendo de igual forma que en el análisis pero sustituyendo el extracto crudo por disoluciones de ácido cinámico de concentración conocida, comprendidas entre 30-700 nanomoles de ácido cinámico.

5.4.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de las determinaciones analíticas se han procesado con el programa SAS versión 6.12 (SAS Institute Inc., Cary, USA). El análisis estadístico de los datos correspondientes a la experiencia de riego deficitario controlado se ha realizado mediante el análisis de varianza según el procedimiento GLM. La separación de medias se ha realizado, generalmente, según el test Lsmmeans por tratarse de un modelo desequilibrado. En la experiencia de riego lineal, por ser cuantitativo el factor a analizar, K_c, se ha realizado el análisis estadístico mediante regresión según el procedimiento REG. Cuando el factor a analizar era la época de muestreo se realizó un análisis de varianza según el procedimiento GLM.

En ambas experiencias de riego, la obtención del modelo que establece una relación entre la estabilidad oxidativa de los aceites y su composición química, se ha realizado mediante análisis de regresión múltiple paso a paso.

6.1.- RIEGO DEFICITARIO CONTROLADO

6.1.1.- EFECTO DEL RIEGO DEFICITARIO CONTROLADO SOBRE LA COMPOSICIÓN DEL ACEITE DURANTE EL PERÍODO DE MADURACIÓN DEL FRUTO

En el presente apartado se exponen los resultados del efecto de la aplicación del RDC a olivos de la variedad *Arbequina* sobre la composición química de los aceites obtenidos durante el período de maduración del fruto en la campaña correspondiente al año 1996, así como la humedad y el índice de madurez de las olivas. El período de muestreo está comprendido entre el 18 de octubre y el momento de cosecha, que tiene su inicio el 27 de noviembre.

6.1.1.1.- Índice de madurez, humedad y materia grasa de la oliva

En la tabla 12 se muestran los valores del índice de madurez, humedad y materia grasa de los frutos muestreados durante el período de maduración y en cosecha.

La variación de color del fruto ha sido adoptada como índice del estado de maduración. Según la escala utilizada (Hermoso y col., 1991) los primeros estados se controlan mediante la coloración del epicarpo, mientras que a partir del estado 5 ya se produce la coloración del mesocarpo. Como se observa en la tabla 12, en el momento de la cosecha las olivas ni siquiera habían alcanzado el estado 3, correspondiente a olivas con manchas rojizas por todo el fruto sin que la coloración sea totalmente negra. Este estado de madurez en cosecha es muy frecuente en la comarca de Les Garrigues. Los otoños son generalmente fríos y en muchas ocasiones aparecen nieblas que permanecen muchas horas del día, quedando limitadas las horas de exposición al sol. Por ello, la síntesis de antocianos es muy lenta y la piel sólo se colorea parcialmente. Además, en el cultivar *Arbequina* se observa una madurez muy escalonada, pudiendo encontrar al mismo tiempo en un árbol frutos de estados de madurez entre 1 y 4. El estudio de la evolución de la maduración ha mostrado que inicialmente las olivas del tratamiento RDC-25 presentan un estado de madurez más avanzado que los demás tratamientos, aunque esta diferencia es sólo significativa con respecto al tratamiento control en los dos primeros muestreos. En cosecha, aunque el estado de madurez sea ligeramente superior en el tratamiento RDC-25, las diferencias no son significativas.

En relación con el porcentaje de humedad de la oliva, en todos los muestreos se observan valores superiores en el tratamiento control, y esta diferencia se mantiene hasta el momento de cosecha. Para cada tratamiento de riego se observa una disminución en el contenido de humedad conforme el fruto madura, y de forma más acusada a partir del mes de noviembre.

Tabla 12.- Índice de madurez, contenido de humedad (%) y de materia grasa (% en base seca) de las olivas de la variedad *Arbequina* en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos en las diferentes fechas de muestreo.^(*)

<i>Fecha de muestreo</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Índice de madurez</i>	<i>Humedad %</i>	<i>Materia grasa (%)</i>
18/10/96	Control	1.41 ^a	52.81 ^a	43.76
	RDC-75	1.47 ^{ab}	49.82 ^b	41.26
	RDC-50	1.75 ^{bc}	49.31 ^b	44.12
	RDC-25	2.09 ^c	48.01 ^b	45.91
30/10/96	Control	1.90 ^a	52.17 ^a	50.04
	RDC-75	1.90 ^a	47.97 ^b	48.12
	RDC-50	2.26 ^b	48.97 ^b	47.85
	RDC-25	2.48 ^b	47.20 ^b	45.36
06/11/96	Control	1.97	48.96	52.12
	RDC-75	2.36	47.15	49.42
	RDC-50	2.48	48.01	50.09
	RDC-25	2.43	46.99	52.20
Cosecha	Control	2.34	47.45 ^a	53.42
	RDC-75	2.49	44.79 ^b	51.12
	RDC-50	2.62	45.14 ^b	52.86
	RDC-25	2.91	44.66 ^b	54.51

^(*)Valores en una misma columna con diferente letra difieren significativamente ($p < 0.05$) en relación con el tratamiento de riego, para cada fecha de muestreo independientemente.

El contenido de grasa de las olivas, expresado en base seca, se ha incrementado al avanzar la maduración de los frutos sin que se haya visto significativamente afectada por los diferentes tratamientos de riego deficitarios aplicados al olivo (Tabla 12). La velocidad de acumulación del aceite en la oliva al inicio del período de maduración (octubre), ha sido superior en el tratamiento control, RDC-75 y RDC-50 que en el tratamiento RDC-25. Sin embargo, en el

momento de la cosecha no se han encontrado diferencias en el contenido de grasa entre tratamientos. El retraso en la acumulación de aceite en el tratamiento RDC-25 podría ser consecuencia del estrés hídrico de los árboles al final del período de verano, durante el que se han aplicado las reducciones en el aporte de agua de riego a los olivos. Este tema está tratado con mayor amplitud en Alegre (2001). Similares observaciones han sido reportadas por Lavee y Wodner (1991) en condiciones de no-irrigación.

6.1.1.2.- Perfil de ácidos grasos del aceite

En la tabla 13 se muestra el perfil de ácidos grasos, expresado como porcentaje referido a los ácidos palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico y linoleico, de los aceites obtenidos a partir de las olivas muestreadas a lo largo del período de maduración del fruto y en el momento de cosecha.

Tabla 13.- Perfil de ácidos grasos, expresado en %, del aceite de la variedad *Arbequina* en relación con la fecha de muestreo y con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.^(*)

<i>Fecha de muestreo</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Palmítico</i> <i>C_{16:0}</i>	<i>Palmitoleico</i> <i>C_{16:1}</i>	<i>Esteárico</i> <i>C_{18:0}</i>	<i>Oleico</i> <i>C_{18:1}</i>	<i>Linoleico</i> <i>C_{18:2}</i>
18/10/96	<u>Control</u>	14.25	1.40	1.79	72.75	8.83
	RDC-75	14.00	1.30	1.79	73.08	8.91
	RDC-50	14.02	1.27	1.86	72.96	8.99
	RDC-25	13.90	1.20	2.00	72.86	8.99
30/10/96	Control	14.29	1.72	1.40	71.06	9.30
	RDC-75	14.40	1.57	1.46	71.03	9.38
	RDC-50	14.15	1.67	1.52	70.45	10.05
	RDC-25	14.40	1.47	1.61	70.60	9.78
06/11/96	Control	13.59	1.31	1.76	73.23	9.46
	RDC-75	13.62	1.20	1.69	73.16	9.50
	RDC-50	14.42	1.11	1.57	72.72	9.38
	RDC-25	13.75	1.21	1.66	72.46	9.68
Cosecha	Control	15.11	1.59	1.56	72.58	9.17
	RDC-75	15.51	1.72	1.37	71.73	9.68
	RDC-50	15.20	1.58	1.65	72.08	9.50
	RDC-25	15.24	1.52	1.56	72.24	9.45

^(*)No se han encontrado diferencias significativas para el nivel de significación 0.05 con relación al tratamiento de riego, para cada fecha de muestreo independientemente.

La reducción en el aporte de agua de riego a los olivos durante el período de tiempo comprendido entre principios de julio y mediados de septiembre, que coincide con el período de endurecimiento del hueso en el fruto y con el posterior crecimiento del mesocarpo debido al aumento de tamaño de las células, a la síntesis activa de lípidos y a su acumulación, no ha afectado al perfil de ácidos grasos del aceite, ya que no se han encontrado diferencias significativas entre tratamientos de riego en ninguno de los muestreos realizados, ni tan siquiera en el primer muestreo después del período de riego deficitario, cuando todos los tratamientos reciben el 100% de las necesidades hídricas del cultivo. Por lo tanto, se puede afirmar que la disponibilidad hídrica de los frutos no ha afectado a la composición de ácidos grasos de los aceites obtenidos a partir de ellos.

La evolución de los ácidos grasos con la maduración de la oliva evidencia un ligero aumento del porcentaje de ácido linoleico (Tabla 13) en todos los tratamientos a partir del segundo muestreo (30/10/96). Los productos del complejo enzimático ácido graso sintetasa son cadenas saturadas de 16 y 18 átomos de carbono, sin embargo, el estearato no se acumula, sino que el principal producto en la síntesis “de novo” de los ácidos grasos es el ácido oleico. Mientras continúa la biosíntesis de lípidos a lo largo de la maduración, el enzima oleato desaturasa estaría activo, transformando ácido oleico en linoleico, siendo el resultado neto un contenido prácticamente constante de ácido oleico y un aumento del linoleico. En líneas generales el perfil de ácidos grasos de los aceites analizados se mantiene en un estrecho margen a lo largo del período muestreado, debido probablemente a que las olivas han llegado al momento de cosecha con índices de madurez no superiores a 3. Si las olivas se recolectaran en avanzados estados de maduración quizás se podría observar una tendencia en la evolución de los diferentes porcentajes de ácidos grasos. Las olivas de la variedad *Arbequina* en la zona de Les Garrigues no se recogen en estados de maduración avanzado, en parte por su maduración escalonada y sobre todo por el elevado riesgo de heladas en los meses de noviembre y diciembre, lo que justifica que la campaña empiece incluso antes del 1 de noviembre y a mediados de diciembre esté recolectada más del 80% de la producción.

6.1.1.3.- Contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides del aceite

Los pigmentos clorofílicos y carotenoides son los responsables del color del aceite de oliva virgen, un importante atributo de calidad que influye sobre la preferencia y aceptación por parte del consumidor. Además, los pigmentos carotenoides poseen propiedades biológicas, ya que actúan como antioxidantes, y propiedades nutritivas, como precursores de la vitamina A (β -caroteno).

Los valores medios del contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides de los aceites de la variedad *Arbequina* obtenidos durante el período de maduración del fruto y en campaña, se presentan en la tabla 14.

Las principales diferencias en el contenido de pigmentos fotosintéticos de los aceites correspondientes a los diferentes tratamientos de riego se observan en el primer muestreo, realizado tras haber finalizado el período de reducción en la aplicación de agua a los olivos. Los aceites del tratamiento control muestran la menor concentración de pigmentos clorofílicos y carotenoides, éstos aumentan con la reducción en el aporte de riego al cultivo. Los aceites de los tratamientos más deficitarios muestran un mayor contenido que los aceites del tratamiento control.

Tabla 14.- Contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides, expresados como mg de feofitina a y mg de luteína kg⁻¹ de aceite, respectivamente, del aceite de la variedad *Arbequina* en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos, en las diferentes fechas de muestreo.^(*)

<i>Fecha de muestreo</i>	<i>Tratamiento</i>	Pigmentos clorofílicos	<i>Pigmentos carotenoides</i>
18/10/96	Control	8.54 ^a	8.38 ^a
	RDC-75	11.82 ^b	10.36 ^b
	RDC-50	15.95 ^c	12.38 ^c
	RDC-25	17.93 ^c	13.37 ^c
30/10/96	Control	8.48	7.93
	RDC-75	7.61	6.97
	RDC-50	7.90	6.95
	RDC-25	7.34	7.04
06/11/96	Control	8.56	7.19
	RDC-75	7.57	6.18
	RDC-50	7.84	6.44
	RDC-25	7.17	6.40
Cosecha	Control	8.28	8.23
	RDC-75	7.33	7.20
	RDC-50	6.62	7.07
	RDC-25	6.29	6.97

^(*)Valores en una misma columna con diferente letra difieren significativamente ($p < 0.05$) con relación al tratamiento de riego, para cada fecha de muestreo independientemente.

Con el transcurso del tiempo, el contenido de pigmentos fotosintéticos del aceite del tratamiento control permanece relativamente constante, mientras que en los tratamientos de riego deficitario se aprecia un descenso, particularmente marcado en los primeros estadios de maduración, presentando todos los aceites un contenido similar de pigmentos en el momento de la cosecha.

En el segundo (30/10/96) y tercer muestreo (6/11/96), así como en cosecha, no existen diferencias significativas entre tratamientos de riego, aunque los aceites del tratamiento control muestran valores ligeramente superiores.

No se puede atribuir el menor contenido de pigmentos de los aceites del tratamiento control en la primera fecha de muestreo a una maduración más avanzada, ya que tal como se muestra en la tabla 12, las olivas del tratamiento más deficitario, RDC-25, son las que presentan un índice de madurez superior.

Se observa una evolución del contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides en función de la fecha de muestreo, con una disminución significativa entre el primer y el segundo muestreo, que correspondería a la transición entre una mayoría de frutos con la piel verde amarillenta (IM 1-2) y frutos en los que ya se hace patente la aparición de manchas violáceas que indican el inicio de envero (IM 2-3) (Tabla 12).

La tendencia en la disminución de pigmentos en el aceite parece seguir un comportamiento similar al observado por Roca y Mínguez (2001) en diversas variedades españolas, quienes asumen que el patrón de cambio de los pigmentos clorofílicos consta de tres etapas: el primer cambio importante en la desaparición de estos pigmentos tiene lugar cuando se inicia la síntesis de antocianinas y aparecen las manchas rojizas en la piel de las olivas, el siguiente cambio tendría lugar cuando las olivas presentan una coloración morada en toda su superficie y el último cuando esta coloración es negra. En los aceites del presente ensayo de riego no se observan marcados descensos del contenido de pigmentos clorofílicos posteriores al observado en el segundo muestreo, debido a que las olivas no alcanzan avanzados estados de madurez, no llegando a presentar una coloración morada en toda su superficie (IM 4). Con relación a la evolución de los pigmentos carotenoides en las olivas de la variedad *Arbequina*, Roca y Mínguez (2001) también observaron un descenso en su concentración con el inicio de la maduración del fruto, aunque menos pronunciado que en el caso de los pigmentos clorofílicos.

Algunos de los resultados obtenidos son de difícil interpretación. Parece constatar que la humedad de la pasta es junto con la maduración un parámetro que afecta al contenido de pigmentos del aceite. No obstante, los datos disponibles no permiten establecer conclusiones, siendo un tema de interés para futuras investigaciones.

6.1.1.4.- Coordenadas instrumentales de color

Se han determinado los valores de las coordenadas cromáticas L^* , a^* y b^* del espacio CIELAB para evaluar el efecto del riego sobre el color del aceite y su evolución con la maduración de la oliva (Tabla 15).

Cualquier color se sitúa en un espacio tridimensional. La coordenada L^* representa la luminosidad y puede tener valores incluidos en el intervalo que va de 0 (negro) a 100 (blanco), mientras que las coordenadas a^* y b^* sitúan al color en un plano perpendicular al eje L^* . En el

eje horizontal, valores positivos de a^* indican tonalidad roja y valores negativos, verde. En el eje vertical, valores positivos de b^* indican tonalidad amarilla y negativos, tonalidad azul.

Tabla 15.- Coordenadas cromáticas L^* , a^* , b^* del aceite de la variedad *Arbequina* en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos, para cada fecha de muestreo.^(*)

<i>Fecha de muestreo</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Coordenadas cromáticas</i>		
		<i>L*</i>	<i>a*</i>	<i>b*</i>
18/10/96	Control	87.8	-3.32	102.8 ^a
	RDC-75	84.9	-2.36	109.7 ^b
	RDC-50	87.9	-2.34	111.4 ^b
	RDC-25	85.9	-2.69	114.2 ^b
30/10/96	Control	90.4	-5.45	90.1
	RDC-75	88.8	-5.31	88.6
	RDC-50	87.7	-4.19	88.1
	RDC-25	87.0	-4.37	86.7
06/11/96	Control	84.6	-5.03	87.7
	RDC-75	86.1	-5.84	86.5
	RDC-50	87.7	-5.09	88.5
	RDC-25	87.1	-5.24	84.7
Cosecha	Control	86.2	-6.13	92.3
	RDC-75	86.3	-5.10	94.4
	RDC-50	88.0	-5.40	89.5
	RDC-25	85.2	-4.79	91.7

^(*)Valores en una misma columna con diferente letra difieren significativamente ($p < 0.05$) con relación al tratamiento de riego, para cada fecha de muestreo independientemente.

Tal y como se observa en la tabla, los valores de L^* no muestran diferencias significativas entre tratamientos y permanecen prácticamente constantes a lo largo de todo el período muestreado. Se podría esperar un aumento de luminosidad en el segundo muestreo debido a la disminución observada en la concentración de pigmentos clorofílicos y carotenoides implicando una pérdida de intensidad de color, sin embargo, no ha tenido lugar.

Las diferencias en los valores de la coordenada a^* entre tratamientos de riego no han resultado ser significativamente diferentes en ningún momento del período muestreado. Con la evolución en el tiempo se observa una tendencia de la coordenada a^* a presentar valores más negativos. Esta tendencia es contraria a la observada por Mínguez y col. (1991) en aceites de otras variedades españolas diferentes a la *Arbequina*, sin embargo, concuerda con el trabajo de Motilva y col. (1998) en aceites de la variedad *Arbequina* de la DOP Les Garrigues. Aunque la coordenada a^* se haya desplazado hacia tonalidades verdes al avanzar la maduración, el rango es pequeño como para tener una implicación importante en el color final del aceite.

Respecto a la coordenada b^* , los aceites del tratamiento control muestran en el primer muestreo valores inferiores a los aceites de los tratamientos de riego deficitario, observándose un comportamiento similar al seguido por los pigmentos clorofílicos y carotenoides. Un menor contenido de pigmentos en el aceite ha supuesto un menor valor de la coordenada b^* . En las siguientes fechas de muestreo no se observan diferencias en el valor de b^* entre tratamientos de riego, al igual que no se observaron diferencias en el contenido de pigmentos del aceite. Los valores de la coordenada cromática b^* han mostrado una disminución en el segundo muestreo, manteniéndose después dentro de un rango de valores delimitado y no muy amplio. Esta disminución coincide en el tiempo con la reducción de la concentración de pigmentos fotosintéticos del aceite.

En el momento de la cosecha no se observan diferencias en el color, basado en las coordenadas L^* , a^* y b^* , entre los aceites correspondientes a los diferentes tratamientos de riego. El color de todos los aceites obtenidos en esta experiencia se sitúa en la zona de color amarillo desplazado ligeramente hacia el color verde.

6.1.1.5.- Polifenoles y estabilidad oxidativa

La fracción polar del aceite de oliva virgen, obtenida por extracción con metanol/agua, contiene compuestos fenólicos que se caracterizan convencionalmente como polifenoles. Las propiedades antioxidantes y el consiguiente valor biológico del aceite de oliva pueden atribuirse en gran medida a estos compuestos. Asimismo, tienen gran influencia en las características sensoriales de los aceites.

El contenido de polifenoles totales y la estabilidad oxidativa de los aceites procedentes de los árboles sometidos a la estrategia de riego se muestran en la tabla 16. Los aceites correspondientes a los tratamientos de riego más deficitario muestran un mayor contenido de polifenoles totales y una mayor estabilidad oxidativa que los aceites de los tratamientos control, RDC-75 y RDC-50 a lo largo de todo el período de maduración. Las mayores diferencias se observan en el primer muestreo, realizado aproximadamente un mes después de la finalización de la reducción en el aporte de agua de riego. El mayor contenido de compuestos fenólicos en

los aceites del tratamiento RDC-25 podría ser consecuencia de un aumento en la síntesis de estos compuestos en la oliva, causado por el mayor estrés hídrico al que han sido sometidos los árboles de este tratamiento de riego. La mayoría de los compuestos fenólicos se sintetizan a partir de la fenilalanina mediante la acción del enzima PAL (E.C. 4.3.1.5) y la formación del ácido trans-cinámico que es posteriormente modificado dando lugar a diversos derivados fenólicos. El enzima PAL es clave en la síntesis de los compuestos fenólicos, por lo que la influencia del estrés hídrico sobre la síntesis de los mismos podría actuar a través de un efecto sobre este enzima. Algunos autores (Patumi y col., 1999) han observado que la actividad del enzima PAL en olivas procedentes de árboles no regados es significativamente superior a la determinada en olivas de árboles irrigados.

Estas diferencias observadas en el contenido final de polifenoles en el aceite también se podrían atribuir al proceso de extracción. Tal y como se ha observado en el apartado 6.1.1.1., el contenido de agua de la oliva aumenta ligeramente al aumentar la cantidad de agua aplicada al olivo, de manera más acusada en el período posterior a la aplicación de los tratamientos de riego. Esto podría dar lugar a un mayor arrastre de compuesto hidrosolubles con el alpechín durante el proceso de extracción del aceite, lo que explicaría el menor contenido de polifenoles en los aceites procedentes de los árboles más regados.

Tabla 16.- Contenido de polifenoles totales (mg de ácido cafeico kg⁻¹ de aceite) y estabilidad (horas) del aceite de la variedad *Arbequina* en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos, en las diferentes fechas de muestreo.^(*)

<i>Fecha de muestreo</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Polifenoles</i>	<i>Estabilidad</i>
18/10/96	Control	357.4 ^a	17.9 ^a
	RDC-75	378.5 ^a	18.7 ^a
	RDC-50	428.4 ^b	19.0 ^a
	RDC-25	555.1 ^c	21.6 ^b
30/10/96	Control	397.8 ^a	17.7 ^a
	RDC-75	362.3 ^a	20.1 ^b
	RDC-50	444.5 ^b	21.9 ^c
	RDC-25	469.2 ^b	22.1 ^c

06/11/96	Control	385.7 ^a	21.4 ^a
	RDC-75	411.9 ^a	20.1 ^a
	RDC-50	411.0 ^a	19.5 ^a
	RDC-25	471.1 ^b	23.2 ^b
Cosecha	Control	340.1 ^a	22.4 ^a
	RDC-75	369.6 ^a	21.1 ^a
	RDC-50	366.0 ^a	21.7 ^a
	RDC-25	452.3 ^b	24.7 ^b

^(*)Valores en una misma columna con diferente letra difieren significativamente ($p < 0.05$) con relación al tratamiento de riego, para cada fecha de muestreo independientemente.

En relación con la estabilidad oxidativa de los aceites, no se han observado grandes cambios a lo largo del período muestreado, aunque los aceites de cosecha muestran valores ligeramente superiores. Una posible explicación para este aumento sería que en el momento de cosecha, el contenido de pigmentos clorofílicos es significativamente inferior que en los muestreos anteriores. Estos pigmentos son fotosensibilizadores, pueden capturar y concentrar la energía luminosa que se puede transmitir al oxígeno presente, convirtiéndolo en oxígeno singulete, muy reactivo (Kiritsakis y Dugan, 1985).

Paralelamente al contenido de polifenoles, los aceites del tratamiento más deficitario (RDC-25) presentan valores de estabilidad significativamente superiores, de manera más acusada en los primeros muestreos, próximos al período de aplicación de los tratamientos de riego (julio-septiembre). En el momento de la campaña estas diferencias quedan minimizadas, al igual que el contenido de polifenoles totales.

6.1.2.- EFECTO DEL RIEGO DEFICITARIO CONTROLADO SOBRE LA CALIDAD, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL ACEITE EN CAMPAÑAS OLEÍCOLAS CONSECUTIVAS

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos en la cosecha correspondiente a la campaña oleícola del año 1996 y de evaluar el efecto sobre la calidad del aceite, a más largo plazo (3 cosechas consecutivas), de la estrategia de riego deficitario controlado aplicado a los olivos de la variedad *Arbequina* durante el período de máxima demanda evaporativa, se han determinado los parámetros de calidad, composición química y evaluación organoléptica de los aceites obtenidos en las campañas 1997 y 1998. Los resultados de estos análisis se exponen en el presente apartado junto con los de la campaña 1996 con el fin de realizar una evaluación conjunta de las tres campañas.

6.1.2.1.- Índice de madurez, humedad y materia grasa de las olivas

Los valores del índice de madurez y de humedad de los frutos en el momento de la cosecha en los tres años del ensayo, se presentan en la tabla 17. Las diferencias en el índice de madurez, valorado de acuerdo con la escala de color de los frutos propuesta por la Estación de Olivicultura de Jaén, entre tratamientos de riego no han sido todos los años estadísticamente significativas. El primer año de la experiencia, 1996, se observa una cierta tendencia a presentar estados de maduración más avanzados aquellas olivas de los tratamientos menos regados. En 1997, se alcanzaron en cosecha los valores más bajos de índice de madurez respecto a los otros dos años de ensayo, siendo en este caso las olivas de la estrategia RDC-50 las que presentaron valores significativamente superiores a las de los tratamientos RDC-25 y control. El año 1998, se observó la misma tendencia que en 1996, un aumento del índice de madurez al disminuir la dosis de riego aplicada al olivo, siendo en este caso la tendencia significativa.

Tabla 17.- Índice de madurez, contenido de humedad (%) y de materia grasa (%) de las olivas de la variedad *Arbequina* los años 1996, 1997 y 1998 en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.^(*)

<i>Año</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Índice de madurez</i>	<i>% Humedad</i>	<i>% Grasa</i> ^(**)
1996	Control	2.34	47.5 ^a	53.4
	RDC-75	2.49	44.8 ^b	51.1
	RDC-50	2.62	45.1 ^b	52.9
	RDC-25	2.91	44.7 ^b	54.5
1997	Control	1.95 ^b	49.6 ^a	40.8
	RDC-75	2.00 ^{ab}	47.6 ^b	43.1
	RDC-50	2.17 ^a	47.1 ^{bc}	42.7
	RDC-25	1.91 ^b	45.7 ^c	42.0
1998	Control	2.14 ^a	46.2	44.7
	RDC-75	2.47 ^b	44.8	43.9
	RDC-50	2.58 ^b	44.1	43.3
	RDC-25	3.25 ^c	43.3	42.1

^(*) Valores en una misma columna con diferente letra difieren significativamente ($p < 0.05$) con relación al tratamiento de riego, para cada año independientemente.

^(**) Alegre (2001)

En relación con el porcentaje de humedad de la oliva (Tabla 17), en todos los años se observan valores superiores en el tratamiento control, aunque en 1998 esta diferencia no sea estadísticamente significativa. En 1997, el contenido de humedad de las olivas del tratamiento más deficitario, RDC-25, es significativamente inferior que en los tratamientos más regados, control y RDC-75. Asimismo, en 1998 el menor valor de humedad lo presentan las olivas del tratamiento RDC-25.

El porcentaje de grasa sobre peso seco no se ha visto significativamente afectado por los tratamientos de riego deficitarios aplicados al olivo (Tabla 17).

6.1.2.2.- Parámetros de calidad comercial del aceite

En la tabla 18 se presentan los resultados del análisis del grado de acidez, índice de peróxidos y absorbancia a 270 nm (K_{270}) de los aceites correspondientes al trienio 1996-98 procedentes de los diferentes tratamientos de riego. Estos parámetros, utilizados para clasificar el aceite de oliva en las diferentes categorías comerciales están más relacionados con el grado de alteración del aceite que con sus atributos de calidad.

El grado de acidez y la absorbancia a 270 nm (K_{270}) de los aceites no se ven afectados por la reducción del agua de riego durante el período de máxima demanda evaporativa del olivo. En los aceites de la campaña 1996 estos parámetros presentan valores ligeramente superiores a los de las campañas posteriores. Sin embargo, en todos los casos son considerablemente inferiores al límite de 1% expresado en ácido oleico y 0.20 establecido por la reglamentación comunitaria (Reg CEE 2568/91) para el grado de acidez y la absorbancia a 270 nm, respectivamente, de aceites de oliva virgen de la categoría virgen extra.

Tabla 18.- Parámetros de calidad del aceite de la variedad *Arbequina* de los años 1996, 1997 y 1998 en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.^(*)

<i>Año</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Grado de acidez (% ácido oleico)</i>	<i>Índice de peróxidos (meq O₂ activo kg⁻¹)</i>	<i>K₂₇₀</i>
1996	Control	0.14	3.21	0.15
	RDC-75	0.15	3.15	0.14
	RDC-50	0.14	3.01	0.12
	RDC-25	0.15	2.84	0.15
1997	Control	0.08	8.92 ^a	0.09

	RDC-75	0.08	7.76 ^b	0.09
	RDC-50	0.08	7.43 ^b	0.09
	RDC-25	0.08	7.04 ^b	0.09
1998	Control	0.09	6.92	0.11
	RDC-75	0.09	6.07	0.10
	RDC-50	0.09	6.94	0.10
	RDC-25	0.09	6.14	0.10

(*) Valores en una misma columna con diferente letra difieren significativamente ($p < 0.05$) con relación al tratamiento de riego, para cada año independientemente.

En relación con el índice de peróxidos, solamente se ha encontrado alguna diferencia significativa en una campaña. Los aceites de la campaña 1997 procedentes del tratamiento control presentaron un valor de índice de peróxidos significativamente superior al de los aceites procedentes de árboles sometidos a estrategias de riego deficitario controlado. En 1996, esta diferencia no fue estadísticamente significativa, sin embargo, los aceites del tratamiento control siguieron mostrando valores de este parámetro superiores al resto. No obstante, todos los aceites analizados cumplen la normativa CEE para aceites de oliva virgen extra, presentando un índice de peróxidos inferior a $20 \text{ meq O}_2 \text{ kg}^{-1}$ de aceite.

Estos parámetros no se han visto afectados por el riego, ya que están más relacionados con el estado y manipulación de la materia prima previa a la extracción del aceite. En el presente ensayo se ha partido de unas condiciones de homogeneidad en las operaciones de cultivo, en la recolección de las olivas, realizada manualmente por peinado del árbol, en la conservación del fruto hasta el momento de la molturación (período de tiempo inferior a 24 horas) y en la extracción del aceite mediante el sistema Abencor, por lo que resulta comprensible la ausencia de diferencias significativas entre tratamientos en estos parámetros de calidad del aceite.

6.1.2.3.- Perfil de ácidos grasos del aceite

Se ha determinado el perfil de ácidos grasos de las muestras de aceite procedentes del ensayo de riego deficitario controlado en las campañas 1996, 1997 y 1998 (Tabla 19). El perfil de ácidos grasos se ha expresado como porcentaje referido a los seis principales ácidos grasos del aceite de oliva, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico.

Tabla 19.- Perfil de ácidos grasos, expresado en %, del aceite de la variedad *Arbequina* de los años 1996, 1997 y 1998 en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.^(*)

Año	Tratamiento	Palmítico <i>C</i> _{16:0}	Palmitoleico <i>C</i> _{16:1}	Esteárico <i>C</i> _{18:0}	Oleico <i>C</i> _{18:1}	Linoleico <i>C</i> _{18:2}	Linolénico <i>C</i> _{18:3}	<i>C</i> _{18:1} / <i>C</i> _{18:2}
1996	Control	15.1	1.59	1.56	72.6	9.17	0.41	7.95
	RDC-75	15.5	1.72	1.37	71.7	9.68	0.43	7.44
	RDC-50	15.2	1.58	1.65	72.1	9.50	0.45	7.61
	RDC-25	15.2	1.52	1.56	72.2	9.45	0.45	7.65
1997	Control	15.3	2.06 ^a	1.36 ^a	70.1	11.94	0.54	5.89
	RDC-75	15.0	2.12 ^a	1.40 ^{ab}	70.4	12.00	0.50	5.92
	RDC-50	15.3	2.05 ^a	1.40 ^{ab}	69.6	12.31	0.52	5.69
	RDC-25	15.5	1.86 ^b	1.45 ^b	69.8	11.96	0.54	5.90
1998	Control	12.6	0.87	1.44 ^a	74.3 ^a	10.19 ^a	0.64	7.31
	RDC-75	12.7	0.86	1.58 ^b	73.5 ^b	10.76 ^b	0.60	6.88
	RDC-50	12.5	0.88	1.64 ^b	73.9 ^{ab}	10.51 ^{ab}	0.63	7.04
	RDC-25	12.5	0.86	1.61 ^b	73.7 ^{ab}	10.75 ^b	0.62	6.87

^(*)Valores en una misma columna con diferente letra difieren significativamente ($p < 0.05$) con relación al tratamiento de riego, para cada campaña independientemente.

En la campaña 1996 no se encontraron diferencias en el perfil de ácidos grasos del aceite en función del agua aplicada al cultivo. Sin embargo, en las campañas 1997 y 1998 se observaron diferencias en el porcentaje de ácido esteárico, siendo significativamente menor en los aceites del tratamiento control. Sólo en 1997 se observó un menor porcentaje de ácido palmitoleico en los aceites del tratamiento más deficitario RDC-25.

Los resultados de los tres años del ensayo indican que la reducción en el aporte de agua de riego durante el período de mayor demanda evaporativa del árbol no afecta de una manera significativa al perfil de ácidos grasos del aceite, a pesar del hecho de ser un momento importante en la biosíntesis y acumulación del aceite. De acuerdo con los resultados correspondientes a la parte del estudio dedicada al control de los ensayos de riego y de la respuesta del cultivo (Alegre, 2001), la reducción en el aporte de agua se inicia paralelamente al proceso de esclerificación del endocarpo de la oliva hasta el endurecimiento completo del hueso

unas 4-5 semanas más tarde (fechas aproximadas). Una vez que el hueso está totalmente formado tiene lugar el crecimiento del mesocarpo por el aumento del contenido de agua y del peso seco, debido a la acumulación de aceite que se ajusta a una sigmoide. Así, durante la fase de endurecimiento del hueso se inicia la síntesis de grasa en el fruto con un posterior incremento lineal hasta llegar a una estabilización del contenido de aceite a principios de noviembre.

La composición básica en ácidos grasos del aceite resulta considerablemente menos afectada por el riego que por las condiciones ambientales de crecimiento (Tabla 19). La variable campaña ha resultado ser el factor más influyente en la composición ácida de los aceites obtenidos en la experiencia, resultados que concuerdan con experiencias paralelas de control de aceite de la Denominación de Origen Protegida 'Les Garrigues' (Motilva y col., 2001). En la campaña 1997 se observa un mayor porcentaje de ácidos palmitoleico y linoleico, mientras que el porcentaje de ácido oleico es inferior. La relación oleico/linoleico podría ser un índice de la susceptibilidad a la oxidación del aceite debido a la mayor velocidad de oxidación del linoleato frente al oleato (Aparicio y col., 1999; Salvador y col., 1999). Dentro de una misma campaña, la relación oleico/linoleico no ha resultado ser significativamente diferente entre tratamientos, evidenciándose las diferencias entre años. En la campaña correspondiente al año 1997 la relación oleico/linoleico es notablemente inferior a las otras dos campañas. El régimen de lluvias durante el verano de 1997 podría haber afectado al metabolismo lipídico de la oliva.

6.1.2.4.- Pigmentos clorofílicos y carotenoides y coordenadas instrumentales de color

Los valores del contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides se muestran en la tabla 20. No se observa un efecto significativo de las diferentes estrategias de riego aplicadas sobre el contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides del aceite, en ninguno de los tres años de que consta el estudio. La mayoría de los aceites obtenidos son más ricos en pigmentos carotenoides que en pigmentos clorofílicos en las tres campañas analizadas. Una reducción del agua de riego durante el período de máxima demanda evaporativa del cultivo parece no haber afectado de una manera significativa el contenido de estos pigmentos en el fruto y en consecuencia su contenido en los aceites extraídos de ellos.

Al igual que lo observado en el perfil de ácidos grasos, se observa un mayor efecto del año que del riego. Los aceites del año 1997 presentan un menor contenido de pigmentos fotosintéticos en comparación con las otras campañas. Una posible explicación para este hecho podría ser que en 1997 el período de verano fue especialmente lluvioso (Tabla 6 en Material y Métodos), un 31% de la precipitación anual se concentró en este período, pudiendo implicar menos horas de sol, mientras que en 1996 y 1998 sólo un 8% de la precipitación anual cayó en el período de verano. Una menor irradiación podría tener consecuencias desde el punto de vista de la fotosíntesis. Muchos factores controlan la biosíntesis de clorofilas y en general la formación de cloroplastos. Uno de los factores más estudiados es la luz. Además del requerimiento directo de la luz para la conversión de protoclorofilida en clorofilida, la iluminación determina una más rápida formación de protoclorofilida (von Wettstein y col., 1995). Los carotenoides están

asociados a las clorofilas en los complejos fotosintéticos y actúan como pigmentos accesorios captando luz en la región del espectro en que no es captada por las clorofilas (van den Berg y col., 2000).

Tabla 20.- Contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides expresados como mg de feofitina a y mg de luteína kg^{-1} de aceite, respectivamente, de los aceites de la variedad *Arbequina* en relación con el tratamiento de riego.^(*)

<i>Año</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>Clorofilas</i>	<i>Carotenos</i>	<i>Pigmentos totales</i>
1996	Control	8.28	8.23	16.51
	RDC-75	7.33	7.20	14.53
	RDC-50	6.62	7.07	13.69
	RDC-25	6.29	6.97	12.67
1997	Control	3.84	5.15	8.73
	RDC-75	4.22	5.24	9.51
	RDC-50	3.90	4.94	8.97
	RDC-25	4.45	5.49	9.92
1998	Control	8.38	9.75	18.14
	RDC-75	6.08	9.23	15.31
	RDC-50	7.84	10.43	18.27
	RDC-25	8.29	10.88	19.17

^(*)No se han encontrado diferencias significativas para el nivel de significación 0.05 con relación al tratamiento de riego, para cada año independientemente.

La medida del color mediante las coordenadas cromáticas del espacio CIELAB (L^* , a^* y b^*) obtenidas del espectro de absorción de los aceites no ha mostrado diferencias en relación con el tratamiento de riego (Tabla 21). El color del aceite no se ha visto afectado por la reducción de agua de riego aplicada en un determinado período del ciclo vegetativo del olivo. Únicamente el parámetro a^* , que presenta valores situados en la zona de tonos verdes, muestra valores más negativos al aumentar la cantidad de agua aplicada al olivo, aunque esta tendencia no es estadísticamente significativa.

Tabla 21.- Coordenadas cromáticas L*, a* y b* del aceite de la variedad *Arbequina* en relación con el tratamiento de riego. ^(*)

Año	Tratamiento	L*	a*	b*
1996	Control	86.1	-6.13	92.3
	RDC-75	86.3	-5.10	94.4
	RDC-50	88.0	-5.40	89.5
	RDC-25	85.5	-4.79	91.7
1997	Control	90.6	-6.62	82.0
	RDC-75	89.1	-6.28	84.8
	RDC-50	89.6	-6.31	81.3
	RDC-25	89.5	-6.55	86.7
1998	Control	86.8	-3.70	112.9
	RDC-75	88.2	-3.40	110.0
	RDC-50	87.0	-3.48	114.6
	RDC-25	86.0	-2.61	118.6

^(*)No se han encontrado diferencias significativas para el nivel de significación 0.05 con relación al tratamiento de riego, para cada campaña independientemente.

Se ha observado una buena relación entre el contenido de pigmentos del aceite y las coordenadas L* y b*. En la campaña 1997, en que la concentración de pigmentos fotosintéticos es considerablemente inferior a las otras dos campañas, los valores de L*, que representan la luminosidad del aceite, son ligeramente superiores al resto de los años. La menor concentración de pigmentos implicaría una cierta pérdida de intensidad de color. La relación de la coordenada b* con los pigmentos clorofílicos y carotenoides resulta más patente. Podemos ordenar las campañas en sentido creciente de acuerdo con el contenido de pigmentos del aceite, y este orden se mantiene si las ordenamos de acuerdo con los valores de la coordenada b*. Los valores de b* se sitúan en la zona de los amarillos para los aceites del ensayo.

Debido a que los pigmentos determinan el color de los tejidos biológicos, la situación inversa, que el color puede ser una especificación del contenido de pigmentos, ha sido usado como base para entender los cambios en las concentraciones de pigmentos en procesos biológicos como por ejemplo la maduración de diversos frutos. Sin embargo, en sistemas complejos, donde están presentes dos o más pigmentos, es necesario interpretar con precaución las coordenadas triestímulo en términos de simples cambios en la composición de pigmentos porque representan el efecto neto de la concentración de los pigmentos presentes. Las predicciones *a priori* de la composición de pigmentos no siempre son válidas ya que más de una combinación puede dar lugar a un determinado conjunto de coordenadas triestímulo. Sin embargo, debido al semejante

comportamiento observado en el estudio en la variabilidad de los pigmentos clorofílicos y carotenoides y las coordenadas cromáticas, se ha realizado un análisis de correlación entre estos parámetros con la finalidad de analizar las relaciones existentes entre ellos y la posibilidad de utilizar las coordenadas de color como índices del contenido de pigmentos en los aceites de oliva virgen.

En la tabla 22 se muestran las correlaciones entre el contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides y las coordenadas cromáticas, así como con la relación b^*/L^* . Los datos de la campaña 1996 no se han incluido en la determinación de las correlaciones ya que, como se ha indicado anteriormente, algunos de los resultados obtenidos son de difícil interpretación. La coordenada L^* está negativamente relacionada con los pigmentos clorofílicos y carotenoides. Los aceites presentan valores más altos de luminosidad, mayor cantidad de luz es reflejada o transmitida, cuanto menor es el contenido de pigmentos. La coordenada cromática más estrechamente relacionada con el contenido de pigmentos en los aceites de la variedad *Arbequina* obtenidos en el ensayo de riego es la b^* , que mejora ligeramente al introducir el parámetro L^* . La relación b^*/L^* parece ser la más apropiada para estimar de una manera rápida el contenido de pigmentos fotosintéticos del aceite.

Tabla 22.- Matriz de correlación entre las coordenadas cromáticas del espacio CIELAB y la concentración de pigmentos clorofílicos y carotenoides del aceite de la variedad *Arbequina* (coeficientes de correlación y nivel de significación).

	<i>Clorofilas</i>	<i>Carotenos</i>
L^*	-0.66 0.0001	-0.66 0.0001
a^*	0.66 0.0001	0.78 0.0001
b^*	0.92 0.0001	0.95 0.0001
b^*/L^*	0.93 0.0001	0.96 0.0001

6.1.2.5.- Contenido de α -tocoferol y de polifenoles totales, estabilidad oxidativa e índice de amargor de los aceites

En la tabla 23 se presenta el contenido de α -tocoferol y polifenoles totales, componentes relacionados con la estabilidad oxidativa, y el índice de amargor (K_{225}) de los aceites clasificados según campaña y tratamiento de riego. Las determinaciones de α -tocoferol y K_{225} se realizaron en las dos últimas campañas del estudio.

En 1997, se observa un menor contenido de α -tocoferol en los aceites del tratamiento de riego más deficitario (RDC-25). En la siguiente campaña, esta diferencia no es significativa, aunque los aceites de este tratamiento siguen presentando valores inferiores al resto. Este parámetro, sin embargo, ha mostrado una variabilidad dentro de un rango muy estrecho, no presentando posiblemente relevancia en el plano biológico o nutricional.

Tabla 23.- Contenido de α -tocoferol (mg kg^{-1} de aceite) y de polifenoles totales (mg de ácido cafeico kg^{-1} de aceite), estabilidad (horas) e índice de amargor (K_{225}) del aceite de la variedad *Arbequina* de los años 1996, 1997 y 1998 en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.^(*)

<i>Año</i>	<i>Tratamiento</i>	<i>α-Tocoferol</i>	<i>Polifenoles</i>	<i>Estabilidad</i>	<i>K_{225}</i>
1996	Control	-	340.1 ^a	22.4 ^a	-
	RDC-75	-	369.6 ^a	21.1 ^a	-
	RDC-50	-	366.0 ^a	21.7 ^a	-
	RDC-25	-	452.3 ^b	24.7 ^b	-
1997	Control	209.9 ^a	52.7 ^a	8.8 ^a	0.06
	RDC-75	202.4 ^a	59.5 ^a	9.0 ^a	0.07
	RDC-50	201.8 ^a	56.2 ^a	8.7 ^a	0.06
	RDC-25	190.4 ^b	83.4 ^b	10.5 ^b	0.07
1998	Control	227.3	175.6 ^a	14.7 ^a	0.19 ^a
	RDC-75	220.6	215.4 ^b	15.9 ^a	0.21 ^{ab}
	RDC-50	224.1	206.2 ^b	15.9 ^a	0.22 ^b
	RDC-25	217.7	255.0 ^c	17.6 ^b	0.26 ^c

^(*)Valores en una misma columna con diferente letra difieren significativamente ($p < 0.05$) con relación al tratamiento de riego, para cada campaña independientemente.

En las tres campañas analizadas, el contenido de polifenoles totales de los aceites se ha visto afectado por el régimen de riego (Tabla 23). En 1998 podemos agrupar los aceites en tres grupos en función de su nivel de polifenoles. Los aceites del tratamiento RDC-25 y del tratamiento control presentan respectivamente el mayor y menor contenido de polifenoles totales, mientras que los tratamientos RDC-50 y RDC-75 ocupan una posición intermedia. En las campañas correspondientes a los años 1996 y 1997, sin embargo, los aceites del tratamiento RDC-25 son significativamente diferentes al resto. El análisis estadístico de los resultados ha mostrado un contenido de polifenoles totales significativamente superior en los aceites del tratamiento de riego más deficitario (RDC-25). Todos los años, los aceites correspondientes al tratamiento control presentan menor contenido de polifenoles totales. A la vista de los resultados se puede afirmar que al disminuir el volumen de agua de riego aplicada al olivo durante los meses de Julio-Septiembre, el período de máxima demanda evaporativa del cultivo, aumenta el contenido de polifenoles totales, siendo especialmente significativo en el caso del tratamiento más deficitario (RDC-25).

Las diferencias en el nivel de polifenoles totales de los aceites podrían ser consecuencia del mayor contenido de agua de las olivas correspondientes a los tratamientos más regados (Alegre, 2001). Al ser los polifenoles más solubles en agua que en aceite, en las pastas que presentan un porcentaje más elevado de humedad una mayor parte de estos compuestos sería arrastrada de la fase oleosa en el proceso de extracción del aceite debido al coeficiente de repartición entre dos líquidos no miscibles. El contenido de compuestos fenólicos en el aceite está también afectado por el proceso de extracción, de hecho se ha afirmado que la concentración de estos compuestos en el aceite de oliva virgen está fuertemente afectada por las condiciones del proceso de extracción (Vierhuis y col., 2001). La interacción de los compuestos fenólicos con los polisacáridos de las paredes celulares de la oliva puede reducir su paso al aceite durante la molienda y el batido. La acción del molino podría ser menos efectiva en la extracción de polifenoles en aquellas pastas procedentes de olivas con un mayor contenido de humedad. Otra posibilidad a contemplar es el hecho de que el estrés hídrico sufrido durante los meses en que se ha reducido el aporte de agua de riego a los olivos pudiera implicar una mayor síntesis de compuestos fenólicos en los frutos y consecuentemente un mayor nivel de los mismos en los aceites que se obtienen a partir de ellos. Es decir, que cambios en el nivel hídrico pudieran influir en la biosíntesis de los compuestos fenólicos, ya que son considerados como una respuesta o adaptación frente a situaciones de estrés (Dixon y Paiva, 1995; Parr y Bolwell, 2000).

Sin embargo, el contenido de polifenoles de los aceites se ha visto más afectado por el factor campaña. En 1997, donde el verano fue atípicamente lluvioso, con 163 mm de pluviometría bien distribuida de junio a agosto (Tabla 6 de Material y Métodos), el contenido de polifenoles totales del aceite fue marcadamente inferior que en los otros dos años del ensayo. En 1996, cuando se empezó a aplicar la estrategia de riego deficitario controlado, después de mucho tiempo de cultivar la parcela en condiciones de secano, se obtuvieron los valores más elevados de este parámetro. Otros autores (Pannelli y col., 1994; Ranalli y col., 1997) también han puesto

de manifiesto que la presencia de lluvias durante el crecimiento y maduración de los frutos del olivo afecta al contenido de compuestos fenólicos de los aceites obtenidos.

La estabilidad oxidativa del aceite también se ha visto afectada por la estrategia de riego aplicada al olivo, obteniéndose mayores valores de este parámetro cuanto mayor es la reducción del aporte de agua durante el período Julio-Septiembre (Tabla 23). Los valores medios de estabilidad varían principalmente en función de la campaña, siguiendo un comportamiento similar al observado en el contenido de polifenoles totales. En 1996, donde el contenido de polifenoles es superior, la estabilidad también presenta los valores más elevados, y en 1997 se observan los valores más bajos de estos dos parámetros.

La estabilidad oxidativa es un parámetro importante en la evaluación de la calidad del aceite ya que proporciona una buena estimación de su susceptibilidad a la degradación oxidativa. Está ligada a la composición acídica, dado que la presencia de mayor porcentaje de ácidos grasos insaturados en un aceite lo hace más sensible al enranciamiento, y también está ligada a la presencia/ausencia de antioxidantes y prooxidantes. Para conocer la relación entre la estabilidad oxidativa y los componentes químicos del aceite analizados en el presente estudio (ácidos grasos, pigmentos clorofílicos y carotenoides, α -tocoferol y polifenoles totales) se ha empleado la técnica estadística multivariante de regresión paso a paso (stepwise). Para determinar el modelo que define cuantitativamente la relación de dependencia del parámetro estabilidad y el resto de las variables analizadas hemos utilizado un 75% de las muestras correspondientes a las campañas 1997 y 1998, utilizando el 25% restante para validar el modelo obtenido.

El resultado de la regresión múltiple (Tabla 24) nos indica que únicamente las variables ácido oleico y polifenoles totales son significativas. Atendiendo a los coeficientes estimados, la expresión matemática de la ecuación es la siguiente:

$$\text{Estabilidad} = 8.45 \cdot 10^{-2} \cdot (\% \text{ ácido oleico}) + 4.57 \cdot 10^{-2} \cdot (\text{polifenoles totales})$$

El coeficiente de determinación múltiple ajustado indica que las dos variables logran explicar el 98.99% de la variabilidad de la estabilidad del aceite. Las dos variables son significativas a un nivel de confianza del 99%.

Tabla 24.- Análisis de regresión múltiple para la estabilidad.

Variable dependiente: Estabilidad				
Variables independientes	Coficiente estimado	Error estándar	Estadístico T	Valor p
Ácido oleico	0.0845174	0.00343823	24.5816	0.0000
Polifenoles totales	0.0457294	0.00158168	28.912	0.0000
R ² -ajustado 98.99%				

En la figura 9 están representados los valores predichos por el modelo para el conjunto de datos no incluidos inicialmente para la determinación del mismo, frente a los valores observados e indica el grado o bondad de ajuste de los datos. La recta que relaciona los valores predichos con los observados tiene una pendiente cercana a la unidad y un coeficiente de determinación elevado (91.99%).

Basándonos en los resultados obtenidos podemos indicar que el predominio de triglicéridos con ácido oleico contribuye a la estabilidad de un aceite frente a los procesos oxidativos, al tiempo que los polifenoles ejercen su actividad antioxidante debido a su naturaleza química (grupos hidroxilos unidos a un anillo fenol) prolongando el tiempo necesario para la descomposición de los hidroperóxidos formados en estos procesos de oxidación.

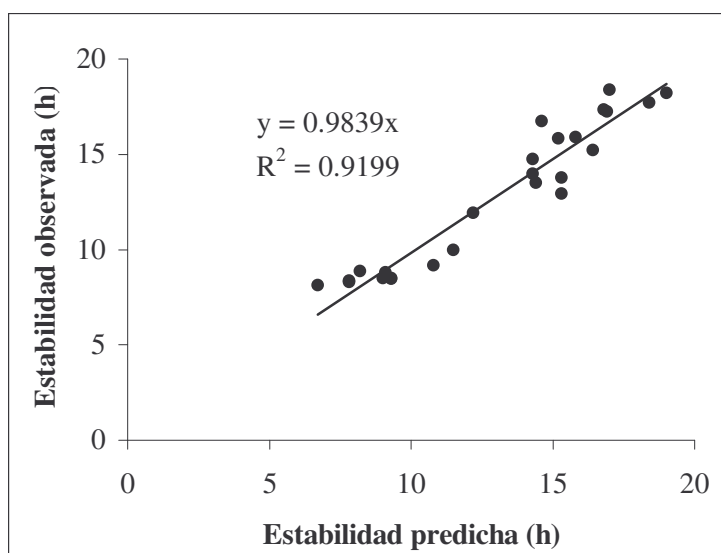


Figura 9.- Valores predichos frente a observados para la estabilidad.

El índice de amargor o K_{225} de los aceites del ensayo se presentan en la tabla 23. Se trata de una medida obtenida a través de un método analítico desarrollado para evaluar la intensidad del atributo amargo del aceite de oliva virgen, ofreciendo una alternativa a la evaluación de este atributo por parte de un panel de cata, debido a la importante correlación existente entre ellos (Gutiérrez y col., 1992b). En 1997, los tratamientos de riego no influyeron en el valor del índice de amargor, que mostró niveles muy bajos, con valores en torno a 0.06 que de acuerdo con Gutiérrez y col. (1992b) corresponden a aceites no amargos o de amargor casi imperceptible. Podemos suponer, por lo tanto, que en ninguno de los tratamientos de riego el nivel de compuestos fenólicos en el aceite fue suficientemente alto para conferir un notable amargor. En contraste, en 1998, se observa un aumento significativo del índice de amargor al disminuir el

agua de riego aplicada a los olivos, siguiendo la misma tendencia que el contenido de polifenoles en esa campaña. Se observa una gran diferencia en los valores medios del parámetro K_{225} entre los años 1997 y 1998, que podría estar relacionada con el contenido de polifenoles del aceite responsables en gran medida del sabor amargo de los aceites.

Debido a las tendencias paralelas observadas entre los polifenoles totales y el índice de amargor de los aceites, se ha procedido a determinar la relación existente entre estos dos parámetros mediante un análisis de regresión. De acuerdo con los resultados obtenidos (Tabla 25) se puede asumir que existe evidencia de que un incremento en la concentración de polifenoles totales ocasiona un incremento del índice de amargor del aceite, poniendo de manifiesto que el atributo amargo del aceite de oliva virgen está directamente relacionado con el contenido de compuestos fenólicos del aceite. El coeficiente de determinación ajustado indica que la variable contenido de polifenoles totales logra explicar el 98.58% de la variabilidad del índice de amargor.

Tabla 25.- Análisis de regresión entre las variables polifenoles totales e índice de amargor (K_{225}).

Variable dependiente: Índice de amargor				
Variab independientes	Coficiente estimado	Error estándar	Estadístico T	Valor p
Polifenoles totales	0.00105419	0.00001298	81.2249	0.0000
R ² -ajustado 98.58%				

6.1.2.6.- Características organolépticas del aceite

Tal y como se ha indicado en el apartado 5.1.5.2 de Material y Métodos, la experiencia finalizó con el análisis sensorial de los aceites obtenidos en la última campaña oleícola (1998). La clasificación comercial del aceite de oliva virgen se basa no sólo en la determinación de unos índices físico-químicos sino también en una valoración organoléptica. Las características sensoriales del aceite de oliva, que determinan su aceptación por los consumidores, son básicamente consecuencia de los volátiles y de los polifenoles (Aparicio, 1995). Los resultados de la evaluación sensorial de los aceites obtenidos en la experiencia de riego deficitario controlado durante la campaña 1998 se exponen en la tabla 26.

No se percibieron atributos negativos o defectos en los aceites de los diferentes tratamientos de riego, siendo clasificados según su puntuación global como aceites de oliva virgen extra. Las puntuaciones globales son en todos los aceites cercanas a 8.

En relación con los atributos positivos, los aceites se han caracterizado por su carácter frutado, destacando el grado de intensidad de este atributo en los aceites procedentes de los tratamientos

de riego deficitario (RDC-25, RDC-50 y RDC-75). Algunos autores afirman que el frutado es el atributo que más influye en la puntuación final de las muestras (Solé, 1995) lo que podría explicar la puntuación ligeramente más baja en los aceites del tratamiento control.

El aceite del tratamiento más deficitario, RDC-25, muestra un equilibrio de los atributos verde, amargo y picante, mientras que en el aceite del tratamiento control observamos que aquellos atributos relacionados con el nivel de polifenoles del aceite, como verde, amargo y picante, presentan intensidades ligeramente inferiores a la del resto de tratamientos. La sensación de suavidad del aceite en la boca, denominada dulzor, no se ha visto influenciada por el tratamiento de riego.

El atributo plátano maduro sólo se percibió en los aceites de los tratamientos RDC-75 y control, mientras que en el atributo manzana ocurre lo contrario, siendo sólo evidente en los tratamientos RDC-25 y RDC-50. En relación con el conjunto de atributos bajo la denominación de ‘otros atributos’, tan sólo se observa el efecto del riego en el atributo astringente, que presenta valores de intensidad más elevados en el aceite del tratamiento de riego más deficitario, RDC-25. Los demás atributos no muestran una marcada tendencia con relación a la reducción en el aporte de agua durante el período de riego deficitario.

Tabla 26.- Puntuación global y atributos sensoriales del aceite de la variedad *Arbequina* de la campaña 1998 en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.

	Tratamientos			
	<i>Control</i>	<i>RDC-75</i>	<i>RDC-50</i>	<i>RDC-25</i>
Puntuación global^a	7.8	8.1	8.2	8
Atributos positivos^b				
- Frutado	2.5	3.0	3.0	2.9
- Manzana	0	0	1.2	0.9
- Plátano maduro	0.8	1.0	0	0
- Verde	1.9	2.0	2.5	2.4
- Amargo	1.9	2.1	2.1	2.4
- Picante	2.2	2.4	2.6	2.4
- Dulce	1.9	1.8	1.8	1.8
Otros atributos				
- Astringente	0.9	1.3	1.0	1.6
- Almendra	1.2	1.3	1.1	1.3
- Anisado	0.8	0.9	0.5	0.5
- Alcachofa	0.3	0.3	0.7	0.5
- Plátano verde	0.5	0.3	0.7	0.6
- Tomate	0.6	0.9	0.9	0.5

^a 1 (calidad pésima), 9 (excepcional)

^b 0 (casi imperceptible), 1 (ligera), 2 (ligera), 3 (media), 4 (grande), 5 (extrema)

6.1.3.- EFECTO DEL RIEGO DEFICITARIO CONTROLADO SOBRE LA ACUMULACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS EN EL FRUTO DURANTE SU CRECIMIENTO Y MADURACIÓN.

Con la finalidad de determinar si las diferencias en el contenido de polifenoles del aceite entre tratamientos de riego son atribuibles a un efecto del estrés hídrico sobre la biosíntesis de estos compuestos en la oliva, o por el contrario son consecuencia de un diferente comportamiento de la pasta en el proceso de extracción relacionado con el porcentaje de humedad de los frutos, se analizó en la campaña 1998 el contenido de polifenoles totales en la oliva a lo largo de la maduración, en todos los tratamientos de riego.

En el presente apartado se exponen los resultados del estudio del efecto de la aplicación del riego deficitario controlado en olivos de la variedad *Arbequina* sobre el contenido de polifenoles totales y el porcentaje de humedad de la pulpa de la oliva así como el índice de madurez del fruto, durante el período comprendido entre el 4/9/98 y el 18/11/98, tal y como se describe en el apartado 5.1.5.3 de Material y Métodos.

Los dos primeros muestreos se realizaron en el mes de septiembre, al inicio y al final del mismo. El primero tiene lugar durante el período en que se está aplicando la reducción en el aporte de agua de riego y el segundo en el momento en que finaliza el riego deficitario. En estos dos muestreos podría ser más patente el efecto del estrés hídrico sobre los árboles. El tercer muestreo se realizó a final de octubre, momento que podría corresponder a una recuperación del estado hídrico de los olivos tras volver a ser regados según las necesidades máximas teóricas. El cuarto y último muestreo tuvo lugar a mediados de noviembre, aproximadamente dos semanas antes de iniciarse la cosecha correspondiente a la campaña 1998.

6.1.3.1.- Índice de madurez de los frutos y humedad de la pulpa

En la tabla 27 se muestran los valores del índice de madurez de las olivas y el porcentaje de humedad de la pulpa durante el período muestreado. Aunque la diferencia en el índice de madurez de los frutos entre tratamientos de riego no es estadísticamente significativa, observamos que el aumento en la dosis de riego aplicada al cultivo supone un ligero retraso en la maduración de la oliva, al menos en el período previo a la campaña oleícola.

No es hasta el tercer muestreo, a mediados de octubre, cuando se empiezan a dar los primeros cambios en la pigmentación de la piel de las olivas. El fruto, que al principio tiene una coloración verde (IM 0) vira a un color amarillento (IM 1) como consecuencia de una fuerte reducción del contenido de clorofilas (Fernández Díaz, 1971), que es la llamada maduración verde. Después comienza la acumulación de antocianinas (IM 2-3), su concentración en las células determina la intensidad del color, que puede ir del rojizo al violáceo intenso y el negro.

Tabla 27.- Índice de madurez del fruto y humedad (%) de la pulpa de las olivas de la variedad *Arbequina* en relación con la fecha de muestreo y con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.^(*)

	<i>Fecha de muestreo</i>	Tratamientos			
		<i>Control</i>	<i>RDC-75</i>	<i>RDC-50</i>	<i>RDC-25</i>
<i>Índice de madurez</i>	04/09/98	0	0	0	0
	28/09/98	0	0	0	0
	20/10/98	0.99	1.10	1.27	1.62
	18/11/98	1.23	1.62	1.87	2.11
<i>Humedad (%)</i>	04/09/98	66.44 ^a	64.05 ^b	66.26 ^a	62.90 ^b
	28/09/98	65.36 ^a	62.56 ^b	61.31 ^b	57.98 ^c
	20/10/98	63.73 ^a	60.33 ^b	59.44 ^b	57.30 ^b
	18/11/98	56.08 ^a	53.07 ^{ab}	52.79 ^{ab}	51.71 ^b

^(*)Valores en una misma fila con diferente letra difieren significativamente ($p < 0.05$) en relación con el tratamiento de riego para cada fecha de muestreo.

En relación con el contenido de humedad de la pulpa, se observa una disminución con la maduración en todos los tratamientos de riego, más acusada en los más deficitarios (RDC-25 y RDC-50). En los dos primeros muestreos es patente la relación entre el porcentaje de humedad

de la pulpa y el régimen de riego aplicado a los olivos, siendo las olivas del tratamiento más deficitario, RDC-25, las que presentan un menor porcentaje de humedad. En el segundo muestreo, que coincide con la finalización del riego deficitario, los tratamientos RDC-50 y RDC-75 presentan valores significativamente inferiores a los del tratamiento control, sin embargo, las olivas del tratamiento RDC-25 continúan mostrando los menores valores de humedad de la pulpa. En el tercer muestreo, cuando ya ha transcurrido aproximadamente un mes de la restitución del 100% de las dosis de riego, los tratamientos deficitarios presentan valores similares entre ellos e inferiores a los del tratamiento control. En el último muestreo las diferencias entre tratamientos han disminuido, observándose sólo entre los tratamientos extremos.

Estos resultados corroborarían la hipótesis formulada en apartados anteriores acerca de que el mayor contenido de polifenoles en los aceites del tratamiento RDC-25 podría ser consecuencia en parte a la menor humedad de las pastas, que propicia un menor arrastre de los compuestos hidrosolubles a la fase acuosa durante el proceso de extracción del aceite (Ranalli y col., 1997).

6.1.3.2.- Polifenoles totales de la pulpa de las olivas

En la tabla 28 se presenta el contenido de polifenoles totales en la pulpa de las olivas, expresado sobre materia seca. En relación con la fecha de muestreo el contenido de polifenoles en la pulpa de las olivas sigue una evolución decreciente durante el período muestreado en todos los tratamientos de riego, reduciéndose aproximadamente en un 50% desde el primer al último muestreo (Tabla 28). Estos resultados están de acuerdo con los estudios de Solinas y col. (1978) y Vázquez y col. (1971) quienes observaron que el contenido de polifenoles totales en pulpa, expresado en base seca, disminuía al avanzar la maduración, en diferentes variedades de oliva. Otros trabajos han mostrado una evolución decreciente de los polifenoles de la oliva al pasar de la fase verde a la fase negra, observándose un máximo hacia la fase de envero (Chimi y Atouati, 1994).

Tabla 28.- Contenido de polifenoles totales de la pulpa (g ácido cafeico kg⁻¹ pulpa seca) de las olivas de la variedad *Arbequina* en relación con la fecha de muestreo y con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.^(*)

<i>Fecha de muestreo</i>	Tratamientos			
	<i>Control</i>	<i>RDC-75</i>	<i>RDC-50</i>	<i>RDC-25</i>
04/09/98	122.8	122.6	117.6	120.7
28/09/98	104.8	96.7	90.9	94.2
20/10/98	85.3	85.5	81.3	80.4
18/11/98	64.6	69.2	62.7	66.1

(*)No se han encontrado diferencias significativas para el nivel de significación 0.05 con relación al tratamiento de riego, para cada fecha de muestreo independientemente.

A lo largo de todo el período muestreado no hemos observado diferencias entre tratamientos de riego. La disminución en el aporte de agua de riego durante el período comprendido entre mediados de julio y final de septiembre, que coincide con el período de máxima demanda evaporativa del cultivo y con el endurecimiento del hueso, no ha condicionado el contenido de compuestos fenólicos presentes en la pulpa de la oliva. Parece que el estrés hídrico al que son sometidos los olivos bajo condiciones de riego deficitario no ha afectado a la síntesis de estos compuestos. Sin embargo, hay que puntualizar que el contenido de polifenoles se ha determinado en la pulpa de la oliva, por lo que no se puede asegurar que se haya visto afectado el contenido de polifenoles del hueso. En relación con esto, se ha de considerar que una parte importante de los polifenoles del aceite lo forman los lignanos que no están presentes en el pericarpio ni en el mesocarpo de las olivas, sino tan sólo en el hueso (Owen y col., 2000a). La diferencia en el contenido fenólico entre las diferentes partes del fruto ha sido también evidenciada en otros frutos como uva (Kataoka y col., 1983) y melocotón (Kubota y col., 1992).

Por lo tanto, en futuras investigaciones sería importante profundizar en el estudio del contenido de los compuestos fenólicos de las olivas, considerando el fruto entero, para poder extraer resultados más concluyentes que determinen la influencia o no del estrés hídrico sobre la síntesis de estos compuestos.

6.1.4- DISCUSIÓN GLOBAL DEL EFECTO DEL RIEGO DEFICITARIO CONTROLADO SOBRE LA CALIDAD Y COMPOSICIÓN DEL ACEITE DE OLIVA.

El objetivo planteado durante la primera campaña oleícola del estudio (año 1996) se centró en la evaluación del efecto de la reducción de agua de riego durante el período de máxima demanda evaporativa del cultivo (período estival) sobre la composición del aceite, durante el período de maduración de la oliva y en el momento de la cosecha.

Los compuestos que se vieron principalmente afectados después del período de aplicación de las estrategias de riego deficitario controlado fueron los pigmentos clorofílicos y carotenoides y los polifenoles. El efecto observado en el primer muestreo (septiembre), sobre el contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides, mostró que los aceites de los tratamientos de RDC presentaron un contenido de los mismos significativamente superior a los del tratamiento control, especialmente los aceites de los tratamientos más deficitarios (RDC-25 y RDC-50). Al avanzar la maduración del fruto las diferencias se fueron reduciendo y en el momento de campaña los aceites de todos los tratamientos mostraron un contenido similar de pigmentos fotosintéticos.

El efecto del RDC sobre el contenido de polifenoles y paralelamente sobre la estabilidad del aceite, aunque fue especialmente notable en el primer muestreo realizado, se mantuvo hasta el momento de cosecha, siendo los aceites del tratamiento más deficitario, RDC-25, los que mostraron un contenido de polifenoles y una estabilidad frente a la oxidación significativamente superiores.

El perfil de ácidos grasos del aceite, sin embargo, no se vio afectado, ni durante el período de maduración del fruto ni en el momento de cosecha. La reducción de agua durante el período que comprende tanto el endurecimiento masivo del endocarpo como el crecimiento del mesocarpo debido al aumento de tamaño de las células, a la síntesis activa de lípidos y a su acumulación, produce un cierto retraso en la acumulación de grasa sin afectar a su composición de ácidos grasos.

Por lo tanto, se puede afirmar que los resultados de esta primera campaña mostraron que la aplicación de riego deficitario afecta a la composición del aceite durante las primeras etapas de la maduración de la oliva. Sin embargo, en el momento de la cosecha, las diferencias entre tratamientos eran mínimas, con la excepción del contenido de polifenoles y la estabilidad del aceite que aumentaban ligeramente en el tratamiento más deficitario.

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos en los aceites de la cosecha del año 1996 y de estudiar el efecto a más largo plazo de la estrategia de RDC sobre la calidad del aceite de oliva, se realizó una evaluación conjunta de los parámetros de calidad, composición química y evaluación organoléptica de los aceites obtenidos en las campañas 1996, 1997 y 1998. Se tiene que considerar el hecho de que cada campaña posee unas características peculiares. En 1996, se empezó a aplicar la estrategia de RDC tras largo tiempo de cultivar la parcela en condiciones de secano; el año 1997 se caracterizó por un verano atípicamente lluvioso, mientras que 1998 fue un año especialmente seco (Tabla 6, Material y Métodos), probablemente es este último año el más característico de la zona mediterránea donde se localiza el ensayo, por lo que será el principal punto de referencia de nuestras observaciones.

En relación con los parámetros clásicos de calidad (grado de acidez, índice de peróxidos y absorbancia a 270 nm) que permiten clasificar al aceite de oliva en las diferentes categorías comerciales, no se observó un efecto del riego sobre los mismos. No son parámetros que se puedan ver afectados por modificaciones en la síntesis de los componentes del aceite, sino que están relacionados con el estado de las olivas y su posterior manipulación.

El perfil de ácidos grasos del aceite no se vio tampoco afectado por la aplicación de estrategias de RDC, aun cuando esta aplicación tiene lugar en un momento importante de la biosíntesis y acumulación de aceite en el fruto.

Del mismo modo, una reducción del agua de riego durante el período estival no afectó al contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides del aceite, así como tampoco afectó a las

coordenadas instrumentales de color del espacio CIELAB, hecho presumible al ser los pigmentos fotosintéticos los principales responsables del color del aceite de oliva virgen.

El contenido de α -tocoferol de los aceites sólo se vio afectado de una manera significativa el año 1997, observándose un menor contenido en los aceites del tratamiento RDC-25. El rango de variación de este compuesto en el global de los aceites es demasiado estrecho como para resultar de relevancia a escala biológica o nutricional.

El parámetro que se ve principalmente afectado por la estrategia de RDC es el contenido de polifenoles del aceite y en consecuencia los parámetros dependientes de él, como son la estabilidad oxidativa y el índice de amargor. La aplicación del tratamiento deficitario RDC-25 implica la obtención de aceites con un contenido superior de polifenoles, una mayor estabilidad frente a la oxidación y un mayor índice de amargor. La calidad de estos aceites en términos de susceptibilidad a la degradación oxidativa es superior a la del resto de los aceites. Los aceites de los tratamientos deficitarios RDC-50 y RDC-75 mostraron un contenido de polifenoles significativamente superior a los aceites del tratamiento control sólo en el año 1998, sin embargo, en ninguna campaña han diferido respecto a la estabilidad oxidativa. En relación con el índice de amargor o K_{225} , los aceites de las estrategias RDC-50 y RDC-75 ocupan una posición intermedia entre los aceites del tratamiento RDC-25 y los del tratamiento control.

Las diferencias observadas en el contenido de polifenoles de los aceites del tratamiento RDC-25 podrían atribuirse al efecto del estrés hídrico sobre la síntesis de compuestos fenólicos en los frutos, considerados como una respuesta o adaptación frente a situaciones de estrés (Dixon y Paiva, 1995; Parr y Bolwell, 2000), a través de un efecto sobre el enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, E.C. 4.3.1.5) uno de los enzimas clave en la ruta fenilpropanoide. También podrían atribuirse las diferencias al proceso de extracción del aceite. Tal y como se muestra en la tabla 17, el porcentaje de humedad de la oliva presenta una tendencia a aumentar con la cantidad de agua aplicada al olivo. Esto podría dar lugar, al ser los polifenoles más solubles en agua que en aceite, a un mayor arrastre de los mismos con el alpechín durante el proceso de extracción, en aquellas pastas que presentan un porcentaje más elevado de humedad. Por otra parte, la acción del molino en el proceso de extracción del aceite, podría ser menos efectiva en la extracción de polifenoles unidos a polisacáridos de las paredes celulares de la oliva en aquellas pastas con un mayor contenido de humedad (Vierhuis y col., 2001).

Con el fin de determinar si el mayor contenido de polifenoles de los aceites del tratamiento RDC-25 pudiera ser atribuible a ambos efectos, se analizó en la campaña 1998 el contenido de polifenoles en la oliva a lo largo de la maduración del fruto, no observándose diferencias entre los distintos tratamientos de riego. De este resultado podría concluirse que el estrés hídrico al que son sometidos los olivos bajo condiciones de RDC no ha afectado a la síntesis de los compuestos fenólicos, sin embargo, el hecho que se haya determinado el contenido de polifenoles de la pulpa de las olivas da lugar a una incertidumbre debido a que una parte importante de los polifenoles del aceite lo forman los lignanos, presentes únicamente en el hueso de la oliva (Owen y col., 2000a). Por lo tanto, queda abierto el camino para profundizar

en el estudio del contenido de compuestos fenólicos de las olivas considerando el fruto entero con el fin de extraer resultados más concluyentes, ya que en este estudio se ha analizado exclusivamente el contenido de polifenoles totales de la pulpa del fruto.

El mayor índice de amargor (K_{225}) observado en los aceites del tratamiento RDC-25, no implicó notables variaciones en la puntuación global del aceite, clasificado como aceite de oliva virgen extra, siendo cercana en todos los casos a 8. Los aceites de los distintos tratamientos se caracterizaron por su carácter frutado, destacando el grado de intensidad de este atributo en los aceites de los tratamientos de RDC. El frutado parece ser un atributo que tiene un gran peso en la puntuación final del aceite. El atributo amargo, relacionado con el contenido de polifenoles del aceite, fue superior en los aceites del tratamiento RDC-25. Al resultar tan afectado el contenido de polifenoles, así como el resto de compuestos químicos del aceite determinados en este ensayo, por el factor campaña, y en especial por el régimen de lluvias durante el crecimiento y maduración de las olivas, en años muy secos la aplicación del tratamiento más deficitario (RDC-25) daría como resultado aceites con un elevado contenido de polifenoles y probablemente excesivamente amargos para su comercialización directa.

La experiencia dentro de la cual se enmarca el presente estudio está planteada con la finalidad de evaluar la posibilidad de reducir las dotaciones de riego necesarias que permiten la máxima producción. La parte del estudio dedicada a la evaluación productiva del olivo (Alegre, 2001) mostró que todas las estrategias de RDC aplicadas en el ensayo parecen útiles para la producción de aceite en olivos de la variedad *Arbequina* en condiciones similares a las del presente ensayo, representando un ahorro de la cantidad de agua de riego sin afectar a la producción de aceite. La elección de la estrategia más adecuada dependerá de las dotaciones disponibles en cada caso particular y en cada zona de producción, recomendándose la estrategia RDC-75 como la más adecuada a largo plazo. A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo y desde el punto de vista de la calidad y composición química del aceite, podemos decir que los aceites procedentes de la estrategia más deficitaria (RDC-25) son los que difieren significativamente, tomando como referencia a los aceites del tratamiento control. Los aceites de esta estrategia se caracterizan por un mayor contenido de polifenoles y por lo tanto una mayor estabilidad frente a la oxidación, pero con el riesgo subsiguiente, en función de la climatología del año, en especial el régimen de lluvias, de presentar una excesiva intensidad del atributo amargo. Los aceites de las estrategias RDC-50 y RDC-75, que suponen un ahorro del agua de riego del 35 y 24% respectivamente (Alegre, 2001), incrementan el contenido de polifenoles respecto a los aceites del tratamiento control, aunque no la estabilidad oxidativa, sólo el año 1998, siendo estos dos parámetros similares en los dos años restantes. El índice de amargor en los aceites de estas dos estrategias (RDC-50 y RDC-75) el año 1998, es ligeramente superior que en el tratamiento control, hecho igualmente patente en los resultados de la cata sensorial, donde además destacan estos aceites por una mayor intensidad del atributo frutado y una puntuación global ligeramente superior. Es decir, con la aplicación de las estrategias RDC-50 y RDC-75 se podrían conseguir importantes ahorros del agua de riego sin afectar a la calidad del aceite obtenido.

Por lo tanto, se puede concluir que, las estrategias RDC-75 y RDC-50 suponen un ahorro considerable de agua en relación con el control y sin embargo, muestran un contenido de polifenoles ligeramente más elevado, que implica una mayor intensidad del atributo frutado y una puntuación global en la evaluación sensorial ligeramente superior. La estrategia RDC-25 supone un importante ahorro de agua, pero tiene como consecuencia aceites excepcionalmente amargos y a la larga la productividad del olivo se ve afectada (de acuerdo con los resultados de Alegre,2001).

6.2.- RIEGO LINEAL

6.2.1.- EFECTO DEL RIEGO LINEAL SOBRE LA CALIDAD, COMPOSICIÓN QUÍMICA Y CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS DEL ACEITE EN CAMPAÑAS OLEÍCOLAS CONSECUTIVAS

En el presente apartado se exponen los resultados del efecto de la aplicación de estrategias de riego lineal a olivos jóvenes de la variedad *Arbequina* sobre los parámetros de calidad, composición química y evaluación organoléptica del aceite correspondiente a las dos campañas oleícolas estudiadas. El análisis estadístico de los resultados se ha realizado mediante análisis de regresión por ser el factor a analizar cuantitativo (tratamiento de riego que viene definido por el coeficiente de cultivo K_c y determina los volúmenes crecientes de agua de riego a aplicar al olivo).

6.2.1.1.- Índice de madurez y humedad de las olivas

En la tabla 29 se muestran los valores del índice de madurez y del contenido de humedad de los frutos en los dos años del ensayo, clasificados en función del tratamiento de riego aplicado a los olivos. Los valores de índice de madurez de 1999 corresponden no a las muestras de aproximadamente 2 kg que se recogieron en cosecha, sino a un muestreo de tamaño más reducido, realizado de manera independiente a la cosecha, aunque durante el período de la misma. La razón de este hecho radica en que durante el período de cosecha se produjeron importantes heladas que afectaron a la estructura de la pulpa, por lo que resultaba difícil determinar su índice de madurez sobre la base de una valoración del color del mesocarpo y epicarpo del fruto. No se ha observado en ninguno de los dos años, una relación significativa entre la cantidad de agua aplicada a los olivos y el índice de madurez de los frutos.

Respecto al porcentaje de humedad, no se ha hallado una relación significativa con el coeficiente de cultivo (K_c), sin embargo se observa una tendencia al aumento del porcentaje de humedad al incrementar las dosis de agua aplicadas, presentando los tratamientos más regados, T6 y T7 el mayor contenido de agua en la oliva.

Tabla 29.- Valores medios del índice de madurez y del contenido de humedad (%) de las olivas de la variedad *Arbequina* y el correspondiente nivel de significación del análisis de regresión en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.

<i>Año</i>	<i>Tratamiento (K_c)</i>	<i>Índice de madurez</i>	<i>Humedad (%)</i>
1998	T1 (0.25)	4.18	42.43
	T2 (0.38)	3.81	42.63
	T3 (0.50)	3.05	44.23
	T4 (0.57)	3.50	44.30
	T5 (0.64)	3.86	44.85
	T6 (0.71)	4.98	46.87
	T7 (0.85)	5.29	46.68
	Nivel de significación	NS	NS
1999	T1 (0.25)	2.92	40.35
	T2 (0.38)	3.01	41.10
	T3 (0.50)	2.19	41.75
	T4 (0.57)	3.07	41.55
	T5 (0.64)	2.96	40.93
	T6 (0.71)	2.91	43.50
	T7 (0.85)	2.82	43.79
	Nivel de significación	NS	NS

NS: no significativo (p>0.05)

6.2.1.2.- Parámetros de calidad comercial del aceite

El aceite de oliva virgen se clasifica basándose en dos aspectos fundamentales, la valoración organoléptica y los índices físico-químicos de calidad. Estos últimos son parámetros indicadores de posibles alteraciones en el aceite debidas a una deficiencia en el estado del fruto como consecuencia de plagas o enfermedades del olivo, o a una incorrecta manipulación de las olivas. En la tabla 30 se muestran los valores del grado de acidez, del índice de peróxidos y de la absorbancia a 270 nm de los aceites, clasificados según campaña y tratamiento de riego.

La aplicación de dosis crecientes de agua de riego a los olivos no ha tenido ninguna repercusión sobre el grado de acidez de los aceites obtenidos. El grado de acidez es un índice de la alteración sufrida por el fruto y de las fermentaciones que han tenido lugar en el proceso de elaboración y conservación por lo que la baja acidez encontrada en los aceites analizados habría que atribuirla a la calidad del fruto y a una correcta manipulación y extracción del aceite, que se ha llevado a cabo en un plazo máximo de 24 horas después de la recolección de la oliva.

Respecto al índice de peróxidos, tanto en 1998 como en 1999 se ha observado un aumento del mismo en los aceites procedentes de los tratamientos en los que se ha aplicado un mayor volumen de agua a los olivos, sin embargo esta tendencia no es estadísticamente significativa, mostrando este parámetro una variabilidad dentro de un rango muy estrecho (Tabla 30). El índice de peróxidos valora el estado de oxidación inicial del aceite, por lo que generalmente el aceite recién extraído no presenta valores altos. Las causas más importantes de un valor elevado del índice de peróxidos son la procedencia del fruto (suelo, heladas) y la exposición durante la elaboración y almacenamiento a los factores que provocan la oxidación de los aceites (altas temperaturas, aireación y presencia de trazas metálicas).

Tabla 30.- Valores medios de los parámetros de calidad del aceite y el correspondiente nivel de significación del análisis de regresión en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.

<i>Año</i>	<i>Tratamiento (K_c)</i>	<i>Grado de acidez (% ácido oleico)</i>	<i>Índice de peróxidos (meq O₂ activo kg⁻¹)</i>	<i>K₂₇₀</i>
1998	T1 (0.25)	0.17	5.70	0.10
	T2 (0.38)	0.15	5.80	0.11
	T3 (0.50)	0.13	5.60	0.10
	T4 (0.57)	0.15	5.70	0.10
	T5 (0.64)	0.14	5.80	0.12
	T6 (0.71)	0.13	5.60	0.11
	T7 (0.85)	0.15	6.10	0.09
Nivel de significación		NS	NS	NS
1999	T1 (0.25)	0.14	5.49	0.12
	T2 (0.38)	0.12	5.38	0.13
	T3 (0.50)	0.12	5.56	0.13
	T4 (0.57)	0.13	6.51	0.12
	T5 (0.64)	0.12	6.22	0.12
	T6 (0.71)	0.12	6.37	0.11
	T7 (0.85)	0.12	6.28	0.10
Nivel de significación		NS	NS	NS

NS: no significativo ($p > 0.05$)

No se ha encontrado una relación significativa entre la cantidad de agua aplicada al olivo y la absorbancia a 270 nm (K_{270}) (Tabla 30). Sin embargo, algunos autores (Faci y col., 2000) han observado un incremento lineal del K_{270} al aumentar la cantidad de agua de riego aplicada. La determinación de este parámetro nos indica el estado de oxidación del aceite en ese momento pero no nos informa de la posible evolución del mismo durante su almacenamiento.

Los valores del grado de acidez, índice de peróxidos y absorbancia a 270 nm de todos los aceites obtenidos en el ensayo, independientemente del tratamiento de riego al que pertenecen, son considerablemente inferiores a los valores límite establecidos por la reglamentación de la Comunidad Europea (Reg CEE 2568/91) para aceites de oliva de la categoría virgen extra, según la cual los aceites pueden tener hasta un 1% de acidez expresado en ácido oleico, 20 meq

de $O_2 \text{ kg}^{-1}$ de aceite y una absorbancia a 270 nm (K_{270}) de 0.20. Por lo tanto, se puede afirmar que la aplicación creciente de agua al olivo, en los niveles ensayados en este estudio, no afecta a los parámetros de calidad que determinan la categoría comercial del aceite de oliva virgen.

6.2.1.3.- Perfil de ácidos grasos del aceite

Se ha determinado el perfil de ácidos grasos de las muestras de aceite procedentes de los diferentes tratamientos de riego en las campañas 1998 y 1999 (Tabla 31). El perfil de ácidos grasos se ha expresado como porcentaje referido a los seis principales ácidos grasos del aceite de oliva, palmítico, palmitoleico, esteárico, oleico, linoleico y linolénico.

El efecto del tratamiento de riego sobre los porcentajes de la mayoría de los ácidos grasos del aceite varía con el año. Los ácidos palmítico y linolénico no se vieron afectados por el régimen de riego ninguno de los dos años, mientras que se observa una relación lineal positiva entre el porcentaje de ácido palmitoleico en el aceite y el volumen de agua aplicado a los olivos. Respecto al resto de ácidos grasos no se observa una relación consistente entre su porcentaje en el aceite y el tratamiento de riego aplicado. Así, en la campaña de 1998 no se ha observado un efecto significativo, pero en la campaña de 1999 se ha observado una relación lineal positiva entre la cantidad de agua de riego y el porcentaje de ácido oleico y negativa con el porcentaje de ácido linoleico.

La biosíntesis de los ácidos grasos del aceite de oliva depende de factores incontrolables como las condiciones climáticas, que difieren entre años, las particulares características de la región productora (micro-clima, características edafológicas, variedad...) y estado de madurez de las olivas entre otros. Un trabajo realizado por Tsimidou y Karakostas (1993) reveló una mayor influencia del año de cosecha en la agrupación de los aceites mediante la técnica estadística multivariante de componentes principales, que el origen o la variedad. Asimismo, en un estudio sobre la caracterización geográfica del aceite de oliva virgen de la Denominación de Origen Protegida 'Les Garrigues' Motilva y col., (2001) observaron que el factor campaña era significativo en el perfil de ácidos grasos el aceite.

Tabla 31.- Perfil de ácidos grasos del aceite y el correspondiente nivel de significación del análisis de regresión en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.

Año	Tratamiento (K_c)	Palmitico $C_{16:0}$	Palmitoleico $C_{16:1}$	Estearico $C_{18:0}$	Oleico $C_{18:1}$	Linoleico $C_{18:2}$	Linolénico $C_{18:3}$
1998	T1 (0.25)	13.4	1.38	1.71	70.4	12.4	0.81
	T2 (0.38)	13.1	1.38	1.72	71.1	11.9	0.84
	T3 (0.50)	13.7	1.59	1.70	71.1	11.2	0.81
	T4 (0.57)	13.2	1.51	1.66	71.5	11.4	0.82
	T5 (0.64)	13.6	1.75	1.69	71.1	11.2	0.75
	T6 (0.71)	13.3	1.87	1.58	71.3	11.2	0.78
	T7 (0.85)	13.4	2.01	1.55	70.9	11.5	0.77
	Nivel de significación	NS	**	*	NS	NS	NS
	R^2	-	0.90	0.74	-	-	-
	Ordenada al origen	-	1.00	1.81	-	-	-
	Pendiente	-	1.15	-0.28	-	-	-
1999	T1 (0.25)	14.6	1.11	2.00	71.6	10.1	0.48
	T2 (0.38)	14.4	1.17	2.03	72.1	9.81	0.44
	T3 (0.50)	14.6	1.33	2.07	72.0	9.55	0.44
	T4 (0.57)	14.5	1.23	1.98	72.7	9.11	0.41
	T5 (0.64)	14.5	1.15	1.99	73.1	8.91	0.40
	T6 (0.71)	14.6	1.48	1.96	72.9	8.65	0.41
	T7 (0.85)	14.5	1.50	1.95	73.3	8.31	0.41
	Nivel de significación	NS	**	NS	**	**	NS
	R^2	-	0.63	-	0.87	0.98	-
	Ordenada al origen	-	0.99	-	70.9	11.0	-
	Pendiente	-	0.53	-	2.90	-3.20	-
	Ordenadas ^A	-	NS	-	-	-	-
	Pendientes	-	NS	-	-	-	-

NS: no significativo ($p > 0.05$); * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$)^A Contraste de paralelismo y de términos independientes de las regresiones de los dos años estudiados para cada uno de los parámetros

6.2.1.4.- Pigmentos clorofílicos y carotenoides y coordenadas instrumentales de color

En la tabla 32 se exponen los resultados obtenidos en la determinación de pigmentos clorofílicos y carotenoides. Se observa una relación lineal negativa entre el coeficiente de cultivo (K_c) y el contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides del aceite en las dos campañas, lo que implica una reducción de los pigmentos del aceite al aumentar la cantidad de agua de riego aplicada al olivo. Las pendientes de las rectas de regresión no presentaron valores significativamente diferentes entre años, sin embargo, los valores de las ordenadas en las rectas de regresión de los pigmentos clorofílicos sí, es decir, el tratamiento de riego afectó de la misma manera al contenido de pigmentos fotosintéticos del aceite y el hecho distintivo entre campañas es el menor contenido de clorofilas el año 1998.

Tabla 32.- Valores medios del contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides expresados como mg de feofitina *a* y mg de luteína kg^{-1} de aceite, respectivamente, y el correspondiente nivel de significación del análisis de regresión en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.

Año	Tratamiento (K_c)	Clorofilas	Carotenos
1998	T1 (0.25)	4.40	7.71
	T2 (0.38)	4.56	5.63
	T3 (0.50)	4.01	5.43
	T4 (0.57)	3.74	4.76
	T5 (0.64)	3.81	4.56
	T6 (0.71)	1.66	2.40
	T7 (0.85)	1.16	2.21
	Nivel de significación	**	**
R^2	0.76	0.92	
Ordenada al origen	6.07	9.72	
Pendiente	-4.47	-9.06	
1999	T1 (0.25)	8.49	9.69

T2 (0.38)	9.14	9.92
T3 (0.50)	8.30	8.64
T4 (0.57)	7.75	8.17
T5 (0.64)	7.13	7.63
T6 (0.71)	5.39	6.32
T7 (0.85)	5.25	6.06
Nivel de significación	**	**
R ²	0.80	0.91
Ordenada al origen	11.1	12.1
Pendiente	-6.76	-7.17
Ordenadas ^A	**	NS
Pendientes	NS	NS

NS: no significativo ($p > 0.05$); * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$)

^A Contraste de paralelismo y de términos independientes de las regresiones de los dos años estudiados para cada uno de los parámetros

Una posible explicación para la disminución de los pigmentos clorofílicos y carotenoides al aumentar el volumen de agua aplicada al cultivo estaría relacionada con el hecho de que las pastas de las olivas de los tratamientos más regados (T6 y T7) son más fluidas debido a su contenido de agua ligeramente superior (Tabla 29) por lo que atraviesan las cribas del molino más rápidamente sufriendo sus tejidos menos daño, lo que podría implicar una reducción de la extracción de pigmentos, localizados en su mayor parte en los tejidos epidérmicos. Los aceites que contienen más pigmentos clorofílicos son a su vez los más ricos en pigmentos carotenoides, lo que indica que las posibles modificaciones en el proceso de extracción son paralelas. El exceso de agua podría condicionar una menor obtención de coloración del aceite y proporcionar un comportamiento anormal con una notable falta de textura de la pulpa de estas olivas (Martínez y col., 1975).

El color es una característica fundamental en la calidad del aceite de oliva virgen, directamente relacionado con el contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides, por lo que la tonalidad del aceite sigue igual evolución que los pigmentos. En la tabla 33 se muestran los valores de las coordenadas cromáticas L*, a* y b*. L* representa la luminosidad y puede tener valores incluidos en el intervalo que va de 0 (negro) a 100 (blanco), a* representa la cantidad de rojo (+) a verde (-) y b* representa la cantidad de amarillo (+) a azul (-). Al igual que el contenido de pigmentos fotosintéticos, el color de los aceites se ha visto afectado por el riego.

El valor de L* aumenta de una manera lineal con el agua de riego aplicada al cultivo. Los valores de las pendientes de las dos rectas que definen esta relación no son significativamente diferentes aunque sí lo son sus ordenadas, por lo tanto la diferencia entre campañas radica en que en 1998 los aceites presentan colores más luminosos que en 1999. Una parte de la luz que incide sobre el aceite es reflejada, otra es transmitida y otra es captada por los pigmentos fotosintéticos del aceite. El parámetro L* hace referencia a la cantidad de luz reflejada o

transmitida dentro de un mismo tono y saturación por lo que en los aceites de 1999 en los que el contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides es superior, la luz captada por éstos será también superior implicando aceites menos luminosos con valores inferiores de L^* . Este hecho también podría dar razón del aumento de luminosidad al aumentar el volumen de agua aplicada al olivo, ya que como hemos indicado anteriormente, a mayor dosis de agua de riego menor contenido de pigmentos en el aceite.

Existe una relación lineal de pendiente negativa entre el coeficiente de cultivo (K_c) y las coordenadas cromáticas a^* y b^* (tonalidad). La tendencia seguida por a^* ha sido la misma durante los dos años, no observándose diferencias significativas ni entre pendientes ni entre ordenadas. En relación con el parámetro b^* , al aumentar el volumen de agua aplicada a los árboles su valor disminuye más rápidamente en los aceites obtenidos en 1998 que en los de 1999. Algunos trabajos evidencian una clara relación entre b^* y el contenido de pigmentos carotenoides (Mínguez y col., 1991). En 1998 los aceites pertenecientes a los tratamientos más regados mostraron un contenido de pigmentos carotenoides marcadamente inferior que los de tratamientos menos regados.

De acuerdo con trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación en aceites comerciales de la variedad *Arbequina* (Motilva y col., 1998) observamos una tendencia de la coordenada a^* hacia valores más negativos (zona verde) y de la b^* hacia valores inferiores (zona azul) en aquellos aceites con menor contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides.

Tabla 33.- Valores medios de las coordenadas cromáticas L^* , a^* y b^* de los aceites y el correspondiente nivel de significación del análisis de regresión en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.

<i>Año</i>	<i>Tratamiento (K_c)</i>	L^*	a^*	b^*
1998	T1 (0.25)	90.2	-3.44	85.1
	T2 (0.38)	90.0	-4.28	81.4
	T3 (0.50)	89.7	-4.21	77.7
	T4 (0.57)	90.6	-4.85	72.1
	T5 (0.64)	90.9	-5.48	66.8
	T6 (0.71)	94.6	-5.85	38.3
	T7 (0.85)	94.7	-6.47	32.8
Nivel de significación		*	**	**

	R ²	0.64	0.95	0.82
	Ordenada al origen	87.5	-2.10	117.3
	Pendiente	6.30	-5.10	-94.0
1999	T1 (0.25)	84.0	-2.46	108.4
	T2 (0.38)	84.7	-2.52	112.3
	T3 (0.50)	84.0	-2.70	105.7
	T4 (0.57)	84.3	-3.95	103.4
	T5 (0.64)	85.7	-3.78	105.1
	T6 (0.71)	86.6	-4.77	95.8
	T7 (0.85)	88.3	-5.04	93.9
	Nivel de significación	**	**	**
	R ²	0.74	0.87	0.78
	Ordenada al origen	81.5	-0.84	119.7
	Pendiente	6.94	-4.97	-29.0
	Ordenadas ^A	*	NS	NS
	Pendientes	NS	NS	**

NS: no significativo ($p > 0.05$); * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$)

^A Contraste de paralelismo y de términos independientes de las regresiones de los dos años estudiados para cada uno de los parámetros

Las modificaciones del color de los aceites al aplicar dosis de agua crecientes al olivo han mostrado una tendencia semejante a la observada en el contenido de pigmentos carotenoides y clorofílicos. En consecuencia, se ha realizado un análisis de correlación entre las coordenadas tricromáticas y las concentraciones de pigmentos fotosintéticos con el fin de confirmar su relación, así como para determinar qué coordenada cromática está más relacionada con el contenido de pigmentos de los aceites de la variedad *Arbequina* correspondientes al presente ensayo.

En la tabla 34 se muestra la matriz de correlación, para cada uno de los años de experimentación, entre el contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides y las coordenadas cromáticas. Se observa una correlación negativa entre la luminosidad de los aceites y su contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides, lo que significa que los aceites con menor contenido de pigmentos fotosintéticos presentan mayor luminosidad. Se ha observado una correlación positiva entre el valor de a^* y los pigmentos clorofílicos, contrariamente a lo observado por Mínguez y col. (1991) en aceites de la variedad *Hojiblanca*, quienes encontraron correlaciones negativas entre ambos parámetros. El coeficiente de correlación es igualmente positivo pero superior en aquellos casos en que participa la coordenada b^* y los pigmentos carotenoides, y esta correlación se ve mejorada cuando introducimos el coeficiente b^*/L^* , considerado de interés en el establecimiento de un índice de color (Mínguez y col., 1991).

Tabla 34.- Matriz de correlación entre las coordenadas cromáticas del espacio CIELAB y la concentración de pigmentos clorofílicos y carotenoides de los aceites (coeficiente de correlación y nivel de significación).

	<i>Clorofilas</i>	<i>Carotenos</i>
L*	-0.71	-0.77
a*	0.62 0.0001	0.76 0.0001
b*	0.82 0.0001	0.91 0.0001
b*/L*	0.85 0.0001	0.93 0.0001

6.2.1.5.- Contenido de α -tocoferol y de polifenoles totales, estabilidad oxidativa e índice de amargor de los aceites

El contenido de α -tocoferol de los aceites de las campañas 1998 y 1999 se muestra en la tabla 35. Se observa una disminución de su contenido en el aceite a medida que aumenta la dosis de riego, sin embargo esta tendencia sólo es significativa en 1998.

En la tabla 35 se muestra el contenido de polifenoles totales de los aceites para cada campaña y tratamiento de riego, observándose una relación significativa ($p < 0.01$) entre este parámetro y el coeficiente de cultivo (K_c). Los datos se ajustan a un modelo lineal, al aumentar el volumen de agua aplicada a los olivos, el nivel de polifenoles totales presentes en el aceite disminuye de una manera lineal y significativa. Se ha realizado un contraste de paralelismo y de términos independientes de las relaciones lineales correspondientes a los años 1998 y 1999 mediante el uso de variables ficticias no observándose diferencias ni en las pendientes ni en las ordenadas, es decir, los dos años de la experiencia se mantiene la misma relación entre polifenoles totales del aceite y volumen de agua aplicada a los olivos.

Tabla 35.- Valores medios del contenido de α -tocoferol (mg kg^{-1} de aceite) y de polifenoles totales (mg de ácido cafeico kg^{-1} de aceite), estabilidad (horas) e índice de amargor (K_{225}) de los aceites y el correspondiente nivel de significación del análisis de regresión en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.

<i>Año</i>	<i>Tratamiento (K_c)</i>	<i>α-tocoferol</i>	<i>Polifenoles</i>	<i>Estabilidad</i>	<i>K_{225}</i>
1998	T1 (0.25)	166.4	434.6	22.1	0.426
	T2 (0.38)	167.8	370.7	20.4	0.353
	T3 (0.50)	153.4	350.9	21.2	0.340
	T4 (0.57)	154.1	341.3	20.7	0.324
	T5 (0.64)	155.3	332.6	21.5	0.327
	T6 (0.71)	153.9	275.2	17.0	0.249
	T7 (0.85)	158.1	262.7	18.3	0.264
	Nivel de significación	NS	**	**	**
	R^2	-	0.90	0.51	0.86
	Ordenada al origen	-	492.3	23.9	0.476
	Pendiente	-	-275.0	-6.64	-0.270
1999	T1 (0.25)	144.6	382.6	20.3	0.369
	T2 (0.38)	143.7	311.5	18.8	0.305
	T3 (0.50)	136.0	335.3	19.6	0.334
	T4 (0.57)	131.9	281.5	18.0	0.297
	T5 (0.64)	130.4	282.3	17.9	0.294
	T6 (0.71)	127.8	221.6	16.4	0.241
	T7 (0.85)	126.0	225.8	16.5	0.235
	Nivel de significación	**	**	**	**
	R^2	0.94	0.86	0.84	0.86
	Ordenada al origen	154.2	437.5	21.9	0.414
	Pendiente	-35.5	-262.9	-6.62	-0.213
	Ordenadas ^A	-	NS	NS	NS
	Pendientes	-	NS	NS	NS

NS: no significativo ($p > 0.05$); * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$)

^A Contraste de paralelismo y de términos independientes de las regresiones de los dos años estudiados para cada uno de los parámetros

La biosíntesis de los compuestos fenólicos en las plantas es muy sensible a las condiciones ambientales (Parr and Bolwell, 2000). Recientes investigaciones llevadas a cabo por Patumi y col. (1999) han mostrado que la actividad en olivas del enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5) en la ruta fenilpropanoide de la síntesis de compuestos fenólicos y el contenido de polifenoles totales del aceite obtenido a partir de ellas disminuía al incrementar el agua de riego aplicada a los árboles. Esto explicaría el contenido más elevado de polifenoles en los aceites procedentes de árboles sometidos a un mayor déficit hídrico.

El comportamiento del índice de amargor (K_{225}) y la estabilidad oxidativa de los aceites es el mismo que el descrito para los polifenoles totales (Tabla 35). Se observa una relación lineal negativa entre K_c y estos parámetros. En ambos casos, índice de amargor y estabilidad oxidativa, no existen diferencias significativas ni en las pendientes ni en las ordenadas de las regresiones entre las dos campañas.

El amargor es uno de los atributos del aceite de oliva virgen relacionado con el contenido de polifenoles totales (Montedoro y col., 1978). Su intensidad es variable e influye en la aceptación del aceite por parte del consumidor. Sacchi y col. (1995, 1996) observaron que el contenido fenólico, determinado bien por colorimetría o por HPLC estaba relacionado con la caracterización amargo-picante de los aceites evaluados por paneles de cata.

Aunque no se ha establecido un límite, la experiencia ha mostrado que valores de K_{225} del orden de 0.360 o superiores corresponden a aceites amargos, de amargor muy intenso o extremadamente intenso que son rechazados por una parte de los consumidores (Gutiérrez y col., 1992b). En los aceites obtenidos en este ensayo de riego observamos que los aceites correspondientes al tratamiento más extremo en cuanto a menor agua de riego aplicada, tratamiento T1, muestran valores superiores al límite teórico de 0.360. De hecho, en los aceites de la campaña 1999, donde se realizó una evaluación organoléptica de los mismos, los catadores indicaron que el aceite procedente del tratamiento T1 presentaba elevadas intensidades de los atributos amargo y picante, no siendo demasiado aconsejable para su comercialización directa.

La estabilidad del aceite de oliva frente a la oxidación es debida principalmente a la composición triglicéridica y a los compuestos fenólicos que se derivan de los precursores glucosilados presentes en el fruto. Diversos investigadores han observado una relación lineal entre el contenido de compuestos fenólicos del aceite y su estabilidad (Vázquez y col., 1973; Gutfinger, 1981; Papadopoulos and Boskou, 1991; Tsimidou y col., 1992b; Baldioli y col., 1996). Sin embargo, en el proceso de autooxidación del aceite también participan otros componentes cuya concentración podrá influir en la estabilidad del mismo. Se ha realizado un análisis de regresión múltiple paso a paso (stepwise) entre la estabilidad oxidativa y los componentes químicos del aceite analizados en el presente trabajo (ácidos grasos, pigmentos clorofílicos y carotenoides, α -tocoferol y polifenoles totales). Para determinar el modelo que define cuantitativamente la relación de dependencia del parámetro estabilidad y el resto de las

variables analizadas, hemos utilizado un 75% de las muestras correspondientes a las campañas 1998 y 1999, utilizando el 25% restante para validar el modelo obtenido.

El resultado de la regresión múltiple (Tabla 36) nos indica que únicamente las variables ácido oleico y polifenoles totales son significativas. Atendiendo a los coeficientes estimados, la expresión matemática de la ecuación es la siguiente:

$$\text{Estabilidad} = 1.13 \cdot 10^{-1} \cdot (\% \text{ ácido oleico}) + 3.50 \cdot 10^{-2} \cdot (\text{polifenoles totales})$$

El coeficiente de determinación múltiple ajustado indica que las dos variables logran explicar el 99.16% de la variabilidad de la estabilidad del aceite. Ambas son significativas a un nivel de confianza del 99%.

Tabla 36.- Análisis de regresión múltiple para la estabilidad.

Variable dependiente: Estabilidad				
Variab independientes	Coeficiente estimado	Error estándar	Estadístico T	Valor p
Ácido oleico	0.112554	0.0100547	11.1942	0.0000
Polifenoles totales	0.0349512	0.00232546	15.0298	0.0000
R ² -ajustado 99.16%				

En la figura 10 están representados los valores predichos por el modelo para el conjunto de datos no incluidos inicialmente para la determinación del mismo, frente a los valores observados e indica el grado o bondad de ajuste de los datos. La recta que relaciona los valores predichos con los observados tiene una pendiente cercana a la unidad y un coeficiente de determinación elevado (89.40%).

Basándonos en los resultados obtenidos podemos indicar que el porcentaje de ácido oleico y la concentración de polifenoles totales contribuyen positivamente a la estabilidad del aceite frente a los procesos oxidativos.

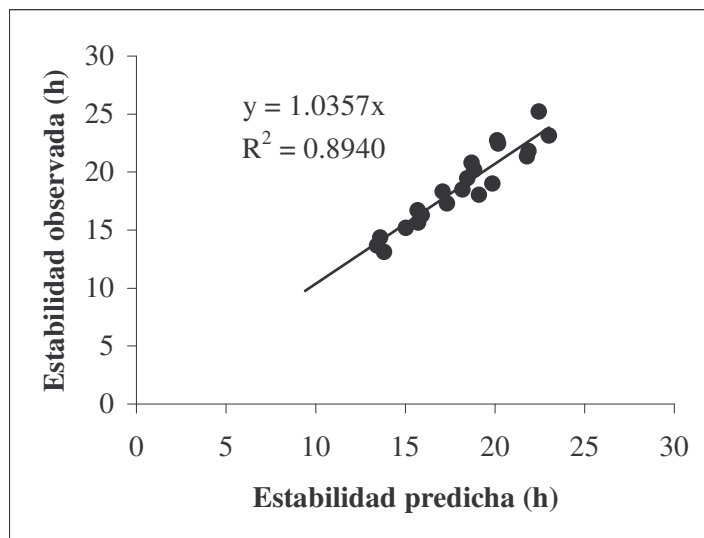


Figura 10.- Valores predichos frente a observados para la estabilidad.

Debido al similar comportamiento frente al riego observado para los polifenoles totales y el índice de amargor se ha procedido a determinar la relación existente entre estos parámetros en los aceites obtenidos en el ensayo (Tabla 37). De acuerdo con los resultados observados se puede asumir que existe evidencia de que un incremento en la concentración de polifenoles totales ocasiona un incremento del índice de amargor del aceite. El coeficiente de determinación ajustado indica que la variable contenido de polifenoles totales logra explicar el 98.66% de la variabilidad del índice de amargor.

Tabla 37.- Análisis de regresión entre las variables polifenoles totales e índice de amargor (K_{225}).

Variable dependiente: Índice de amargor				
Variables independientes	Coficiente estimado	Error estándar	Estadístico T	Valor p
Polifenoles totales	0.000992563	0.0000111512	89.0099	0.0000
R ² -ajustado 98.66%				

6.2.1.6.- Características organolépticas del aceite

La evaluación sensorial de los aceites obtenidos en la experiencia de riego lineal durante la campaña 1999, correspondiente al último año del estudio, se expone en la tabla 38. Independientemente del tratamiento de riego, en ninguno de los aceites se percibieron atributos

negativos o defectos y todos fueron clasificados, respecto a la evaluación sensorial, como aceites de oliva virgen extra. El aceite perteneciente al tratamiento menos regado, T1, obtuvo una puntuación global superior al resto.

Tabla 38.- Puntuación global y atributos sensoriales de los aceites de la campaña 1999 en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.

<i>Tratamiento (K_c)</i>	<i>Puntuación global^a</i>	<i>Atributos positivos^b</i>						
		<i>Frutado</i>	<i>Manzana</i>	<i>Frutos maduros</i>	<i>Verde</i>	<i>Amargo</i>	<i>Picante</i>	<i>Dulce</i>
T1 (0.25)	7.7	2.5	1.1	0.8	2.1	2.6	2.5	1.6
T2 (0.38)	7.3	2.0	0.8	0.7	1.6	2.1	2.4	1.6
T3 (0.50)	7.4	2.2	0.9	0.0	1.8	2.3	2.5	1.6
T4 (0.57)	7.0	1.7	0.0	0.8	1.4	1.7	2.4	1.7
T5 (0.64)	7.3	2.1	0.8	0.8	1.8	2.2	2.4	1.7
T6 (0.71)	7.2	2.0	0.8	1.0	1.6	1.6	2.2	1.8
T7 (0.85)	7.1	1.9	0.9	0.8	1.7	1.6	2.0	2.0

^a 1 (calidad pésima), 9 (excepcional)

^b 0 (casi imperceptible), 1 (ligera), 2 (ligera), 3 (media), 4 (grande), 5 (extrema)

Todos los aceites se caracterizaron por su nivel de frutado, sensación fundamental en el aroma de los aceites vírgenes y reflejo de la materia prima de la cual proceden, siendo el aceite del tratamiento con menos aporte de agua de riego el que presentó un mayor valor para este atributo así como para los atributos manzana, verde y amargo, siendo en este último donde se observan las mayores diferencias. Se aprecia una disminución de la intensidad del atributo amargo especialmente en los aceites de los tratamientos de mayor aporte de agua de riego, T6 y T7. La intensidad del atributo picante es también inferior en los aceites de estos dos tratamientos. Sin embargo, se observa un ligero aumento en la intensidad del atributo dulce al aumentar el agua de riego aplicada a los olivos.

Además de estos atributos básicos, dentro del descriptor ‘otros atributos positivos’ los catadores incluyeron los atributos nuez, nuez verde, almendra verde, tomate, tomate verde, anisado, plátano verde y alcachofa. Los atributos almendra verde, anisado y plátano verde fueron

percibidos en los aceites de los siete tratamientos de riego, mientras que los atributos tomate y nuez se percibieron sólo en los tres tratamientos con mayor aporte de agua de riego (T5, T6 y T7), y el atributo tomate verde sólo se describió en los tratamientos con menor aporte de agua de riego (T1, T2, T3 y T4).

Los compuestos fenólicos están estrechamente relacionados con los atributos amargo y picante, concretamente los ésteres del hidroxitirosol son responsables de la sensación amarga y picante que es ocasionalmente dominante en el sabor del aceite de oliva (Emmons y col., 1996). Es por ello que los aceites procedentes de los tratamientos en los que se ha aplicado una menor dosis de agua de riego a los olivos, especialmente el T1, han mostrado un sabor más amargo, probablemente relacionado con el mayor contenido de polifenoles totales (Tabla 33). Estos aceites se caracterizan también por un intenso flavor frutado y una acentuada nota del atributo verde.

6.2.1.7.- Perfil cromatográfico de los compuestos fenólicos del aceite

En el presente apartado se exponen los resultados del análisis cromatográfico de la fracción fenólica de los aceites obtenidos en la campaña 1999, correspondiente al último año de la experiencia. Debido a los significativos cambios, detallados en el apartado 6.2.1.5., en la concentración de polifenoles totales del aceite en función de la dosis de agua de riego aplicada a los olivos, se ha pretendido determinar en este apartado en qué medida estos cambios afectan a la naturaleza y concentración de los compuestos fenólicos, así como qué compuestos específicos están más directamente relacionados con la estabilidad oxidativa y el índice de amargor (K_{225}) del aceite.

En primer lugar se ha procedido a la caracterización de la fracción fenólica de los aceites. En la tabla 39 se detallan los compuestos fenólicos identificados, sus tiempos de retención y su concentración media en el global de los aceites del ensayo, independientemente del tratamiento de riego del que provienen y en la figura 11 se muestran los cromatogramas de los extractos fenólicos de aceites correspondientes a tres de los siete niveles de riego aplicados en la experiencia.

Tabla 39.- Sumario de los compuestos fenólicos identificados, tiempos de retención (TR) (min), valores medios y rango de concentraciones (mg kg⁻¹ de aceite).

N° de pico	Compuesto	Abreviatura	TR	Concentración	
				Media	Rango
1	Hidroxitirosol	3,4-DHPEA	9.8	0.15	0-0.55
2	Tirosol	<i>p</i> -HPEA	14.1	0.31	0.10-0.69
3	Ácido vainílico	-	17.5	0.24	0.09-0.55
4	Vainillina	-	20.8	0.41	0.20-0.73
5	Ácido <i>p</i> -cumárico	-	22.9	0.09	0.04-0.15
6	4-(acetoxietil)-1,2-dihidroxibenceno	3,4-DHPEA-AC	23.5	61.3	21.4-131.0
7	Forma dialdehídica del ácido elenólico unida al hidroxitirosol	3,4-DHPEA-EDA	35.8	329.2	74.7-780.6
8	Forma dialdehídica del ácido elenólico unida al tirosol	<i>p</i> -HPEA-EDA	45.2	37.9	13.0-86.4
9	Lignanosa	-	47.3	209.6	112.7-274.8
10	Oleuropeína aglicona	3,4-DHPEA-EA	53	65.4	25.6-157.7

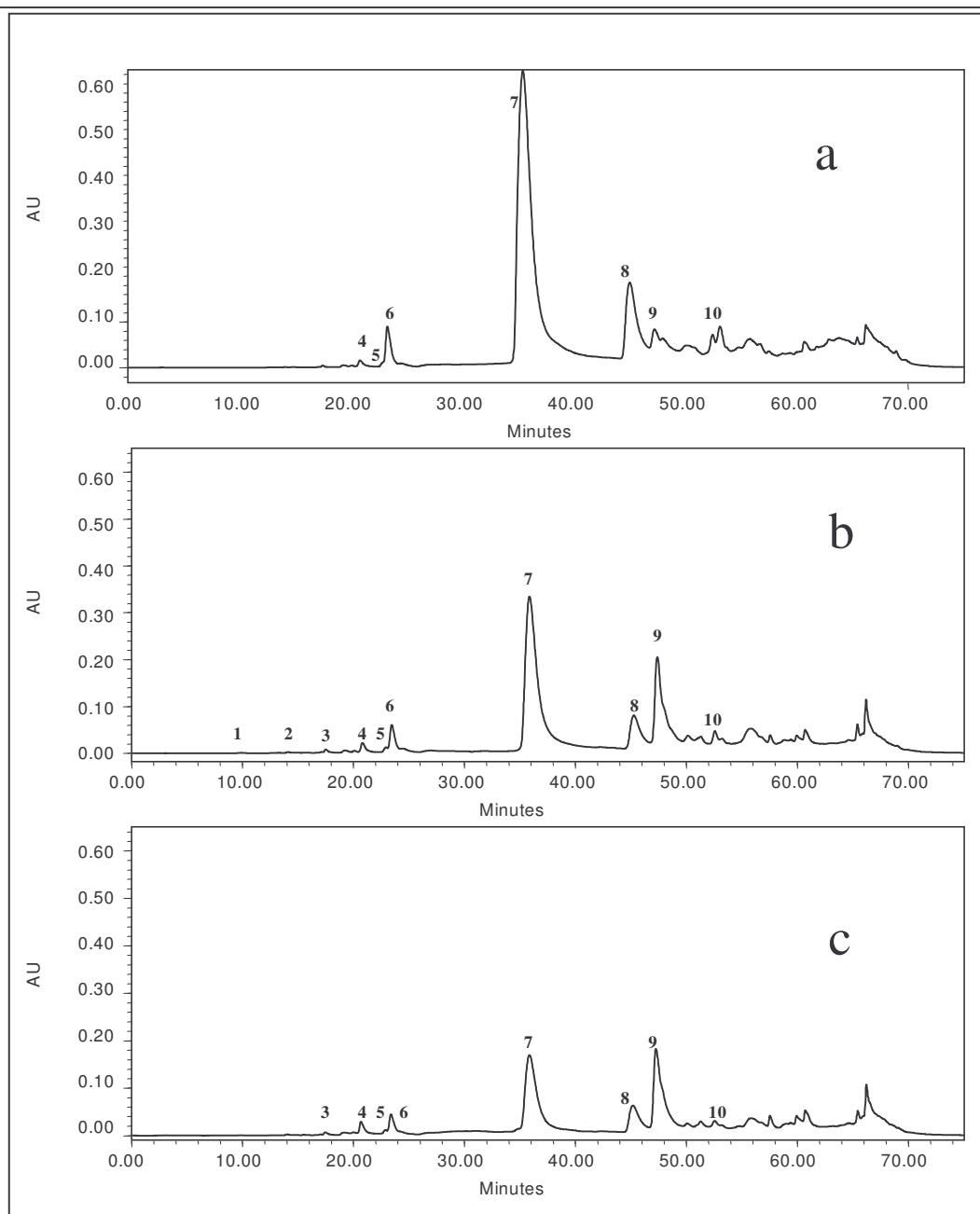


Figura 11.- Cromatogramas (a 278 nm) de los extractos fenólicos del aceite de la variedad *Arbequina* de la campaña 1999. (a) Tratamiento de riego T1 ($K_c=0.25$), (b) Tratamiento de riego T4 ($K_c=0.57$), (c) Tratamiento de riego T7 ($K_c=0.87$). Consultar tabla 39 para identificar los picos.

En la primera parte del cromatograma encontramos una serie de fenoles sencillos como hidroxitirosol (3,4-DHPEA) (Pico 1), tirosol (*p*-HPEA) (Pico 2), ácido vainílico (Pico 3) y ácido *p*-cumárico (Pico 5) que han sido determinados por diversos autores en aceites procedentes de un amplio rango de variedades. También se ha encontrado vainillina (Pico 4) y 4-(acetoxietil)-1,2-dihidroxibenceno (Pico 6), descritos por primera vez por Brenes y col. (1999) en variedades españolas. Sin embargo, no hemos detectado otros compuestos fenólicos previamente identificados en aceite de oliva como el ácido cafeico, ácido siríngico, ácido ferúlico, ácido *o*-cumárico y ácido homovainílico (Montedoro y col., 1992b; Tsimidou y col., 1996; Brenes y col., 1999).

La segunda parte del cromatograma es más complicada debido a la presencia de un gran número de picos, relacionados algunos de ellos con compuestos fenólicos de elevado peso molecular. Se ha confirmado por espectrometría de masas, debido a que ya habían sido descritos previamente (Montedoro y col., 1993; Cortesi y col., 1995), que los picos 7, 8 y 10 corresponden respectivamente a la forma dialdehídica del ácido elenólico unida al hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EDA), a la forma dialdehídica del ácido elenólico unida al tirosol (*p*-HPEA-EDA) y a la oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EA). El pico 9 corresponde a una mezcla de lignanos, 1-acetoxipinoresinol y pinoresinol, identificados por primera vez en el aceite por Owen y col. (1999) y Brenes y col. (2000). Los aceites de la variedad *Arbequina* analizados en este estudio se caracterizan por la presencia de 3,4-DHPEA-EDA como compuesto mayoritario, seguido en segundo lugar por la mezcla de lignanos (Tabla 37). Brenes y col. (1999) han caracterizado la fracción fenólica de diversos aceites de oliva españoles, entre ellos aceites de la variedad *Arbequina* producidos en Andalucía. Los resultados de ambos ensayos coinciden desde un punto de vista cualitativo, ya que los compuestos identificados son prácticamente los mismos, sin embargo, desde un punto de vista cuantitativo, los aceites de oliva de árboles jóvenes de la variedad *Arbequina* cultivados en regadío en la zona de Lleida y objeto de este estudio presentan un área de pico correspondiente al compuesto 3,4-DHPEA-EDA considerablemente superior a los aceites de *Arbequina* cultivada en Andalucía.

En la tabla 40 se detalla la concentración de los compuestos fenólicos de los aceites en función del tratamiento de riego. Entre los fenoles sencillos identificados, tan sólo las concentraciones de vainillina y de 3,4-DHPEA-AC se han visto afectadas por la cantidad de agua aplicada al olivo. El contenido de vainillina en el aceite aumenta, mientras que el de 3,4-DHPEA-AC disminuye, al incrementarse las dosis de riego aplicadas. Ambas relaciones se ajustan a regresiones lineales (Tabla 39).

Todos los compuestos fenólicos complejos identificados y cuantificados se han visto afectados por la estrategia de riego lineal (Tabla 40). Los compuestos 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA y 3,4-DHPEA-EA siguen la misma tendencia, su concentración en el aceite disminuye de una manera lineal al aumentar el volumen de agua aplicada a los olivos (Tabla 40). Sin embargo, la relación entre el coeficiente de cultivo (K_c) y la concentración de lignanos es cuadrática (Tabla

41), mostrando los aceites correspondientes al tratamiento menos regado, T1, el menor contenido de estos compuestos. El pinosresinol, uno de los lignanos mayoritarios, y sus derivados han sido aislados en raíces, hojas, flores y particularmente en la corteza de los árboles, incluido el olivo (Tsukamoto y col., 1984, 1985). También se ha detectado en semillas de sésamo (Kawagishi y col., 1994) y de lino (Meagher y col., 1999).

Numerosos estudios han mostrado que el grado de madurez del fruto tiene una importante repercusión en el contenido de compuestos fenólicos del aceite (Vázquez Roncero y col., 1971; Cimato y col., 1990; Gutiérrez y col., 1999), sin embargo, en el presente ensayo de riego, en el momento de la cosecha no se observó una relación entre el volumen de agua de riego aplicado y el índice de madurez alcanzado por los frutos, mostrando índices de madurez similares independientemente del tratamiento de riego (Tabla 29). En consecuencia, las diferencias observadas en el contenido de compuestos fenólicos no se pueden explicar, en nuestras condiciones de ensayo, basándose en un diferente grado de maduración de los frutos. En este caso se puede deducir que tiene una mayor influencia el estado hídrico del árbol que el grado de maduración de la oliva, ya que la variedad *Arbequina* cultivada en la zona de Lleida madura de una forma peculiar, sin alcanzar un índice de madurez muy avanzado.

Tabla 40.- Valores medios del contenido de los compuestos fenólicos (mg kg^{-1} de aceite) de los aceites y el correspondiente nivel de significación del análisis de regresión en relación con el tratamiento de riego aplicado a los olivos.

	<i>Tratamientos de riego</i>							
	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	
<i>3,4-DHPEA</i>	0.23	0.18	0.17	0.09	0.10	0.19	0.12	NS
<i>p-HPEA</i>	0.33	0.33	0.32	0.28	0.23	0.37	0.28	NS
<i>Ácido vainílico</i>	0.23	0.25	0.26	0.25	0.23	0.24	0.24	NS
<i>Vainillina</i>	0.31	0.34	0.41	0.41	0.42	0.50	0.46	**
<i>Ácido p-cumárico</i>	0.09	0.10	0.10	0.09	0.09	0.09	0.09	NS
<i>3,4-DHPEA-AC</i>	75.9	69.3	65.2	62.9	53.5	49.3	51.8	**
<i>3,4-DHPEA-EDA</i>	442.8	418.5	398.3	353.6	291.0	212.4	183.0	**
<i>p-HPEA-EDA</i>	50.9	44.4	43.5	38.9	37.1	27.4	23.1	**
<i>Lignanos</i>	168.5	192.5	198.8	226.5	221.7	232.6	228.1	**
<i>3,4-DHPEA-EA</i>	83.3	77.4	73.3	69.8	66.1	46.1	41.9	**

NS: no significativo ($p > 0.05$); * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$)

Tabla 41.- Ecuaciones de regresión que muestran el efecto del tratamiento de riego (K_c) aplicado a los olivos sobre algunos compuestos fenólicos de los aceites.

	Modelo	Ordenada al origen	b	c
<i>Vainillina</i>	Linear	0.238	0.302	-
<i>3,4-DHPEA-AC</i>	Linear	86.9	-46.2	-
<i>3,4-DHPEA-EDA</i>	Linear	597.1	-482.1	-
<i>p-HPEA-EDA</i>	Linear	63.9	-46.8	-
<i>Lignanós</i>	Cuadrático	100.6	312.0	-168.8
<i>3,4-DHPEA-EA</i>	Linear	105.8	-72.8	-

De acuerdo con lo expuesto en el apartado 6.2.1.5. y los resultados de diversos investigadores, el régimen hídrico al que se someten los olivos tiene un efecto sobre la concentración de compuestos fenólicos del aceite, mostrando un menor contenido los aceites que provienen de parcelas más regadas (Tabla 35), sin embargo, no todos los compuestos se ven afectados de la misma manera. Por una parte, los compuestos fenólicos sencillos 3,4-DHPEA, *p*-HPEA, ácido vainílico y ácido *p*-cumárico presentes a bajas concentraciones no se han visto afectados por el tratamiento de riego. El contenido de vainillina ha aumentado con la dosis de riego y el contenido de lignanos ha resultado ser inferior en los aceites del tratamiento menos regado (T1), mientras que el resto de compuestos fenólicos de naturaleza compleja han seguido la tendencia inversa, su concentración ha disminuido al aumentar el agua aplicada a los olivos.

Las sustancias 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA y 3,4-DHPEA-EA constituyen una considerable parte de la fracción fenólica de los aceites de la variedad *Arbequina* obtenidos en esta experiencia de riego, y han sido los principales responsables de la disminución de los polifenoles totales en los aceites de los tratamientos más regados (Tabla 35). Están relacionados con un grupo específico de compuestos del tipo cumarina, llamados secoiridoides. Proceden del metabolismo secundario de los terpenos, de la ruta del ácido mevalónico y generalmente son derivados de glucósidos del tipo oleósido que se caracterizan por la combinación del ácido elenólico unido a una molécula de glucosa.

Una vez cuantificados los componentes de la fracción fenólica se ha correlacionado la estabilidad oxidativa de los aceites (datos presentados en la tabla 35) con el contenido de los diferentes compuestos fenólicos del aceite. La mejor correlación se ha observado entre la estabilidad y 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA y 3,4-DHPEA-EA ($r=0.76$, $p<0.001$; $r=0.60$, $p<0.001$; $r=0.73$, $p<0.001$, respectivamente). La actividad antioxidante de los polifenoles se explica generalmente basándose en sus grupos hidroxilos, especialmente en posición orto. Se considera al 3,4-DHPEA como el ortodifenol más importante del aceite de oliva, el cual está

incluido en la estructura de 3,4-DHPEA-EDA y 3,4-DHPEA-EA. La falta de correlación entre 3,4-DHPEA y la estabilidad oxidativa es probablemente consecuencia de la baja concentración de este compuesto en los aceites analizados. Hemos observado que además de los compuestos que poseen grupos hidroxilos en posición orto, el éster que contiene *p*-HPEA, aunque en menor grado, también juega un papel como antagonista de la reacción de oxidación del aceite. No se ha encontrado relación entre el contenido de lignanos y la estabilidad oxidativa. Brenes y col., (2000) han observado que los lignanos no se oxidan con facilidad y Montedoro y col., (1992b) indicaron que un pico denominado 10, que de acuerdo con investigaciones realizadas posteriormente debe corresponder a la mezcla de lignanos, era muy estable durante el proceso de oxidación del aceite.

También se ha realizado un estudio de la relación entre el índice de amargor o K_{225} (datos presentados en la tabla 35) y la concentración de los diferentes compuestos fenólicos presentes en el aceite observando una significativa correlación positiva entre el contenido de 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA y 3,4-DHPEA-EA en el aceite y el índice de amargor ($r=0.78$, $p<0.001$; $r=0.81$, $p<0.001$; $r=0.83$, $p<0.001$ respectivamente). Estos tres compuestos están relacionados con el principal componente amargo de la oliva, el secoiridoide oleuropeína. El compuesto vainillina parece tener un cierto efecto en las características sensoriales de los aceites, mostrando una correlación negativa con el índice de amargor ($r=-0.41$, $p<0.01$).

Los diferentes perfiles cromatográficos de los extractos fenólicos de los aceites de oliva procedentes de los siete tratamientos de riego confirman la complejidad de los procesos bioquímicos que regulan la síntesis de los compuestos fenólicos de la oliva. El aporte de diferentes volúmenes de agua a los olivos implica un cambio en el perfil de los compuestos fenólicos del aceite y en consecuencia se ven afectadas sus características organolépticas y su capacidad antioxidante.

6.2.2.- EFECTO DEL RIEGO LINEAL SOBRE LA ACUMULACIÓN DE POLIFENOLES Y LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA PAL EN EL FRUTO DURANTE EL PERÍODO DE MADURACIÓN

Finalizado el estudio de composición del aceite de la primera campaña y a la vista de que el riego lineal afectaba principalmente a la fracción fenólica del aceite y a sus propiedades relacionadas con ésta, en la segunda campaña (año 1999) se planteó el objetivo de estudiar si la reducción del contenido de polifenoles en el aceite al aumentar el volumen de agua de riego, pudiera ser consecuencia de una modificación de la síntesis de polifenoles en la oliva durante el período de maduración del fruto. Para ello se procedió al análisis de la actividad fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5), enzima clave en la biosíntesis de compuestos fenólicos y a la cuantificación de éstos en la pulpa de las olivas durante el período comprendido entre el 30/9 el 22/11, tal y como se describe en el apartado 5.2.5.2 de Material y Métodos.

En este apartado se han realizado dos tipos de análisis estadísticos; por un lado se ha aplicado un análisis de la varianza para estudiar la evolución con el tiempo de cada parámetro, independientemente del tratamiento de riego, y por otro lado se ha aplicado un análisis de regresión para ver el efecto del tratamiento de riego en cada fecha de muestreo.

6.2.2.1.- Índice de madurez de la oliva y contenido de humedad y grasa de la pulpa

No se ha observado en ninguno de los cuatro muestreos realizados una relación significativa entre el volumen de agua aplicado al olivo y el índice de madurez de las olivas (Tabla 42), que ha ido aumentando en todos los tratamientos de riego hasta llegar a valores en cosecha comprendidos entre 2 y 3.

Tabla 42.- Efecto del tratamiento de riego (K_c) y de la fecha de muestreo sobre el índice de madurez de las olivas.

<i>Tratamiento (K_c)</i>	<i>Fecha de muestreo^A</i>				
	30/9	14/10	4/11	22/11	
T1 (0.25)	0.99 ^a	1.95 ^b	2.33 ^{bc}	2.92 ^c	**
T2 (0.38)	1.07 ^a	1.54 ^a	2.00 ^a	3.01 ^b	**
T3 (0.50)	0.97 ^a	1.25 ^a	1.50 ^a	2.19 ^b	**
T4 (0.57)	0.98 ^a	1.45 ^{ab}	1.93 ^b	3.07 ^c	**
T5 (0.64)	0.98 ^a	1.24 ^a	1.45 ^{ab}	2.96 ^b	**
T6 (0.71)	1.01 ^a	1.13 ^a	1.44 ^{ab}	2.91 ^b	*
T7 (0.85)	1.05 ^a	2.08 ^b	2.63 ^b	2.82 ^b	*
Nivel de significación	NS	NS	NS	NS	

^A Valores con diferente letra difieren significativamente en relación con la fecha de muestreo

NS: no significativo ($p > 0.05$); * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$)

La humedad de la pulpa de las olivas sigue la misma evolución con el tiempo en todos los tratamientos de riego (Tabla 43). Entre el 30/9 y el 4/11, el contenido de agua permanece prácticamente constante, mientras que en el último período de muestreo, coincidiendo con el momento de cosecha, el porcentaje de humedad disminuye significativamente en todos los casos. Este importante descenso podría deberse a una disminución de la conductividad hidráulica de las raíces de la planta como consecuencia de las bajas temperaturas que se registraron en la zona del estudio en esas fechas (Pavel y Fereres, 1998).

En relación con el tratamiento de riego, en los tres primeros muestreos, el porcentaje de agua de la pulpa aumenta paralelamente con el volumen de agua aplicada al olivo. En cosecha, esta

relación desaparece, siendo las diferencias entre tratamientos mínimas probablemente como consecuencia del marcado descenso de la humedad del fruto observado en todos los tratamientos, atribuible, como se ha comentado, a la mencionada reducción de la captación de agua por parte del olivo.

Tabla 43.- Efecto del tratamiento de riego (K_c) y de la fecha de muestreo sobre la humedad (%) de la pulpa de las olivas.

<i>Tratamiento (K_c)</i>	<i>Fecha de muestreo^A</i>				
	30/9	14/10	4/11	22/11	
T1 (0.25)	56.43 ^a	56.88 ^a	55.39 ^a	47.17 ^b	**
T2 (0.38)	55.17 ^a	56.34 ^a	53.22 ^a	46.76 ^b	**
T3 (0.50)	57.84 ^a	58.21 ^a	55.97 ^a	48.79 ^b	*
T4 (0.57)	57.32 ^a	57.39 ^a	56.22 ^a	47.46 ^b	**
T5 (0.64)	57.33 ^a	56.92 ^a	55.86 ^a	47.22 ^b	**
T6 (0.71)	60.96 ^a	58.87 ^b	58.08 ^b	48.51 ^c	**
T7 (0.85)	61.54 ^a	59.72 ^a	59.13 ^a	50.71 ^b	**
Nivel de significación	**	*	**	NS	
R ²	0.73	0.62	0.68	-	
Ordenada al origen	52.6	55.1	51.9	-	
Pendiente	9.85	4.75	7.78	-	

^A Valores con diferente letra difieren significativamente en relación con la fecha de muestreo

NS: no significativo ($p > 0.05$); * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$)

En la tabla 44 se muestran los valores del contenido de grasa de la pulpa, expresado en base seca. Las olivas de los tratamientos de riego de T1 a T6 muestran un significativo aumento de su contenido graso entre el primer y el último muestreo, sin embargo, las olivas del tratamiento más regado, T7, parecen haber alcanzado su contenido final de grasa en el período correspondiente al primer muestreo, permaneciendo prácticamente constante en los muestreos posteriores.

El contenido graso de la pulpa aumenta con el agua aplicada sólo en el primer muestreo, observándose un avance en la acumulación de grasa en el tratamiento más regado. Al avanzar la maduración no existen diferencias entre tratamientos de riego, llegando a cosecha con porcentajes de grasa similares, independientemente del volumen de agua aplicada al olivo.

Tabla 44.- Efecto del tratamiento de riego (K_c) y de la fecha de muestreo sobre el contenido graso de la pulpa (% en base seca) de las olivas.

<i>Tratamiento (K_c)</i>	<i>Fecha de muestreo^A</i>				
	30/9	14/10	4/11	22/11	
T1 (0.25)	39.32 ^a	42.54 ^b	44.15 ^b	44.79 ^b	**
T2 (0.38)	39.96 ^a	41.52 ^{ab}	42.56 ^{bc}	44.34 ^c	**
T3 (0.50)	41.10 ^a	42.73 ^{ab}	42.80 ^{ab}	44.09 ^b	*
T4 (0.57)	40.88 ^a	43.13 ^b	44.22 ^{bc}	45.05 ^c	**
T5 (0.64)	41.06 ^a	42.16 ^{ab}	42.97 ^{bc}	44.27 ^c	*
T6 (0.71)	41.21 ^a	43.53 ^b	44.12 ^{bc}	44.55 ^c	**
T7 (0.85)	42.74	43.74	43.80	44.18	NS
Nivel de significación	**	NS	NS	NS	
R ²	0.90	-	-	-	
Ordenada al origen	3.81	-	-	-	
Pendiente	5.06	-	-	-	

^A Valores con diferente letra difieren significativamente en relación con la fecha de muestreo

NS: no significativo ($p > 0.05$); * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$)

6.2.2.2.- Actividad del enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.5)

En la tabla 45 se detallan los valores de actividad del enzima PAL en pulpa, clasificados en función del tratamiento de riego y de la fecha de muestreo. Los resultados se expresan en base seca ya que dan una idea de la actividad en valores absolutos, evitando el efecto del contenido de humedad en la pulpa. La actividad PAL disminuye al avanzar la maduración de las olivas en todos los tratamientos de riego, sin embargo, esta disminución no es estadísticamente significativa en las olivas que proceden de los tres tratamientos que reciben un mayor aporte de agua, T5, T6 y T7, en los cuales se observan valores inferiores de actividad enzimática desde el primer muestreo. La mayor actividad enzimática observada en el primer muestreo en las olivas correspondientes a los tratamientos menos regados no puede ser atribuida, en nuestras condiciones experimentales, a diferentes estadios en la maduración del fruto, ya que no se ha observado ninguna relación entre el tratamiento de riego y el índice de madurez de las olivas ni en el primer muestreo ni en los realizados posteriormente (Tabla 42). Por lo tanto, la mayor actividad PAL observada en los tratamientos menos regados en el muestreo realizado tras el período de verano (30/9), podría deberse a una respuesta frente a una situación de estrés del cultivo, acentuado por las condiciones climáticas de la época estival (lluvia escasa y elevado ET_0).

Tabla 45.- Efecto del tratamiento de riego (K_c) y de la fecha de muestreo sobre la actividad PAL ($\mu\text{mol g}^{-1}$ peso seco h^{-1}) en la pulpa de las olivas.

<i>Tratamiento (K_c)</i>	<i>Fecha de muestreo^A</i>				
	30/9	14/10	4/11	22/11	
T1 (0.25)	19.98 ^a	19.73 ^a	18.90 ^a	15.54 ^b	*
T2 (0.38)	20.13 ^a	19.78 ^a	15.71 ^b	14.68 ^b	*
T3 (0.50)	20.52 ^a	19.34 ^a	16.17 ^b	14.91 ^b	**
T4 (0.57)	16.11 ^a	16.20 ^a	13.73 ^{ab}	12.24 ^a	*
T5 (0.64)	16.60	15.04	14.20	13.26	NS
T6 (0.71)	16.41	14.55	14.89	12.84	NS
T7 (0.85)	14.29	12.30	13.18	9.94	NS
Nivel de significación	**	**	**	**	
R ²	0.76	0.89	0.75	0.81	
Ordenada al origen	23.6	24.4	19.5	18.1	
Pendiente	-10.5	-13.8	-7.68	-8.56	

^A Valores con diferente letra difieren significativamente en relación con la fecha de muestreo

NS: no significativo ($p > 0.05$); * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$)

Las variaciones de la actividad PAL durante el crecimiento y maduración han sido estudiadas en diverso frutos (Macheix y col., 1990). En algunos, la actividad del enzima es máxima en frutos jóvenes y disminuye rápidamente durante el crecimiento. Sin embargo, en otros frutos como el tomate, la actividad PAL alcanza su máximo al final del crecimiento, justo antes de que el fruto cambie de color, y después disminuye. En frutos como la uva, la cereza o la fresa, se observa un incremento de la actividad PAL en la fase de madurez en la que se produce una acumulación de pigmentos antocianicos. Debido a las condiciones climáticas que caracterizan esta zona y al elevado riego de fuertes heladas en los meses de diciembre y enero, que condiciona el momento de la cosecha, las olivas de la variedad *Arbequina* en el área donde se localiza el ensayo de riego no han alcanzado valores del índice de madurez superiores a 3 en el momento de cosecha, por lo que no se observa un incremento de la actividad PAL ligado a síntesis y acumulación de antocianos, que tendría lugar en un período más avanzado de la maduración del fruto. Kubota y col. (2001) estudiaron los cambios del contenido de polifenoles y de la actividad PAL en el mesocarpo de dos variedades de melocotón durante el crecimiento del fruto. La curva de crecimiento del melocotón, al igual que la de otros frutos de hueso corresponde, generalmente, a una doble sigmoide. Durante la fase que denominaron 2, donde tiene lugar la lignificación del endocarpo, observaron la máxima actividad enzimática que disminuyó hasta niveles mínimos en la fase posterior, la de expansión del tejido del mesocarpo conduciendo a la maduración del fruto. Haciendo un paralelismo con los datos obtenidos en nuestro ensayo, observamos que tiene

lugar desde el primer muestreo, que corresponde a una fase posterior a la lignificación del hueso, una continua disminución de la actividad PAL.

Hemos encontrado una relación significativa, en las cuatro fechas de muestreo, entre la actividad PAL en la pulpa de las olivas y el volumen de agua aplicada al cultivo, determinado por el coeficiente de cultivo (K_c), mostrando los valores superiores de actividad enzimática las olivas de los tratamientos menos regados. Comparando las 4 rectas de regresión observamos que la actividad PAL se ve afectada por el tratamiento de riego de igual manera en los diferentes estadios de desarrollo de la oliva que han sido muestreados, ya que las pendientes no han resultado ser significativamente diferentes. En los dos últimos muestreos, las ordenadas en el origen son inferiores a los dos primeros muestreos, aunque se mantiene el ritmo de disminución de la actividad del enzima con el aumento de la dosis de riego, sus valores fluctúan en un rango inferior.

Los valores de actividad del enzima PAL determinados en la experiencia son inferiores a los reportados por Patumi y col. (1999) en variedades italianas de olivo, sin embargo la tendencia observada es similar. En dicho trabajo la actividad PAL mostraba valores superiores en las olivas del tratamiento control, no regado, que en aquellos tratamientos diariamente regados con diferentes porcentajes de la evapotranspiración del cultivo. Los resultados obtenidos también son consistentes con un estudio en melocotón en el que pone de manifiesto el efecto del estrés hídrico sobre la actividad PAL (Kubota, 1996).

6.2.2.3.- Polifenoles totales de la pulpa de las olivas

En la tabla 46 se muestran los valores del contenido de polifenoles totales de la pulpa, expresados en base seca, en función de los tratamientos de riego y las fechas de muestreo. Durante el período en que se han realizado los muestreos se observa un descenso en el nivel de polifenoles totales de la pulpa en todos los tratamientos de riego. Este descenso ha sido más evidente en el muestreo previo a cosecha. Diversos autores han reportado una disminución de sustancias fenólicas durante la maduración de la oliva (Vázquez y col., 1971; Solinas y col., 1978; Chimi y Atouati, 1994).

Se observa una relación lineal negativa entre el coeficiente de cultivo (K_c) y el contenido de polifenoles totales de la pulpa de la oliva en todo el período muestreado, evidenciando una disminución de estos compuestos a mayores dosis de agua de riego (Tabla 46). Al igual que lo observado para la actividad PAL, las pendientes de las 4 rectas que definen la relación entre dosis de riego y el contenido de polifenoles, no son significativamente diferentes entre fechas de muestreo, sugiriendo que el tratamiento de riego causa el mismo efecto en el contenido de polifenoles de la pulpa en los diferentes momentos del crecimiento del fruto muestreados en este ensayo.

Tabla 46.- Efecto del tratamiento de riego (K_c) y de la fecha de muestreo sobre el contenido de polifenoles totales (g kg^{-1} peso seco) en la pulpa de las olivas.

Tratamiento (K_c)	Fecha de muestreo ^A				
	30/9	14/10	4/11	22/11	
T1 (0.25)	100.90 ^a	100.76 ^a	89.54 ^{ab}	76.74 ^b	**
T2 (0.38)	95.38 ^a	88.42 ^a	82.06 ^{ab}	71.40 ^b	*
T3 (0.50)	96.17 ^a	88.29 ^{ab}	81.19 ^{bc}	72.58 ^c	*
T4 (0.57)	98.97 ^a	80.25 ^{ab}	83.61 ^{bc}	63.28 ^c	**
T5 (0.64)	92.84 ^a	82.76 ^a	80.04 ^a	66.58 ^b	**
T6 (0.71)	86.91 ^a	79.81 ^b	78.62 ^b	66.24 ^b	*
T7 (0.85)	85.81 ^a	79.49 ^a	76.08 ^{ab}	60.35 ^b	*
Nivel de significación	*	**	*	**	
R ²	0.74	0.79	0.82	0.82	
Ordenada al origen	107.5	104.5	92.2	82.4	
Pendiente	-24.5	-33.8	-19.1	-25.5	

^A Valores con diferente letra difieren significativamente en relación con la fecha de muestreo

NS: no significativo ($p > 0.05$); * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$)

El contenido de polifenoles totales ha seguido una evolución similar a la descrita para la actividad PAL. El enzima PAL es clave en la biosíntesis de los compuestos fenólicos, cataliza la desaminación oxidativa de la fenilalanina produciendo ácido *trans*-cinámico. Generalmente, un aumento o inducción de la actividad PAL conlleva un aumento en la acumulación de sustancias fenólicas en los tejidos de las plantas (Hahlbrock y Scheel, 1989; Régnier y Macheix, 1996; Kubota y col., 2000), por ese motivo hemos correlacionado los valores de actividad del enzima PAL en la pulpa de las olivas con el contenido de polifenoles de las mismas encontrando una relación positiva ($r=0.65$, $p < 0.001$) que confirma la implicación de la actividad del enzima PAL en la biosíntesis de los compuestos fenólicos en la oliva. En consecuencia, factores que pueden modificar su actividad, como es el riego, afectarán también a la concentración de compuestos fenólicos en el aceite.

6.2.3.- DISCUSIÓN GLOBAL DEL EFECTO DEL RIEGO LINEAL SOBRE LA CALIDAD Y COMPOSICIÓN DEL ACEITE DE OLIVA

Con el fin de conocer el efecto sobre la calidad del aceite de oliva de una variación lineal en el suministro de agua de riego, debido a una aplicación de distintos niveles del coeficiente de cultivo (K_c) en el cálculo de la evapotranspiración, en olivos jóvenes de la variedad *Arbequina*,

y de definir el coeficiente de cultivo más adecuado desde un punto de vista de la composición del aceite, se han analizado los aceites obtenidos durante dos campañas oleícolas, 1998 y 1999.

La aplicación de dosis crecientes de agua de riego no tuvo ninguna repercusión sobre los parámetros de calidad que determinan la categoría comercial del aceite de oliva (grado de acidez, índice de peróxidos y absorbancia a 270 nm), parámetros relacionados con el estado sanitario del fruto y con su manipulación antes y durante el proceso de extracción del aceite.

El perfil de ácidos grasos no se vio afectado en gran medida por los diferentes tratamientos de riego. Sólo los ácidos palmítico, palmitoleico y linolénico mantuvieron el mismo comportamiento las dos campañas oleícolas. Los ácidos palmítico y linolénico no se vieron afectados por el riego, mientras que el porcentaje de ácido palmitoleico se incrementó con las dosis de agua de riego aplicadas. La biosíntesis de los ácidos grasos del aceite de oliva se ha visto más afectada por la variable año de cosecha, caracterizada por unas determinadas condiciones climáticas, que por la aplicación de diferentes cantidades de agua de riego.

En cambio, el régimen de riego sí afectó al contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides del aceite, de una forma más marcada en los aceites de los dos tratamientos más regados, T6 y T7. Este efecto podría atribuirse al hecho de que al aumentar el volumen de agua aplicada al olivo, las pastas que se obtienen son más fluidas por su mayor porcentaje de humedad (Tabla 29), por lo que atravesarían las cribas del molino con más facilidad, sufriendo sus tejidos un menor daño y por lo tanto obteniéndose una menor extracción de los pigmentos localizados principalmente en el epicarpo de los frutos.

La tonalidad de los aceites siguió la misma evolución que los pigmentos, de hecho se han observado correlaciones positivas entre las coordenadas cromáticas a^* y b^* y los pigmentos clorofílicos y carotenoides (Tabla 34). La luminosidad de los aceites (L^*) aumentó de una manera lineal con el agua de riego aplicada al cultivo, al implicar este aumento una disminución del contenido de pigmentos y por lo tanto una disminución de la luz captada por los mismos.

El contenido de α -tocoferol de los aceites sólo se vio afectado de una manera significativa por la variación de la cantidad de agua aplicada al olivo el año 1999, observándose un menor contenido al aumentar la dosis de riego. Sin embargo, el rango de variación de este compuesto en el global de los aceites es muy estrecho como para resultar relevante.

El principal parámetro, junto con los pigmentos fotosintéticos del aceite, que se vio afectado por el tratamiento de riego fue el contenido de polifenoles y como consecuencia directa, la estabilidad oxidativa y el índice de amargor de los aceites. La aplicación de dosis crecientes de agua de riego implicó la obtención de aceites con un menor contenido de polifenoles, éstos disminuyeron de una manera lineal al aumentar las dosis de riego. El mayor contenido de

polifenoles en los tratamientos menos regados podría ser consecuencia de una mayor síntesis en los frutos o de una mejor extracción de los mismos durante la obtención del aceite.

La biosíntesis de compuestos fenólicos en las plantas es sensible a las condiciones ambientales, por lo tanto el estado hídrico del cultivo podría afectar a la misma a través de una regulación de la actividad del enzima PAL, enzima clave en la ruta fenilpropanoide de la síntesis fenólica. Por otra parte, podría existir un efecto del proceso de extracción. Un menor contenido de agua en las pastas implicaría por una parte, una menor solubilización de polifenoles en la misma que podrían ser arrastrados en el alpechín, y también implicaría una mayor efectividad en la extracción de polifenoles unidos a polisacáridos en el proceso de trituración en el molino.

Los aceites de los tratamientos menos regados presentan una mayor estabilidad frente a la oxidación y un índice de amargor superior. Teniendo en cuenta que Gutiérrez y col., (1992b) establecieron que valores del índice de amargor del orden de 0.360 corresponden a aceites amargos, de amargor muy intenso o extremadamente intenso que son rechazados por una parte de los consumidores, los aceites de los tratamientos menos regados, T1, T2 y T3 que mostraron valores superiores (T1) o cercanos (T2 y T3) a este teórico valor límite, entrarían dentro de la categoría de aceites amargos. De hecho, en la evaluación organoléptica de los aceites de la campaña 1999, el aceite del tratamiento T1 se caracterizó por presentar elevadas intensidades de los atributos amargo y picante, no siendo demasiado aconsejable su comercialización directa. A pesar de este hecho, el aceite del tratamiento T1 obtuvo una puntuación global superior al resto de los aceites, debido a que el atributo amargo y picante son notas sensoriales inherentes a los aceites provenientes de olivas con un elevado contenido de compuestos fenólicos, y no penalizan su calidad. Ahora bien, desde el punto de vista del consumidor puede influir en su aceptación. Todos los aceites fueron clasificados, respecto a la evaluación sensorial como aceites de oliva virgen extra.

Con el propósito de determinar si un efecto sobre la síntesis de compuestos fenólicos es una de las posibles causas del incremento de los mismos en los aceites de los tratamientos menos regados, en el año 1999 se determinó la actividad PAL y el contenido de polifenoles totales de la pulpa de la oliva durante el período de maduración del fruto, observándose que la relación entre ambos parámetros y el coeficiente de cultivo se ajustaba a un modelo lineal negativo. Un aumento de la dosis de agua de riego implicó una menor actividad del enzima y en consecuencia un menor contenido de polifenoles. A partir de estos resultados podría considerarse que un estrés hídrico en el cultivo implica una mayor actividad del enzima PAL y por lo tanto un mayor contenido de polifenoles en el fruto.

Partiendo de la base de que el riego afecta al nivel de polifenoles totales del aceite, el año 1999 se analizaron mediante HPLC los extractos fenólicos de los aceites con el fin de determinar en qué medida estos cambios afectaban a la naturaleza y composición de los compuestos fenólicos. De entre los fenoles sencillos identificados sólo se vieron afectados por el régimen de riego la

vainillina y el 3,4-DHPEA-AC. El primero aumentó con la dosis de riego, mientras que el segundo disminuyó. Ambas relaciones se ajustaron a regresiones lineales. Todos los compuestos fenólicos complejos identificados se vieron afectados por el riego. Aquellos relacionados biosintéticamente con un grupo específico de compuestos del grupo cumarina, llamados secoiridoides, fueron los principales responsables de la disminución de los polifenoles totales en los aceites de los tratamientos más regados, ya que su concentración disminuyó al aumentar la cantidad de agua de riego aplicada al cultivo. La concentración de lignanos, correspondiente a una mezcla de pinosinol y acetoxipinosinol, fue significativamente menor en los aceites del tratamiento menos regado (T1). Los lignanos son compuestos presentes en las partes leñosas de las plantas, y en este caso los lignanos formarían parte del endocarpo de las olivas.

El aporte de diferentes cantidades de agua a los olivos implicó un cambio en el perfil de los compuestos fenólicos del aceite, viéndose en consecuencia afectadas su capacidad antioxidante y sus características organolépticas ya que son los derivados secoiridoides los que presentan una importante correlación positiva tanto con la estabilidad como con el índice de amargor de los aceites.

En los resultados correspondientes a la parte del estudio dedicada al control del ensayo de riego y a la respuesta del cultivo en relación con las variables vegetativas, fisiológicas y de producción (Luna, 2000) se concluyó que los coeficientes de cultivo (K_c) óptimos eran de 0.64 para los parámetros relacionados con producción y crecimiento vegetativo, de 0.69 para el rendimiento de aceite y de 0.72 para la producción de oliva. A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo y desde el punto de vista de la calidad y composición química del aceite podemos decir que la aplicación de dosis crecientes de agua de riego a olivos jóvenes de la variedad *Arbequina* en las condiciones del ensayo, aunque no afecta a los parámetros clásicos de calidad del aceite de oliva, sí que tiene un claro efecto sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos del aceite y sobre el contenido de polifenoles. Es en los aceites correspondientes a los tratamientos con mayor aporte de agua T6 ($K_c=0.71$) y T7 ($K_c=0.85$) donde la disminución de pigmentos clorofílicos y carotenoides es notablemente superior, así como en el contenido de polifenoles, lo que implica una disminución de la estabilidad de los aceites frente a la oxidación y un menor índice de amargor. En el extremo opuesto se encuentran los aceites de los tres tratamientos menos regados, T1 ($K_c=0.25$), T2 ($K_c=0.38$) y T3 ($K_c=0.50$), que presentan un elevado contenido de polifenoles y por lo tanto una mayor resistencia a la oxidación, pero con el inconveniente de resultar aceites amargos. Sobre la base de estos resultados y desde el punto de vista de composición del aceite, los tratamientos más adecuados parecen encontrarse en las posiciones intermedias, que corresponderían a los tratamientos T4 ($K_c=0.57$) y T5 ($K_c=0.64$), ligeramente inferiores a los considerados óptimos para el rendimiento en aceite y la producción de oliva.

7.1.- Experiencia de riego deficitario controlado.

De acuerdo con los objetivos planteados en el apartado 3.1, las conclusiones obtenidas en referencia a la experiencia de riego deficitario controlado, basada en la reducción del agua de riego durante el período de máxima demanda evaporativa del olivo (Julio-Septiembre) que coincide con el período de endurecimiento del hueso, son las siguientes:

- La reducción de las dosis de riego durante la época estival no ha afectado al perfil de ácidos grasos del aceite, ni siquiera en el período posterior a la aplicación de las estrategias de riego.
- Tras haber finalizado el período de reducción en la aplicación de agua de riego a los olivos, los aceites del tratamiento control muestran la menor concentración de pigmentos clorofílicos y carotenoides, incrementándose su contenido cuanto mayor ha sido la reducción de agua aportada al olivo. Los valores de la coordenada cromática b^* siguen una evolución paralela a los pigmentos. El contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides se iguala en los aceites de los diferentes tratamientos, no mostrando en cosecha diferencias significativas.
- A lo largo del período de maduración de la oliva, el contenido de polifenoles y la estabilidad han sido significativamente superiores en los aceites del tratamiento de riego más deficitario, RDC-25, observándose las mayores diferencias en el primer muestreo realizado tras la finalización de la reducción en el aporte de agua de riego.
- En relación con el estudio de tres campañas oleícolas consecutivas, los parámetros de calidad comercial clásicos indican que todos los aceites obtenidos en la experiencia cumplen la normativa exigida por el Reglamento europeo para ser considerados aceites de oliva virgen extra, independientemente del tratamiento de riego.
- La aplicación de estrategias de RDC no ha afectado de una manera significativa al perfil de ácidos grasos del aceite, a pesar del hecho de que la reducción en el aporte de agua tiene lugar en un momento importante en la biosíntesis y acumulación del aceite. La variable campaña ha resultado ser el factor más influyente en la composición ácida de los aceites obtenidos en el ensayo, habiéndose observado que en la campaña 1997, caracterizada por una alta pluviometría durante el período estival, los aceites han sido más ricos en ácido palmitoleico y linoleico, mientras que ha sido menor la proporción de ácido oleico.
- El contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides del aceite no se ha visto afectado por el RDC, observándose un mayor efecto de la variable campaña, relacionada con la climatología del año. Paralelamente, el color del aceite, definido por las coordenadas cromáticas L^* , a^* y b^* , no se ha visto afectado por la aplicación de las estrategias de RDC.

-
- El contenido de α -tocoferol de los aceites ha presentado una tendencia a disminuir conforme disminuye el aporte de agua al olivo en el período estival, sin embargo, el rango en que oscilan los valores de este parámetro en el global de los aceites es demasiado estrecho para resultar de relevancia en el plano biológico o nutricional.
 - Al disminuir el volumen de agua de riego aplicada durante los meses de Julio-Septiembre, ha aumentado el contenido de polifenoles totales del aceite, siendo especialmente significativo en el caso del tratamiento más deficitario (RDC-25). Este incremento podría ser consecuencia del mayor contenido de agua de las olivas correspondientes a los tratamientos más regados, que daría lugar a un mayor arrastre de compuestos hidrosolubles con el alpechín durante el proceso de extracción del aceite. O bien, consecuencia de una mayor síntesis de compuestos fenólicos en la oliva como respuesta al estrés hídrico. Sin embargo, el RDC no ha afectado a la síntesis de polifenoles en la pulpa de la oliva, por lo que el incremento del contenido de polifenoles del aceite al reducir el agua de riego no se podría atribuir en su totalidad a un incremento de la síntesis en respuesta al estrés hídrico. No obstante, hay que puntualizar que el contenido de polifenoles se ha determinado en la pulpa de la oliva, lo que no permite asegurar que no se haya visto afectado el contenido de polifenoles del hueso. Hay que considerar que una parte importante de los componentes fenólicos del aceite lo forman los lignanos, presentes en el endocarpo de los frutos. Se ha observado que la variable campaña es un factor claramente influyente, poniendo de manifiesto que la presencia de lluvias durante el crecimiento y maduración de las olivas provoca una disminución del contenido de polifenoles en los aceites.
 - Paralelamente a los polifenoles, la estabilidad oxidativa y el índice de amargor (K_{225}) del aceite se han visto afectados por la estrategia de riego aplicada al olivo. Ambos parámetros aumentan de forma significativa con la reducción del aporte de agua de riego, de forma que el tratamiento más deficitario (RDC-25) presenta los máximos valores.
 - Todos los aceites obtenidos han sido clasificados respecto a la evaluación sensorial como aceites de oliva virgen extra, independientemente del tratamiento de riego aplicado. Los aceites procedentes de los tratamientos de riego deficitarios han destacado por el grado de intensidad del atributo frutado. Los atributos amargo y astringente presentan intensidades ligeramente superiores en los aceites del tratamiento más deficitario (RDC-25), lo que podría ser debido a su mayor contenido de polifenoles.

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo y desde el punto de vista de la calidad y composición química del aceite, podemos decir que los aceites procedentes de la estrategia RDC-25 son los que difieren significativamente, tomando como referencia a los aceites del tratamiento control, caracterizándose por un mayor contenido de polifenoles y por lo tanto una mayor estabilidad frente a la oxidación, pero con el riesgo subsiguiente, en función de la climatología del año, en especial el régimen de lluvias, de presentar una excesiva intensidad del atributo amargo. Por lo tanto, se puede concluir que las estrategias RDC-75 y RDC-50 suponen un ahorro considerable de agua en relación con el control y sin embargo, muestran un contenido de polifenoles ligeramente más elevado, que implica una mayor intensidad del atributo frutado y una puntuación global en la evaluación sensorial ligeramente superior. La estrategia RDC-25 supone un importante ahorro de agua, pero tiene como consecuencia aceites excepcionalmente amargos y a la larga la productividad del olivo se ve afectada (de acuerdo con los resultados de Alegre, 2001).

7.2.- Experiencia de riego lineal.

De acuerdo con los objetivos planteados en el apartado 3.2, las conclusiones referentes a la experiencia de riego lineal, basada en la aplicación de dosis crecientes de agua de riego en función de la utilización de diferentes coeficientes de cultivo (K_c) para el cálculo de las necesidades hídricas del olivo, son las siguientes:

- En relación con el estudio de dos campañas oleícolas consecutivas, los parámetros de calidad comercial clásicos indican que todos los aceites obtenidos en la experiencia cumplen la normativa exigida por el Reglamento europeo para ser considerados aceites de oliva virgen extra, independientemente del tratamiento de riego.
- El perfil de ácidos grasos del aceite se ha visto más afectado por la variable campaña, caracterizada por unas determinadas condiciones climáticas, que por la aplicación de diferentes cantidades de agua de riego.
- Se ha observado una relación lineal negativa entre el coeficiente de cultivo (K_c) y el contenido de pigmentos clorofílicos y carotenoides del aceite, lo que implica una reducción de los pigmentos al aumentar la cantidad de agua de riego aplicada al olivo. Este efecto podría atribuirse al hecho de que al aumentar el volumen de agua aplicada al olivo, las pastas que se obtienen son más fluidas, por su mayor porcentaje de humedad, por lo que atravesarían las cribas del molino con más facilidad, sufriendo sus tejidos un menor daño y por lo tanto obteniéndose una menor extracción de los pigmentos localizados principalmente en el epicarpo de los frutos. Paralelamente, el color del aceite, definido por las coordenadas cromáticas L^* , a^* y b^* , se ha visto afectado de forma similar.

-
- El contenido de α -tocoferol de los aceites ha presentado una tendencia a disminuir conforme aumenta el aporte de agua al olivo, sin embargo, el rango en que oscilan los valores de este parámetro en el global de los aceites es demasiado estrecho para resultar de relevancia en el plano biológico o nutricional.
 - La aplicación de dosis crecientes de agua de riego ha implicado la obtención de aceites con un menor contenido de polifenoles totales, que disminuyen de una manera lineal al aumentar la dosis de riego. El mayor contenido de polifenoles en los tratamientos menos regados podría ser consecuencia de una mayor síntesis en los frutos o de una mejor extracción de los mismos durante la obtención del aceite.
 - Se ha observado una relación significativa, a lo largo del período de maduración del fruto, entre la actividad PAL y el contenido de polifenoles en la pulpa de las olivas y el volumen de agua aplicada al cultivo, determinado por el coeficiente de cultivo (K_c). Un aumento de la dosis de agua de riego ha implicado una menor actividad del enzima PAL y un menor contenido de polifenoles, pudiendo considerarse que un estrés hídrico en el cultivo implica una mayor síntesis de compuestos fenólicos.
 - En los aceites de oliva virgen de la variedad *Arbequina* procedentes de árboles jóvenes cultivados en la zona de Lleida obtenidos en este ensayo se encuentran presentes los siguientes compuestos fenólicos: hidroxitiroso, tiroso, ácido vainílico, vainillina, ácido *p*-cumárico, 4-(acetoxietil)-1,2-dihidroxibenceno, las formas dialdehídicas del ácido elenólico unido al hidroxitiroso y al tiroso, lignanos y oleuropeína aglicona.
 - De entre los fenoles sencillos identificados sólo se han visto afectados por el régimen de riego la vainillina y el 3,4-DHPEA-AC. El primero aumenta con la dosis de riego, mientras que el segundo disminuye. Todos los compuestos fenólicos complejos identificados se han visto afectados por el riego. Aquellos relacionados biosintéticamente con un grupo específico de compuestos del tipo cumarina, llamados secoiridoides, han sido los principales responsables de la disminución de los polifenoles totales en los aceites de los tratamientos más regados. La concentración de lignanos, correspondiente a una mezcla de pinosinol y acetoxipinosinol, ha sido significativamente menor en los aceites del tratamiento menos regado (T1).
 - Paralelamente a los polifenoles, la estabilidad oxidativa y el índice de amargor (K_{225}) del aceite disminuyen al aumentar la cantidad de agua aplicada al olivo. De entre los diferentes compuestos fenólicos determinados, son los derivados secoiridoides 3,4-DHPEA-EDA, *p*-HPEA-EDA y 3,4-DHPEA-EA los que presentan mejores correlaciones con la estabilidad oxidativa ($r = 0.76$, $r = 0.60$ y $r = 0.73$, respectivamente) y con el índice de amargor de los aceites ($r = 0.78$, $r = 0.81$ y $r = 0.83$, respectivamente).

- Los aceites han sido clasificados, respecto a la evaluación sensorial, como aceites de oliva virgen, independientemente del tratamiento de riego. Todos los aceites se han caracterizado por su nivel de frutado, siendo el aceite del tratamiento con menos aporte de agua de riego el que presentó un mayor valor para este atributo así como para los atributos manzana, verde y amargo, siendo en este último donde se han observado las mayores diferencias. Se aprecia una disminución de la intensidad del atributo amargo especialmente en los aceites de los tratamientos de mayor aporte de agua de riego, T6 y T7. La intensidad del atributo picante es también inferior en los aceites de estos dos tratamientos. También se ha observado un ligero aumento en la intensidad del atributo dulce al aumentar el agua de riego aplicada a los olivos.

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo y desde el punto de vista de la calidad y composición química del aceite podemos decir que la aplicación de dosis crecientes de agua de riego a olivos jóvenes de la variedad *Arbequina* en las condiciones del ensayo, aunque no afecta a los parámetros clásicos de calidad del aceite de oliva, sí que tiene un claro efecto sobre el contenido de pigmentos fotosintéticos del aceite y sobre el contenido de polifenoles. Es en los aceites correspondientes a los tratamientos con mayor aporte de agua T6 ($K_c=0.71$) y T7 ($K_c=0.85$) donde la disminución de pigmentos clorofílicos y carotenoides es notablemente superior, así como en el contenido de polifenoles, lo que implica una disminución de la estabilidad de los aceites frente a la oxidación y un menor índice de amargor. En el extremo opuesto se encuentran los aceites de los tres tratamientos menos regados, T1 ($K_c=0.25$), T2 ($K_c=0.38$) y T3 ($K_c=0.50$), que presentan un elevado contenido de polifenoles y por lo tanto una mayor resistencia a la oxidación, pero con el inconveniente de resultar aceites amargos. Sobre la base de estos resultados y desde el punto de vista de composición del aceite, los tratamientos más adecuados parecen encontrarse en las posiciones intermedias, que corresponderían a los tratamientos T4 ($K_c=0.57$) y T5 ($K_c=0.64$).

7.3.- Relaciones de interdependencia entre los componentes del aceite.

De acuerdo con el objetivo planteado en el apartado 3.3, las conclusiones obtenidas en referencia a la existencia de relaciones de interdependencia entre los componentes del aceite en las dos estrategias de riego, son las siguientes:

- Se han encontrado importantes correlaciones entre los pigmentos clorofílicos y carotenoides y las coordenadas cromáticas. La coordenada b^* es la más estrechamente relacionada con el contenido de pigmentos (con coeficientes de correlación comprendidos entre 0.82 y 0.95), mejorándose la correlación al introducir el parámetro L^* (b^*/L^*) (con coeficientes de correlación comprendidos entre 0.85 y 0.96).

-
- Se ha establecido un modelo de predicción de la estabilidad oxidativa según el cual, en la experiencia de RDC la estabilidad = $8.45 \cdot 10^{-2} \cdot (\% \text{ ácido oleico}) + 4.57 \cdot 10^{-2} \cdot (\text{polifenoles totales})$, con un coeficiente de determinación de 0.9895, y en la experiencia de riego lineal la estabilidad = $1.13 \cdot 10^{-1} \cdot (\% \text{ ácido oleico}) + 3.50 \cdot 10^{-2} \cdot (\text{polifenoles totales})$, con un coeficiente de determinación de 0.9916. En ambas experiencias se constata el hecho de que el predominio de triglicéridos con ácido oleico contribuye a la estabilidad del aceite frente a los procesos oxidativos, al tiempo que los polifenoles ejercen su actividad antioxidante.
 - Se ha establecido un modelo de predicción del índice de amargor (K_{225}) a partir del contenido de polifenoles totales según el cual, en la experiencia de RDC $K_{225} = 1.05 \cdot 10^{-3} \cdot (\text{polifenoles totales})$, con un coeficiente de determinación de 0.9852, y en la experiencia de riego lineal $K_{225} = 9.93 \cdot 10^{-4} \cdot (\text{polifenoles totales})$, con un coeficiente de determinación de 0.9866. En ambas experiencias se evidencia una relación entre el contenido de compuestos fenólicos y el atributo amargo del aceite de oliva virgen.

- Agramont, A.; López, M.C.; Boatella, J.; de la Torre, M.C. 1986. Évolution de la teneur en tocophérols et en tocotrienols pendant le mûrissage des olives. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 63, 443-447.
- Alegre, S. 2001. Efecto de diferentes estrategias de riego deficitario controlado durante la época estival sobre la producción del olivo (*Olea europaea* L.) cv Arbequina. Tesis doctoral. Universidad de Lleida.
- Alonso, M.V.; Aparicio, R. 1993. Characterization of European virgin olive oils using fatty acids. *Grasas y Aceites* 44, 18-24.
- Alloggio, V.; Caponio, F. 1997. Influenza delle tecniche di preparazione della pasta di oliva sulla qualità dell'olio. Nota II. Evoluzione delle sostanze fenoliche e di alcuni parametri di qualità in funzione della maturazione delle drupe in olio d'oliva vergine della cv. Coratina. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 74, 443-447.
- Amiot, M.J.; Fleuriet, A.; Macheix, J.J. 1986. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *J. Agric. Food Chem.* 34, 823-826.
- Andrikopoulos, N.; Hassapidou, M.; Manoukas, A. 1989. The tocopherol content of Greek olive oils. *J. Sci. Food Agric.* 46, 503-509.
- Angerosa, F.; d'Alessandro, N.; Corana, F.; Mellerio, G. 1996a. Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatography A* 736, 195-203.
- Angerosa, F.; di Giacinto, L.; Basti, C.; Serraiocco, A. 1996b. Influenza della variabile ambiente sulla composizione degli oli vergini di oliva. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 73, 461-467.
- Angerosa, F.; Mostallino, R.; Basti, C.; Vito, R. 2000. Virgin olive oil odour notes: their relationship with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chem.* 68, 283-287.
- Antolovich, M.; Prenzler, P.; Robards, K.; Ryan, D. 2000. Sample preparations in the determination of phenolic compounds in fruits. *Analyst* 125, 989-1009.
- Aparicio, R. 1995. El aceite de la variedad *Arbequina* en el contexto europeo. I Simposio del olivo Arbequino en Cataluña, Borges Blanques. 131-134.

- Aparicio, R.; Roda, L.; Albi, M.A.; Gutiérrez, F. 1999. Effect of various compounds in virgin olive oil stability measured by Rancimat. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4150-4155.
- Arakawa, O.; Hori, Y.; Ogata, R. 1986. Characteristics of color development and relationship between anthocyanin synthesis and phenylalanine ammonia-lyase activity in Starking Delicious, Fuji and Mutsu apple fruits. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 54, 424-430.
- Averna, V.; Bazan, E.; Lotti, G. 1972. Ulteriori indagini sulla influenza della varietà sulla composizione dell'olio di oliva. *Tecnica Agricola* 4, 300-311.
- Aziz, N.H.; Farag, S.E.; Mousa, L.A.A.; Abo Zaid, M.A. 1998. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. *Microbios.* 93, 43-54.
- Baldioli, M.; Servili, M.; Perretti, G.; Montedoro, G.F. 1996. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 1589-1593.
- Balsa, C.; Alibert, G.; Brulfert, J.; Queiroz, O.; Boudet, A.M. 1979. Photoperiodic control of phenolic metabolism in *Kalanchoe blossfeldiana*. *Phytochem.* 18, 1159-1163.
- Beltrán, G.; Jiménez, A.; Uceda, M. 1995. Efecto del régimen hídrico del cultivo sobre la fracción fenólica del aceite de oliva de la variedad *Arbequina*. I Simposio del olivo Arbequino en Cataluña, Borges Blanques. 153-155.
- Bendich, A. 1994. Recent advances in clinical research involving carotenoids. *Pure Appl. Chem.* 66, 1017-1024.
- Benoit, M.A.; d'Aprano, G.; Lacroix, M. 2000. Effect of gamma-irradiation on phenylalanine ammonia-lyase activity, total phenolic content, and respiration of mushrooms. *J. Agric. Food Chem.* 48, 6312-6316.
- Bianchi, G.; Pozzi, N. 1994. 3,4-dihydroxyphenylglycol, as a major C6-C2 phenolic in *Olea europaea* fruits. *Phytochem.* 35, 1335-1337.
- Bianco, A.; Scalzo, R.L.; Scarpatti, M.L. 1993. Isolation of cornoside from *Olea europaea* and its transformation into halleridone. *Phytochem.* 33, 455-457.
- Bianco, A.; Mazzei, R.A.; Melchioni, C.; Romeo, G.; Scarpatti, M.L.; Soriero, A.; Uccella, N. 1998. Microcomponents of olive oil. III. Glucosides of 2(3,4-dihydroxyphenyl)ethanol. *Food Chem.* 63, 461-464.

- Billot, J.; Hartmann, C.; Macheix, J.J.; Rateau, J. 1978. Les composés phénoliques au cours de la croissance de la poire Passe-Crassane. *Physiol. Vég.* 16, 693-714.
- Blekas, G.; Boskou, D. 1998. Antioxidative activity of 3,4-dihydroxyphenylacetic acid and α -tocopherol on the triglyceride matrix of olive oil. Effect of acidity. *Grasas y Aceites* 49, 34-37.
- Blekas, G.; Tsimidou, M.; Boskou, D. 1995. Contribution of α -tocopherol to olive oil stability. *Food Chem.* 52, 289-294.
- Bourquelot, E.; Vintilesco, J. 1908. Sur l'oleuropein, nouveau principe de nature glucosidique retiré de l'olivier (*Olea europaea* L.). *Compt. Rend. Hebd. Acad. Sci. Paris* 147, 533-535.
- Brenes, M.; García, P.; Garrido, A. 1992. Phenolic compounds related to the black colour formed during the processing of ripe olives. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1192-1196.
- Brenes, M.; García, A.; García, P.; Rios, J.J.; Garrido, A. 1999. Phenolic compounds in Spanish olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3535-3540.
- Brenes, M.; Hidalgo, F.J.; García, A.; Rios, J.J.; García, P.; Zamora, R.; Garrido, A. 2000. Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77, 715-720.
- Cantarelli, C. 1961. Polyphenols in the fruit and in olive oil. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 38, 69-72.
- Capasso, A.; Pieretti, S.; di Giannuario, A.; Nicoletti, M. 1993. Pharmacological study of phenyl propanoid glucosides: platelet aggregation and blood pressure studies in rabbits and rats. *Phytother. Res.* 7, 81-83.
- Caruso, D.; Berra, B.; Cortesi, N.; Fedeli, E.; Galli, G. 1999. Protective effect of phenolic components of virgin olive oil in vitro oxidation of human low-density lipoprotein. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 9, 102-107.
- Cimato, A.; Mattei, A.; Osti, M. 1990. Variation of polyphenol composition with harvesting period. *Acta Horticulturae*, 286, 453-456.
- Civantos, L. 1999. Obtención del aceite de oliva virgen. 2ª edición. Agrícola Española. Madrid.
- Codex Alimentarius. 1993. Normas revisadas para los aceites de oliva. CL 1993/15 FO.

-
- Conte, L.S.; Caboni, M.F.; Lercker, G. 1993. Olive oils produced in Romagna. Note 1. Oils from Lamone river valley. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 70, 175-180.
- Cortesi, N.; Azzolini, M.; Rovellini, P.; Fedeli, E. 1995. I componenti minori polari degli oli vergini di oliva: ipotesi di struttura mediante LC-MS. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 72, 241-251.
- Chachin, K.; Minamide, T.; Ogata, K. 1974. Effects of cathode rays on phenols content and some enzyme activities of Citrus unshiu. *Food Irradiation* 9, 69-73.
- Chalker-Scott, L.; Fuchigam, L.H. 1989. The role of phenolic compounds in plant stress responses. En: Low temperature stress physiology in crops. CRC Press, Boca Raton, Florida. 27-40.
- Cheng, G.W.; Breen, P.J. 1991. Activity of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) and concentrations of anthocyanins and phenolics in developing strawberry fruits. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116, 865-869.
- Chimi, H.; Atouati, B.B. 1994. Determinación de la fase óptima de recogida de las aceitunas de la variedad Picholine marroquí mediante el seguimiento de la evolución de los polifenoles totales. *Olivae* 54, 56-60.
- de Man, J.M.; Fan Tie; de Man, I. 1987. Formation of short chain volatile organic acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64, 993-996.
- de Pasquale, R.; Monforte, M.T.; Trozzi, A.; Raccuia, A.; Tommasini, S.; Ragusa, S. 1991. Effects of leaves and shoots of *Olea europaea* L. and oleuropein on experimental hypercholesterolemia in rat. *Plant Med. Phytother.* 25, 134-140.
- del Cuvillo, M.T. 1994. Biosíntesis de glicéridos lípidos en pulpa de aceituna en desarrollo: papel de la fotosíntesis del fruto. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- Derde, M.P.; Coomans, D.; Massart, D.L. 1984. SIMCA (soft independent modelling of class analogy) demonstrated with characterization and classification of Italian olive oil. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 67, 721-727.
- Dettoni, S.; Russo, G. 1993. Influencia del cultivar y del régimen hídrico sobre el volumen y la calidad del aceite de oliva. *Olivae* 49, 36-43.
- di Giovacchino, L. 1996. Influencia de los sistemas de extracción en la calidad del aceite de oliva. *Olivae* 63, 52-63.

- di Marco, L.; Caruso, T.; Rizza, V.; Aredia, F. 1991. Aspetti qualitativi dell'olio di 8 cultivar di olivo. Atti del convegno "Problematiche qualitative dell'olio di oliva". Sassari, 6 novembre. 113-130.
- Dionisi, F.; Prodolliet, J.; Tagliaferri, E. 1995. Assessment of olive oil adulteration by reversed-phase high performance liquid chromatography/amperometric detection of tocopherols and tocotrienols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72, 1505-1511.
- Dixon, R.A.; Paiva, N.L. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. 1995. *The Plant Cell* 7, 1085-1097.
- DOCE. 1991. Reglamento CEE 2568/91 del 11/7/91. Características del aceite de oliva y de los aceites de orujos de oliva y sobre sus métodos de análisis. N° L248. Anejo XII.
- DOCE. 1991. Reglamento CEE 3682/91 del 17/12/91. Modificación del Reglamento CEE 2568/91 del 11/7/91 relativo a las características del aceite de oliva y de los aceites de orujos de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- DOCE. 1992. Reglamento CEE 3288/91 del 12/11/92. Modificación del Reglamento CEE 2568/91 del 11/7/91 relativo a las características del aceite de oliva y de los aceites de orujos de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- DOCE. 1994. Reglamento CEE 177/94 del 28/12/94. Modificación del Reglamento CEE 2568/91 del 11/7/91 relativo a las características del aceite de oliva y de los aceites de orujos de oliva y sobre sus métodos de análisis.
- Doorenbos, J.; Pruitt, W.O. 1977. Crop water requirements. Irrigation and drainage n° 24. FAO, Rome. 194 pp.
- Emmons, E.W.; Fedeli, E.; Firestone, D. 1996. Olive oil introduction and history. En: Bailey's industrial oil and fat products: oils and oilseeds. Hui, Y. H. Ed. Wiley-Interscience Publication John Wiley&Sons Inc. New York. 241-261.
- Esti, M.; Cinquanta, L.; Carrone, A.; Trivisonno, M.C.; La Notte, E.; Gambacorta, G. 1996. Composti antiossidanti e parametri qualitativi di oli vergini di oliva prodotti in Molise. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 73, 147-150.
- Esti, M.; Cinquanta, L.; La Notte, E. 1998. Phenolic compounds in different olive varieties. *J. Agric. Food Chem.* 46, 32-35.

- Faci, J.M.; Berenguer, M.J.; Gracia, S.; Espada, J.L. 2000. Effect of variable water irrigation supply in olive (*Olea europaea* L.) cv. *Arbequina* in Aragón (Spain). II. Extra virgin oil quality parameters. Actas del IV International congress on Olive growing. Bari, Italy. 4-87.
- Fakourelis, N.; Lee, E.C.; Min, D.B. 1987. Effects of chlorophyll and β -carotene on the oxidation stability of olive oil. *J. Food Sci.* 52, 234-235.
- Fantozzi, P.; Montedoro, G. 1978. Dosage des composés phénoliques dans les drupes d'olives récoltés à différents stades de maturation. *Ind. Alimentaires* 1335-1339.
- Faragher, J.D. 1983. Temperature regulation of anthocyanin accumulation in apple skin. *J. Exp. Botany* 34, 1291-1298.
- Fedeli, E.; Cortesi, N. 1993. Quality, origin and technology of virgin olive oils. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 70, 419-426.
- Fereres, E.; Pruitt, W.O.; Beutel, J.A.; Henderson, D.W.; Holzapfel, E.; Schulbach, H.; Uriu, K. 1981. Evapotranspiration and drip irrigation scheduling. En: Drip irrigation management. Fereres E. Tech. Ed., Division of Agricultural Sciences, University of California, California. 8-13.
- Fernández Díaz, M.J. 1971. The olive. En: The biochemistry of fruits and their products. Vol. 2. Hulme A. C. Ed. Academic Press. London. 255-279.
- Fiorino, P.; Grifi, F.N. 1991. Maturazione delle olive e variazioni di alcuni componenti dell'olio. *Olivae* 35, 25-33.
- Fleming, H.P.; Walter, W.M.; Etchells, J.L. 1973. Antimicrobial properties of oleuropein and products of its hydrolysis from green olives. *Appl. Microbiol.* 26, 777-782.
- Fleuriet, A.; Macheix, J.J. 1984. Orientation nouvelle du métabolisme des acides hydroxycinnamiques dans les fruits de tomates blessés (*Lycopersicon esculentum*). *Physiol. Plant.* 61, 64-68.
- Fleuriet, A.; Macheix, J.J.; Andary, C.; Villemur, P. 1984. Mise en évidence et dosage par chromatographie liquide à haute performance du verbascoside dans le fruit de six cultivars d'*Olea europaea* L. C.R. Acad. Sci. Paris, Ser III 7, 253-256.
- Forcadell, M.L.; López, M.C.; de la Torre, M.C. 1988. Classification of virgin olive oils from different origin by discriminant analysis. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 65, 213-214.

-
- Forina, M.; Tiscornia, E. 1982. Pattern recognition methods in the prediction of Italian olive oil origin by their fatty acid content. *Annali di Chimica* 72, 143-156.
- Frylinck, L.; Dubery, I.A.; Schabert, J.C. 1987. Biochemical changes involved in stress response and ripening behaviour of γ -gamma irradiated mango fruits. *Phytochem.* 26, 681-686.
- Galli, C.; Visioli, F. 1999. Antioxidant and other activities of phenolics in olives/olive oil, typical components of the Mediterranean diet. *Lipids* 34, 523-526.
- Gandul Rojas, B.; Mínguez Mosquera, M.I. 1996. Chlorophyll and carotenoid composition in virgin olive oils from various Spanish olive varieties. *J. Sci. Food Agric.* 72, 31-39.
- García, J.M.; Sellar, S.; Pérez, M.C. 1996. Influence of fruit ripening on olive oil quality. *J. Agric. Food Chem.* 44, 3516-3520.
- Generalitat de Catalunya. 1999. Regadius present i futur a Catalunya. Generalitat de Catalunya. Barcelona.
- Girona, J. 1996. Requerimientos hídricos del olivo: estrategias de aplicación de cantidades limitadas de agua de riego en *Arbequina*. *Fruticultura Profesional* 81, 32-40.
- Given, N.K.; Venis, M.A.; Grierson, D. 1988. Purification and properties of phenylalanine ammonia-lyase from strawberry fruit and its synthesis during fruit ripening. *J. Plant Physiol.* 133, 31-37.
- Goldhamer, D.A.; Dunai, J.; Ferguson, L.F. 1994. Irrigation requirements of olive trees and responses to sustained deficit irrigation. *Acta Horticulturae* 356, 172-175.
- Graciani Constante, E. 1987. Characterization of virgin olive oil of Spain. II. Triacylglycerol composition determined by HPLC. *Grasas y Aceites* 38, 294-302.
- Grignaffini, P.; Roma, P.; Galli, C.; Catapano, A.L. 1994. Protection of low-density lipoprotein from oxidation by 3,4-dihydroxyphenylethanol. *Lancet* 343, 1296-1297.
- Gutfinger, T. 1981. Polyphenols in olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58, 966-968.
- Gutiérrez, R.; Gutiérrez, F. 1986. Método rápido para definir y clasificar el color de los aceites de oliva vírgenes. *Grasas y Aceites* 37, 282-284.

- Gutiérrez, F.; Garrido, J.; Gallardo, L.; Gandul, B.; Mínguez Mosquera, M.I. 1992a. Action of chlorophylls on the stability of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 866-871.
- Gutiérrez, F.; Perdiguero, S.; Gutiérrez, R.; Olías, J.M. 1992b. Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 69, 394-395.
- Gutiérrez, F.; Jiménez, B.; Ruíz, A.; Albi, M.A. 1999. Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties *Picual* and *Hojiblanca* and on the different components involved. *J. Agric. Food Chem.* 47, 121-127.
- Hadorn, H.; Zürcher, K. 1975. Bestimmung der oxidationsstabilität von ölen und fetten. *Dtsch. Lebensm-Rundsch* 70, 57-65.
- Hahlbrock, K.; Scheel, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40, 347-369.
- Harborne, J.B. 1980. Plant phenolics. En: *Encyclopaedia of plant physiology*. Vol. 8. Secondary plant products. Bell, E.A. y Charlwood, B.V. Eds. Springer, Berlin. 329-402.
- Harwood, J.L. 1996. Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* 1301, 7-56.
- Heredia, A.; Fernández, J.; Guillén, R. 1990. Cellulase inhibition by polyphenols in olive fruits. *Food Chem.* 38, 69-73.
- Hermoso, M.; Uceda, M.; García, A.; Morales, B.; Frías, M.L.; Fernández, A. 1991. Elaboración de aceite de oliva de calidad. Consejería de Agricultura y Pesca, Serie Apuntes 5/92. Sevilla, España. 173 pp.
- Hermoso, M.; Uceda, M.; Frías, L.; Beltrán, G. 1998. Maduración. En: *El cultivo del olivo*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. 139-153.
- Inglese, P.; Barone, E.; Gullo, G. 1996. The effect of complementary irrigation on fruit growth, ripening pattern and oil characteristics of olive (*Olea europaea* L.) cv. Carolea. *J. Hort. Sci.* 71, 257-263.
- Interesse, F.S.; Ruggiero, P.; Vitagliano, M. 1971. L'autossidazione dell'olio di oliva: influenza dei pigmenti clorofillici. *Industrie agrarie* 9, 318-324.

- Inouye, H.; Yoshida, T.; Tobita, S.; Tanaka, K.; Nishioka, T. 1974. The monoterpene glucosides and related natural compounds. The absolute structure of oleuropein, kingiside and morroniside. *Tetrahedron* 30, 201-209.
- Jacoboni, A.; Pinnola Ida, M.; Baltadori, A. 1999. The production of *Olea europaea* L. in Viterbo in relation to the climatological factors. *Acta Horticulturae* 474, 229-232.
- Jacotot, B. 1994. El aceite de oliva: alimento medicinal. *Olivae* 54, 40-41.
- Jiang, Y.M.; Fu, J.R. 1999. Biochemical and physiological changes involved in browning of litchi fruit caused by water loss. *J. Hort. Sci. & Biotech.* 74, 43-46.
- Jiménez, A.; Hermoso, M.; Uceda, M. 1995. Elaboración del aceite de oliva virgen mediante sistema continuo de dos fases. Influencia de las diferentes variables del proceso en algunos parámetros relacionados con la calidad del aceite. *Grasas y Aceites* 46, 299-303.
- Jiménez, A.; Uceda, M. 1995. Características químicas y organolépticas del aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina. I Simposio del olivo Arbequino en Cataluña, Borges Blanques. 145-148.
- Jones, D.H. 1984. Phenylalanine ammonia-lyase: regulation of its induction, and its role in plant development. *Phytochem.* 23, 1349-1359.
- Kataoka, I.; Kubo, Y.; Sugiura, A.; Tomana, T. 1983. Changes in L-phenylalanine ammonia-lyase activity and anthocyanin synthesis during berry ripening of three grape cultivars. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 52, 273-279.
- Kawagishi, S.; Oosawa, T.; Katsuzaki, H. 1994. Pinoresinol glucoside, sesame seed extract containing glycoside, and its use for preventing oxidation of lipids. Jpn. Patent 6116282, 1-5.
- Keys, A.; Menotti, A.; Karvonen, M.J. y col. 1986. The diet and 15-year death rate in the seven countries study. *Am. J. Epidemiol.* 124, 903-915.
- Kiritsakis, A.; Dugan, L.R. 1985. Studies in photooxidation of olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 62, 892-896.
- Koukol, J.; Conn, E.E. 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. *J. Biol. Chem.* 236, 2692- 2698.

- Kubo, I.; Matsumoto, A. 1984. Molluscicides from olive *Olea europaea* and their efficient isolation by countercurrent chromatographies. *J. Agric. Food Chem.* 32, 687-688.
- Kubo, Y.; Taira, S.; Ishio, S.; Sugiura, A.; Tomana, T. 1988. Color development of four apple cultivars grown in the Southwest of Japan, with especial reference to fruit bagging. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 57, 191-199.
- Kubota, N.; Mimura, H.; Yakushiji, H.; Shimamura, K. 1992. Astringency of peach fruit in different fruit parts, trees and orchards. *Sci. Rep. Fac. Agric. Okayama Univ.* 79, 45-51.
- Kubota, N. 1996. Phenolic content and L-phenylalanine ammonia-lyase activity in peach fruit. En: Modern methods of plant analysis. Linsken, H.F. y Jackson, J.F. Eds. Berlin, Germany. 81-95.
- Kubota, N.; Mimura, H.; Shimamura, K. 2000. Differences in phenolic levels among mature peach and nectarine cultivars and their relation to astringency. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 69, 35-39.
- Kubota, N.; Yakushiji, H.; Nishiyama, N.; Mimura, H.; Shimamura, K. 2001. Phenolic contents and L-phenylalanine ammonia lyase activity in peach fruit as affected by rootstocks. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 70, 151-156.
- Lanza, C.M.; Russo, C.; Tomaselli, F. 1998. Relationship between geographical origin and fatty acid composition of extra-virgin olive oils produced in three areas of eastern Sicily. *Ital. J. Food Sci.* 10, 359-366.
- Lavee, S.; Wodner, M. 1991. Factors affecting the nature of oil accumulation in fruit of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *J. Hort. Sci.* 66, 583-591.
- Le Tutour, B.; Guedon, D. 1992. Antioxidative activities of *Olea europaea* leaves and related phenolic compounds. *Phytochem.* 31, 1173-1178.
- Leibovitz, B.E.; Mueller, J.A. 1993. Bioflavonoids and other polyphenols: medical applications. *J. Optimal Nutrition* 2, 17-35.
- León Cabello, M.R. 1990. Estudio de la acción antibiótica de los componentes fenólicos del olivo *Olea europaea* L. Tesis doctoral. Facultad de ciencias biológicas. Universidad de Sevilla.

- Limiroli, R.; Consonni, R.; Ottolina, G.; Marsilio, V.; Bianchi, G.; Zetta, L. 1995. ^1H and ^{13}C NMR characterization of new oleuropein aglycones. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 5*, 1519-1523.
- Lister, C.E.; Lancaster, J.E.; Walker, J.R.L. 1996. Developmental changes in enzymes of flavonoid biosynthesis in the skins of red and green apple cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 71, 313-320.
- Lo Scalzo, R.; Scarpati, M.L.; Verregnassi, B.; Vita, G. 1994. *Olea europaea* chemicals repellents to *Dacus oleae* females. *J. Chem. Ecol.* 20, 1813-1823.
- Lotti, G.; Izzo, R.; Riu, R. 1982. Influenza del clima sulla composizione acidica e sterolica degli oli di oliva. *Riv. Soc. It. Sci. Aliment.* 2, 115-126.
- Luna, M. 2000. Funciones de producción del agua en olivo joven (*Olea europaea* L.) cv. Arbequina: coeficientes de cultivo. Tesis doctoral. Universidad de Lleida.
- Macheix, J.J.; Fleuriet, A.; Billot, J. 1990. Fruit Phenolics. CRC Press, Boca Raton, Florida. 378 pp.
- Maestro Durán, R.; Vázquez Roncero, A. 1976. Colorantes antociánicos de las aceitunas manzanilla maduras. *Grasas y Aceites* 27, 237-243.
- Maestro Durán, R.; Borja, R. 1990. La calidad del aceite de oliva en relación con la composición y maduración de la aceituna. *Grasas y Aceites* 41, 171-178.
- Mahjoub, A.; Bullerman, L.I. B. 1987. Effects of nutrients and inhibitors in olives on aflatoxigenic moulds. *J. Food Protection* 50, 959-963.
- Manzi, P.; Panfili, G.; Esti, M.; Pizzoferrato, L. 1998. Natural antioxidants in the unsaponifiable fraction of virgin olive oils from different cultivars. *J. Sci. Food Agric.* 77, 115-120.
- MAPA. 1999. Anuario de estadística agroalimentaria. Año 1999. MAPA. Secretaría General Técnica. Madrid.
- Martínez, J.M.; Muñoz, E.; Alba, J.; Lanzón, A. 1975. Informe sobre la utilización del analizador de rendimientos Abencor. *Grasas y Aceites* 26, 379-385.
- Martínez de la Cuesta, P.J.; Rus Martínez, E.; Galdeano Chaparro, M. 1995. Enranciamiento oxidativo de aceites vegetales en presencia de α -tocoferol. *Grasas y Aceites* 46, 349-353.

- Mataix, F.J.; Martínez de Victoria, E. 1988. El aceite de oliva. Bases para el futuro. Ed. Dirección General de Investigación y Extensiones Agrarias. Centro de Información y Documentación Agraria. Sevilla.
- McCallum, J.A.; Walker, J.R.L. 1990. Phenolic biosynthesis during grain development in wheat. Changes in phenylalanine ammonia-lyase activity and soluble phenolic content. *J. Cereal Sci.* 11, 35-49.
- Meagher, L.P.; Beecher, G.R.; Flanagan, V.P.; Li, N.W. 1999. Isolation and characterization of the lignans, isolariciresinol and pinoresinol in flaxseed meal. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3173-3180.
- Micali, G.; Curro, P. 1984. Determinazione dei tocoferoli negli oli vegetali mediante HPLC. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 61, 95-98.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Rejano L.; Gandul, B.; Sánchez, A.H.; Garrido, J. 1991. Color-pigment correlation in virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 332-336.
- Mínguez Mosquera, M.I.; Gallardo, L. 1995. Disappearance of chlorophylls and carotenoids during the ripening of the olive. *J. Sci. Food Agric.* 69, 1-6.
- Mitchell, P.D.; Jerie, P.H.; Chalmers, D.J. 1984. The effect of regulated deficit irrigation on pear tree growth, flowering, fruit growth, and yield. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 109, 604-606.
- Montedoro, G.; Cantarelli, C. 1969. Indagini sulle sostanze fenoliche presenti negli oli d'oliva. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 46, 115-124.
- Montedoro, G.; Bertuccioli, M.; Anichini, F. 1978. Aroma analysis of virgin olive oil by head space volatiles extraction techniques. En: *Flavour of foods and beverages*. Charalampous, G. and Inglet, G. Eds. Academic Press. New York. 247-281.
- Montedoro, G.; Servili, M. 1991. Chimica e qualità dell'olio di oliva: i fattori che la condizionano. Atti Convegno "L'olio di oliva ed il suo futuro" Spoleto 6-7 dicembre, 33-55.
- Montedoro, G.; Baldioli, M.; Servili, M. 1992a. Sensory and nutritional relevance of phenolic compounds in olive oil. *Giornale Italiano della nutrizione clinica e preventiva* 1, 19-32.

- Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M.; Miniati, E. 1992b. Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 40, 1571-1576.
- Montedoro, G.; Servili, M.; Baldioli, M.; Selvaggini, R.; Miniati, E.; Macchioni, A. 1993. Simple and hydrolyzable compounds in virgin olive oil. 3. Spectroscopic characterizations of the secoiridoid derivatives. *J. Agric. Food Chem.* 41, 2228-2234.
- Motilva, M.J.; Jaria, I.; Bellart, I.; Romero, M.P. 1998. Estudio de la calidad del aceite de oliva virgen de la Denominación de Origen "Les Garrigues" (Lleida) durante la campaña 1995/96. *Grasas y Aceites* 49, 425-433.
- Motilva, M.J.; Ramos, T.; Romero, M.P. 2001. Caracterización geográfica de los aceites de oliva vírgenes de la denominación de origen protegida "Les Garrigues" por su perfil de ácidos grasos. *Grasas y Aceites* 5, 26-32.
- Mousa, Y.M.; Gerasopoulos, D. 1996. Effect of altitude on fruit and oil quality characteristics of Mastoide olives. *J. Sci. Food Agric.* 71, 345-350.
- Nergiz, C.; Ünal, K. 1991. Determination of phenolic acids in virgin olive oil. *Food Chem.* 39, 237-240.
- Ohlrogge, J.; Browse, J. 1995. Lipids biosynthesis. *Plant cell* 7, 957-970.
- Orgaz, F.; Fereres, E. 1998. Riego. En: El cultivo del olivo. 2ª edición. Barranco, D.; Fernández, R. y Rallo, L. Eds. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla. 253-272
- Ortega Nieto, J.M. 1962. La poda del olivo. Ministerio de Agricultura, Madrid.
- Oufedjikh, H.; Mahrouz, M.; Amiot, M.J.; Lacroix, M. 2000. Effect of γ -irradiation on phenolic compounds and phenylalanine ammonia-lyase activity during storage in relation to peel injury from peel of citrus clementina Hort. Ex. Tanaka. *J. Agric. Food Chem.* 48, 559-565.
- Owen, R.W.; Mier, W.; Giacosa, A; Hull, W.E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. 1999. The identification of lignans in the phenolic fraction of olive oil. *J. Cancer Res. and Clin. Onc.* 125 (Suppl), S31.

- Owen, R.W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. 2000a. Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil. *Clinical Chemistry* 46, 976-988.
- Owen, R.W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W.E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. 2000b. Phenolic compounds and squalene in olive oils: the concentration and antioxidant potential of total phenols, simple phenols, secoiridoids, lignans and squalene. *Food and Chemical toxicology* 38, 647-659.
- Panizzi, L.; Scarpati, M.L.; Oriente, G. 1960. Costituzione della oleuropeina, glucoside amaro e ad azione ipotensiva dell'olivo. Nota II. *Gazz. Chim. Ital.* 90, 1449-1485.
- Pannelli, G.; Servili, M.; Selvaggini, M.; Baldioli, M.; Montedoro, G. 1994. Effect of agronomic and seasonal factor on olive (*Olea europaea* L.) production and on the qualitative characteristics of the oil. *Acta Horticulturae* 356, 239-243.
- Papadopoulos, G.; Boskou, D. 1991. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 68, 669-671.
- Parr, A.J.; Bolwell, G.P. 2000. Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.* 80, 985-1012.
- Pastor, M.; Castro, J.; Manrique, T.; Gómez, L. 1996. Crecimiento del fruto, formación de aceite y producción del olivar regado con diferentes programas de riego por goteo en Andalucía. *Fruticultura Profesional* 76, 6-23.
- Patumi, M.; Fontanazza, G.; Baldoni, L.; Brambilla, I. 1990. Determination of some precursors of lipid biosynthesis in olive fruits during ripening. *Acta Horticulturae* 286, 199-202.
- Patumi, M.; d'Andria, R.; Fontanazza, G.; Morelli, G.; Vergari, G. 1998. Effetto dell'irrigazione sulla produzione e sullo sviluppo vegetativo di un giovane oliveto. *Olivo&Olio* 1, 36-47.
- Patumi, M.; d'Andria, R.; Fontanazza, G.; Morelli, G.; Giorio, P.; Sorrentino, G. 1999. Yield and oil quality of intensively trained trees of three cultivars of olive (*Olea europaea* L.) under different irrigation regimes. *J. Hort. Science & Biotech.* 74, 729-737.
- Pavel, E.W.; Fereres, E. 1998. Low soil temperatures induce water deficits in olive (*Olea europaea*) trees. *Physiol. Plant.* 104, 525-532.

- Pennacchio, M.; Alexander, E.; Syah, Y.M.; Ghisalberti, E.L. 1996. The effect of verbascoside on cyclic 3',5'-adenosine monophosphate levels in isolated rat heart. *Eur. J. Pharmacol.* 305, 169-171.
- Perri, E.; Raffaelli, A.; Sindona, G. 1999. Quantitation of oleuropein in virgin olive oil by ionspray mass spectrometry-selected reaction monitoring. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4156-4160.
- Petroni, A.; Blasevich, M.; Salami, M.; Papini, N.; Montedoro, G.F.; Galli, C. 1995. Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb. Res.* 78, 151-160.
- Pirisi, F.; Angioni, A.; Cabras, P.; Garau, V.L.; Sanjust di Teulada, M.L. Kaim dos Santos, M.; Bandino, G. 1997. Phenolic compounds in virgin olive oils. I. Low-wavelength quantitative determination of complex phenols by high-performance liquid chromatography under isocratic elution. *J. Chromatography A* 768, 207-213.
- Psomiadou, E.; Tsimidou, M.; Boskou, D. 2000. α -Tocopherol content of Greek virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1770-1775.
- Psomiadou, E.; Tsimidou, M. 2001. Pigments in Greek virgin olive oils: occurrence and levels. *J. Sci. Food Agric.* 81, 640-647.
- Ragazzi, E.; Veronese, G.; Guiotto, A. 1973. Demetiloleuropeina, nuovo glucoside isolato da olive mature. *Ann. Chim.* 63, 13-20.
- Rahmani, M.; Csallany, A.S. 1998. Role of minor constituents in the photooxidation of virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 837-843.
- Ranalli, A. 1992. Carotenoids in virgin olive oils: effect of technology. *Ital. J. Food Sci.* 1, 53-57.
- Ranalli, A.; Angerosa, F. 1996. Integral centrifuges for olive oil extraction. The qualitative characteristics of products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 417-422.
- Ranalli, A.; de Mattia, G.; Ferrante, M.L.; Giansante, L. 1997. Incidence of olive cultivation area on the analytical characteristics of the oil. Note 1. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 74, 501-508.
- Ranalli, A.; Ferrante, M.L.; de Mattia, G.; Costantini, N. 1999. Analytical evaluation of virgin olive oil of first and second extraction. *J. Agric. Food Chem.* 47, 417-424.

- Régnier, T.; Macheix, J.J. 1996. Changes in wall-bound phenolic acids, phenylalanine and tyrosine ammonia-lyases, and peroxidases in developing Durum wheat grains (*Triticum turgidum* L. cv *Durum*). *J. Agric. Food Chem.* 44, 1727-1730.
- Roca, M.; Mínguez-Mosquera, M.I. 2001. Changes in chloroplast pigments of olive varieties during fruit ripening. *J. Agric. Food Chem.* 49, 832-839.
- Romani, A.; Mulinacci, N.; Pinelli, P.; Vincieri, F.F.; Cimato, A. 1999. Polyphenolic content in five Tuscany cultivars of *Olea europaea* L. *J. Agric. Food Chem.* 47, 964-967.
- Roubelakis, K.A.; Kliewer, W.M. 1986. Effects of exogenous factors on phenylalanine ammonia-lyase activity and accumulation of anthocyanins and total phenols in grape berries. *Am. J. Enol. Vitic.* 37, 275-280.
- Rovellini, P.; Azzolini, M.; Cortesi, N. 1997a. Tocoferoli e tocotrienoli in oli e grassi vegetali mediante HPLC. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 74, 1-5.
- Rovellini, P.; Cortesi, N.; Fedeli, E. 1997b. Analysis of flavonoids from *Olea europaea* by HPLC-UV and HPLC-electrospray-MS. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 74, 273-279.
- Russel, D.W.; Conn, E.E. 1967. The cinnamic acid 4-hydroxylase of pea seedlings. *Arch. Biochem. Biophys.* 122, 256-268.
- Sacchi, R.; della Medaglia, D.; Musso Spagna, S.; Addeo, F. 1995. Effetto della filtrazione sulla composizione polifenolica degli oli vergini di oliva. Atti del 2° Congresso nazionale di chimica degli alimenti. Giardini Naxos. May 24-27. 515.
- Sacchi, R.; Patumi, M.; Fontanazza, G.; Barone, P.; Fiordiponti, P.; Mannina, L.; Rossi, E.; Segre, A.L. 1996. A High-Field ¹H Nuclear Magnetic Resonance study of the minor components in virgin olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73, 747-758.
- Salas, J.; Pastor, M.; Castro, J.; Vega, V. 1997. Influencia del riego sobre la composición y características organolépticas del aceite de oliva. *Grasas y Aceites* 48, 74-82.
- Salvador, M.D.; Aranda, F.; Fregapane, G. 1998. Chemical composition of commercial *Cornicabra* virgin olive oil from 1995/96 and 1996/97 crops. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75, 1305-1311.
- Salvador, M.D.; Aranda, F.; Fregapane, G. 1999. Contribution of chemical components of *Cornicabra* virgin olive oils to oxidative stability. A study of three successive crop seasons. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76, 427-432.

- Sánchez, A.H., Fernández, M.J.; González, F. 1991. Cambios en la composición de la aceituna durante su desarrollo. *Grasas y Aceites* 42, 414-419.
- Sánchez, J.J.; de Miguel, C.; Marín, J. 1999. La calidad del aceite de oliva procedente de variedades cultivadas en Extremadura en relación con la composición y maduración de la aceituna. *Olivae* 75, 31-36.
- Sarrión, N.; López, M.C.; de la Torre, M.C. 1986. Differentiation of olive oils of the Origin Denominations (Borges Blancos and Siurana) using the discriminant analysis. *Grasas y Aceites* 37, 188-190.
- Satue, M.T.; Huang, S.H.; Frankel, E.N. 1995. Effect of natural antioxidants in virgin olive oil on oxidative stability of refined, bleached and deodorized olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 72, 1131-1137.
- Servili, M.; Baldioli, M.; Miniati, E.; Montedoro, G. 1996. Antioxidant activity of new phenolic compounds extracted from virgin olive oil and their interaction with α -tocopherol and β -carotene. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 73, 55-59.
- Servili, M.; Baldioli, M.; Selvaggini, R.; Macchioni, A.; Montedoro, G. 1999. Phenolic compounds of olive fruit: one and two-dimensional nuclear magnetic resonance characterization of nüzhenide and its distribution in the constitutive parts of the fruit. *J. Agric. Food Chem.* 47, 12-18.
- Smith, R.B.; Billett, E.E.; Giles, A.B. 1977. The photocontrol of gene expression in higher plants. En: Regulation of enzyme synthesis and activity in higher plants. Smith, H. Ed. Academic Press, London. 93-113.
- Solé Riera, M.A. 1990. The influence of auxiliary drip irrigation, with low quantities of water in olive trees in Les Garrigues (Lleida) (cv *Arbequina*). *Acta Horticulturae* 286, 307-310.
- Solé Riera, M.A. 1995. Caracterización organoléptica de los aceites de oliva virgen extra de la variedad Arbequina de la zona de les Garrigues. I Simposio del olivo Arbequino en Cataluña, Borges Blancos. 149-151.
- Soler Rivas, C.; Espín, J.C.; Wichers, H.J. 2000. Oleuropein and related compounds. *J. Sci. Food Agric.* 80, 1013-1023.

- Solinas, M.; di Giovacchino, L.; Mascolo, A. 1978. I polifenoli delle olive e dell'olio d'oliva. Nota III. Influenza della temperatura e della durata de la gramolatura sul contenuto in polifenoli degli oli. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 55, 19-23.
- Solinas, M. 1987. Analisis HRGC delle sostanze fenoliche di oli vergine di oliva in relazione al grado di maturazione e alla varietà delle olive. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 64, 255-262.
- Strack, D. 1997. Phenolic metabolism. En: Plant Biochemistry. Dey, P.M. y Harborne, J.B. Eds. Academic Press Ltd. San Diego. 387-416.
- Tallarico, G. 2000. La construcción comunicativa de las denominaciones de origen. *Revista Latina de Comunicación Social* 34.
- Tan, S.C.; Lam, P.F. 1985. Effect of gamma irradiation on PAL activity and phenolic compounds in papaya and mango fruits. *Asian Food J.* 1, 134-136.
- Tassou, S.C.; Nychas, G.J. 1995. Inhibition of *Salmonella enteritidis* by oleuropein in broth and in a model food system. *Lett. Appl. Microbiol.* 20, 120-124.
- Tous, J.; Romero, A.; Plana, J.; Guerrero, L.; Díaz, I.; Hermoso, J.F. 1997. Características químico-sensoriales de los aceites de oliva *Arbequina* obtenidos en distintas zonas de España. *Grasas y Aceites* 48, 415-424.
- Tous, J.; Romero, A.; Plana, J. 1999. IRTA-i.18. Clon de la variedad de olivo *Arbequina*. *Fruticultura Profesional* 105, 50-55.
- Tranter, H.S.; Tassou, S.C.; Nychas, G.J. 1993. The effect of the olive phenolic compound, oleuropein on growth and enterotoxin B production by *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.* 74, 253-259.
- Tsimidou, M.; Macrae, R.; Wilson, I. 1987. Authentication of virgin olive oils using principal component analysis of triglyceride and fatty acid profiles. I. Classification of Greek oils. *Food Chem.* 25, 227-239.
- Tsimidou, M.; Papadopoulos, G.; Boskou, D. 1992a. Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection. *Food Chem.* 44, 53-60.
- Tsimidou, M.; Papadopoulos, G.; Boskou, D. 1992b. Phenolic compounds and stability of virgin olive oil. Part I. *Food Chem.* 45, 141-144.

- Tsimidou, M.; Karakostas, K. 1993. Geographical classification of Greek virgin olive oil by non-parametric multivariate evaluation of fatty acid composition. *J. Sci. Food Agric.* 62, 653-657.
- Tsimidou, M.; Litridou, M.; Boskou, D.; Pappa-Louisi, A.; Kotsifaki, F.; Petrakis, C. 1996. On the determination of minor phenolic acids of virgin olive oil by RP-HPLC. *Grasas y Aceites* 47, 151-157.
- Tsukamoto, H.; Hisada, S.; Nishie, S. 1984. Lignans from bark of the Olea plants. I. *Chem. Pharm. Bull.* 32, 2730-2735.
- Tsukamoto, H.; Hisada, S.; Nishie, S. 1985. Lignans from bark of the Olea plants. II. *Chem. Pharm. Bull.* 33, 1232-1241.
- Uceda, M.; Hermoso, M. 1998. La calidad del aceite de oliva. En: El cultivo del olivo. 2ª edición. Barranco, D.; Fernández, R. y Rallo, L. Eds. Junta de Andalucía. Consejería de Agricultura y Pesca. Sevilla. 548-571.
- van der Berg, H.; Faulks, R.; Fernando, H.; Hirschberg, J.; Olmedilla, B.; Sandmann, G.; Southon, S.; Stahl, W. 2000. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. *J. Sci. Food Agric.* 80, 880-912.
- Vázquez Roncero, A.; Maestro Durán, R. 1970. Los colorantes antociánicos de la aceituna madura. I. Estudio cualitativo. *Grasas y Aceites* 21, 124-132.
- Vázquez Roncero, A.; Maestro Durán, R.; Graciani Constante, E. 1971. Cambios en los polifenoles de la aceituna durante la maduración. *Grasas y Aceites* 22, 366-370.
- Vázquez Roncero, A.; Janer del Valle, C.; Janer del Valle, L. 1973. Determinación de los polifenoles totales en aceite de oliva. *Grasas y Aceites* 24, 350-357.
- Vázquez Roncero, A.; Graciani Constante, E.; Maestro Durán, R. 1974. Componentes fenólicos de la aceituna. I. Polifenoles de la pulpa. *Grasas y Aceites* 25, 269-279.
- Vázquez Roncero, A.; Janer del Valle, C.; Janer del Valle, M.L. 1975. Polifenoles naturales y estabilidad del aceite de oliva. *Grasas y Aceites* 26, 14-18.
- Vázquez Roncero, A.; Janer del Valle, C.; Janer del Valle, M.L. 1976. Componentes fenólicos de la aceituna. III. Polifenoles del aceite. *Grasas y Aceites* 27, 185-191.

-
- Vierhuis, E.; Servili, M.; Baldioli, M.; Schols, H.A.; Vorage, A.G.J.; Montedoro, G.F. 2001. Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds and polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1218-1223.
- Vlahov, G. 1992. Flavonoids in three olive (*Olea europaea*) fruit varieties during maturation. *J. Sci. Food Agric.* 58, 157-159.
- von Wettstein, D.; Gough, S.; Gamini Kannangara, C. 1995. Chlorophyll biosynthesis. *The Plant Cell* 7, 1039-1057.
- Walter, W.M.; Fleming, H.P.; Etchells, J.L. 1973. Preparation of antimicrobial compounds by hydrolysis of oleuropein from green olives. *Appl. Microbiol.* 26, 773-776.
- Wiseman, S.A.; Mathot, J.; de Fouw, N.J.; Tijburg, L.B.M. 1996. Dietary non-tocopherol antioxidants present in extra-virgin olive oil increase the resistance of low density lipoproteins to oxidation in rabbits. *Atherosclerosis* 120, 1-2.
- Wodner, M.; Lavee, S.; Epstein, E. 1988. Identification and seasonal changes of glucose, fructose and mannitol in relation to oil accumulation during development in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae* 36, 47-54.
- Zarrouk, M.; Marzouk, B.; Ben Miled Daoud, D.; Cherif, A. 1996. Acumulación de la materia grasa del olivo y efecto del suelo en su composición. *Olivae* 61, 41-45.
- Zucker, M. 1965. Induction of phenylalanine deaminase by light and its relation to chlorogenic acid synthesis in potato tuber tissue. *Plant Physiol.* 40, 779-784.