



Universidad de Chile

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química

EFECTO DE LA MADURACIÓN DE LAS OLIVAS Y HELADAS TEMPRANAS SOBRE LA CALIDAD QUÍMICA Y ORGANOLÉPTICA DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERA EN ALIMENTOS

CATALINA NATALIA PINO MARÍN

Directora de memoria:

M.Sc. Nalda Romero Palacios

Profesor Patrocinante:

M.Sc. Nalda Romero Palacios

Codirector:

Prof. Dr. Jorge Saavedra-Torrico

Santiago, Chile

2022

DEDICATORIA

*A mis padres que me apoyaron en todo momento y creyeron en mí, y a mi abuela
Morelia Cartes (q.D.g.) que me dio una meta.*

AGRADECIMIENTOS

Primero, le agradezco a Dios por las oportunidades, bendiciones y personas que ha puesto en mi camino; y a mis padres, Gloria Marín y Luis Pino por su esfuerzo y sacrificio que me permitieron estudiar y por estar siempre a mi lado con apoyo y amor incondicional.

A mi familia que siempre estuvo preocupada y pendiente de mí.

A la profesora Nalda Romero, por sus enseñanzas, alegría, gentileza, apoyo, compromiso y por su preocupación.

A la profesora Betsabet Sepúlveda, por su buena voluntad y preocupación para enseñar.

A mis queridas amigas, Sara y Lili por la hermosa amistad que me han brindado.

A mis estimados compañeros y amigos del laboratorio: Camila, Sebastián, Suony y Marlen por los buenos momentos.

A Ana Sandoval y Leeanny Caipo por lo mucho que me enseñaron y por su amistad.

A Juan Carlos, técnico del laboratorio por su buena voluntad para ayudar y sus enseñanzas.

A la Universidad de Chile a los profesores y profesoras con los que tuve el honor de ser alumna, por los conocimientos entregados y los ambientes amenos y gratos durante las clases.

A la ANID, Proyecto Fondecyt 1191682 por financiar esta investigación.

ÍNDICE

RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	xiii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Antecedentes generales.....	2
1.1.1 Proceso de extracción del aceite de oliva virgen extra.....	3
1.1.2 Clasificación del aceite de oliva.....	5
1.1.3 Evaluación sensorial.....	7
1.2 Composición química de la oliva y del aceite de oliva.....	8
1.2.1 Biosíntesis de compuestos fenólicos.....	9
1.2.2 Biogénesis de compuestos volátiles.....	12
1.2.3 Metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos.....	15
1.3 Efectos del consumo de AOVE en la salud.....	16
1.4 Proceso de maduración y heladas en la oliva.....	18
1.4.1 Etapas de la maduración.....	18
1.4.2 Heladas en las plantaciones.....	19
II. HIPÓTESIS.....	21
III. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo general.....	22
3.2 Objetivos específicos.....	22
IV. MATERIALES Y METODOLOGÍA.....	23
4.1 Lugar de trabajo.....	23
4.2 Materiales.....	23
4.2.1 Muestras.....	23
4.2.2 Reactivos.....	24
4.2.3 Estándares.....	25
4.2.4 Equipos.....	26
4.2.5 Materiales de laboratorio.....	27
4.3 Metodología.....	28
4.3.1 Acidez libre.....	28
4.3.2 Índice de peróxidos.....	29
4.3.3 Espectrofotometría de absorción UV-visible K232 y K270.....	29
4.3.4 Color.....	30
4.3.5 Contenido de compuestos fenólicos.....	31
4.3.6 Capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC).....	32
4.3.7 Determinación de tocoferoles.....	34
4.3.8 Determinación de compuestos volátiles.....	35
4.3.9 Análisis estadístico.....	37
4.3.10 Evaluación sensorial.....	38

4.3.11	Determinación del contenido de glucosa en pasta de olivas.....	38
V.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	40
5.1	Análisis fisicoquímicos de calidad y color.....	40
5.1.1	Acidez libre.....	41
5.1.2	Índice de peróxidos.....	43
5.1.3	Espectrofotometría de absorción UV-visible K232 y K270.....	45
5.1.4	Color.....	49
5.2	Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante.....	53
5.2.1	Perfil de compuestos fenólicos.....	53
5.2.2	Capacidad antioxidante hidrofílica (H-ORAC _{FL}).....	65
5.2.3	Contenido de α -tocoferol.....	67
5.3	Determinación de compuestos volátiles.....	70
5.4	Evaluación sensorial.....	82
5.5	Caracterización Multivariante de las muestras.....	85
5.6	Comportamiento de la glucosa durante la maduración.....	89
VI.	CONCLUSIONES.....	93
VII.	BIBLIOGRAFÍA.....	95
VIII.	Anexo.....	103
	Anexo 1. Criterios de calidad para el aceite de oliva según norma comercial COI/T.15/NC N°3/Rev. 18, junio 2022.....	103
	Anexo 2. Esquema clásico de una almazara para la elaboración de aceite de oliva virgen.....	104
	Anexo 3. Identificación de compuestos fenólicos presentes en aceite de oliva variedad arbequina, por HPLC.....	105
	Anexo 4. Atributos sensoriales y umbral de olor en compuestos volátiles identificados en aceites de oliva virgen extra.....	106
	Anexo 5. Acción de la β -glucosidasa en el metabolismo de compuestos fenólicos en olivas.....	107
	Anexo 6. Correlación positiva entre compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante hidrofílica durante la maduración.....	108

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de ácidos fenólicos en la ruta metabólica del ácido shikímico.....	11
Figura 2. Ruta de la biosíntesis de la oleuropeína y ligustrósido a partir de ácido mevalónico.....	12
Figura 3. Formación de compuestos volátiles C6 en la cascada de la lipoxigenasa.....	13
Figura 4. Resumen de las vías metabólicas involucradas en la formación de compuestos volátiles en AOVE.....	15
Figura 5. Representación gráfica espacial tridimensional del sistema de coordenadas CIE L*a*b*.....	31
Figura 6. Variación de la acidez libre de los AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas en función de los meses de cosecha.....	42
Figura 7. Variación del Índice de Peróxidos con los meses de cosecha en aceite proveniente de olivas frescas y congeladas.....	44
Figura 8. Variación del parámetro K232 en AOVE procedente de olivas frescas y congeladas con los meses de cosecha.....	46
Figura 9. Variación del parámetro K270 en AOVE procedente de olivas frescas y congeladas con los meses de cosecha.....	48
Figura 10. Variación de las coordenadas del espacio CIEL*a*b* en los AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas durante la maduración.....	50
Figura 11. Variación de los compuestos fenólicos totales en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas en diferentes estados de maduración.....	57
Figura 12. Cambio en la concentración de los compuestos secoiridoides en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas durante la maduración.....	59
Figura 13. Cambio en la concentración de los compuestos fenólicos flavonoides y pinosinol en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas durante la maduración.....	62
Figura 14. Cambio en la concentración de los compuestos fenólicos oxidados en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas durante la maduración.....	63
Figura 15. Efecto de la helada y el tiempo de cosecha en la capacidad antioxidante hidrofílica (ORAC) de los AOVE.....	66
Figura 16. Comportamiento del α -tocoferol en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas en diferentes estados de maduración.....	68
Figura 17. Variación de compuestos volátiles totales en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas, con la maduración de las olivas.....	74
Figura 18. Efecto de la helada y la maduración sobre los compuestos volátiles mayoritarios presentes en AOVE.....	76

Figura 19. Variación de compuestos volátiles intermedios en AOVEs procedentes de olivas frescas (A) y congeladas (B), con la maduración de las olivas.....	79
Figura 20. Variación de las concentraciones de (<i>E</i>)-2-heptenal y pentanal (valeraldehído) en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas durante la maduración.....	81
Figura 21. Resultados del análisis de componentes principales (PCA).....	86
Figura 22. Resultados del análisis de discriminación de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA).....	88
Figura 23. Comportamiento del contenido de glucosa en pasta de olivas variedad Arbequina durante la maduración.....	90
Figura 24. Acumulación de aceite en la oliva durante el proceso de maduración.....	91
Figura 25. Relación entre la glucosa (%) y el rendimiento graso (%), entre los meses de mayo, julio y septiembre.....	92

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estado e índice de madurez de las olivas variedad arbequinas de la cosecha 2020.....	24
Tabla 2. Características fisicoquímicas del aceite de oliva variedad arbequina procedente de olivas frescas en el primer mes de cosecha.....	40
Tabla 3. Efecto de la helada y maduración sobre ΔE en AOVE variedad Arbequina.....	51
Tabla 4. Clasificación de compuestos fenólicos presentes en aceite de oliva virgen extra (AOVE) y su abreviatura.....	54
Tabla 5. Efectos de la maduración y el congelamiento en el perfil de compuestos fenólicos, α -tocoferol y capacidad antioxidante del AOVE variedad arbequina.....	55
Tabla 6. Efectos de la maduración y el congelamiento en el perfil de compuestos volátiles en el AOVE variedad arbequina.....	72
Tabla 7. Análisis sensorial de AOVEs procedentes de Arbequinas frescas y congeladas, en diferentes estados de maduración.....	83

ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de Varianza

AOCS: Sociedad Americana de Químicos de Aceites

AOVE: Aceite de Oliva Virgen Extra

CIE: Comisión internacional de iluminación (francés)

COI: Consejo Oleícola Internacional

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

FIA: Fundación para la Innovación Agraria

HAT: Transferencia de átomo de hidrógeno

HDL: Lipoproteína de Alta Densidad

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Resolución

INIA: Instituto de Investigaciones Agropecuarias

LDL: Lipoproteína de Baja Densidad

PCA: Análisis de Componentes Principales

PLS-DA: Análisis de Discriminación de Mínimos Cuadrados Parciales

UNE: Asociación Española de Normalización

RESUMEN

El aceite de oliva es el jugo del fruto del olivo (*Olea europaea L.*) extraído por procesos mecánicos y es la principal fuente de grasa en la dieta mediterránea. Su buena valoración se debe a las propiedades organolépticas y nutricionales otorgadas por el perfil de ácidos grasos, compuestos volátiles y antioxidantes. El consumo de este aceite se ha asociado a la disminución del riesgo de cáncer, enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas.

El olivo es un árbol resistente a las bajas temperaturas, hasta que el congelamiento provoca daños en el tejido celular. Otro factor que afecta las olivas es el grado de maduración, ya que durante este proceso se observan cambios en la composición química de los frutos.

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos producidos por la helada y el estado de maduración en la calidad del aceite de oliva virgen extra (AOVE) de variedad Arbequina. Se evaluaron parámetros fisicoquímicos de calidad, antioxidantes y compuestos volátiles en el AOVE y el contenido de glucosa en la pasta de olivas.

Las olivas se cosecharon durante cinco meses (desde mayo hasta septiembre), congelándose la mitad de cada cosecha en un frigorífico a $-3\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 12 horas. El aceite se extrajo de las olivas frescas y descongeladas, con una máquina modelo Frantoíno a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$. Los aceites se envasaron en frascos de vidrio color ámbar, y se congelaron a -23°C hasta su análisis. En los AOVes se

determinó: acidez libre, IP, K232, K270, colorimetría y tocoferoles según AOCS (1993); H-ORAC_{FL} según Prior y cols. (2003), perfil de fenoles según Mateos y cols., (2001) y cata de los aceites de oliva por un servicio externo. Los datos se analizaron mediante ANOVA e Intervalos de comparaciones múltiples de Fisher LSD, y modelos de análisis de componentes principales y Regresión Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales.

De acuerdo con los parámetros de calidad y la evaluación sensorial realizada, los aceites procedentes de olivas frescas y congeladas mantuvieron la categoría de virgen extra. Se observó un aumento en el IP y acidez libre al avanzar el estado de maduración.

A medida que las olivas fueron madurando, el contenido de α -tocoferol y compuestos fenólicos totales disminuyeron significativamente en aceites procedentes de olivas frescas y congeladas. El primer derivado de la oleuropeína (3,4-DHPEA-EDA) predominó en aceites de olivas congeladas por la acción de la enzima β -glucosidasa sobre la oleuropeína en el tejido dañado por la congelación.

Los aceites provenientes de olivas congeladas presentaron una menor concentración de compuestos volátiles, y no se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) entre los estados de maduración en los AOVEs de olivas frescas y congeladas. Los compuestos volátiles más abundantes fueron el (*E*)-2-hexenal, hexanal, (*E*)-2-hexenol y 1-hexanol. No se observaron diferencias

significativas ($p > 0,05$) en compuestos volátiles característicos de la helada entre AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas.

Los modelos PCA y PLS-DA mostraron que hay una distinción clara entre los AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas, y entre los estados de maduración.

Se encontró una correlación negativa entre el contenido de glucosa y rendimiento graso en la pasta de olivas variedad Arbequina durante la maduración.

Este trabajo de investigación fue financiado por ANID, Proyecto FONDECYT N.º 1191682.

ABSTRACT

Olive oil is the juice of the fruit of the olive tree (*Olea europaea L.*) extracted by mechanical processes and is the main source of fat in the Mediterranean diet. Its good valuation is due to the organoleptic and nutritional properties given by the profile of fatty acids, volatile and antioxidants compounds. The consumption of this oil has been associated with the decreased risk of cancer, cardiovascular and neurodegenerative diseases.

The olive tree is resistant to low temperatures, until freezing causes damage to the cellular tissue. Another factor that affects olives is the degree of ripeness, since during this process changes in the chemical composition of the fruits are observed.

The aim of this study was to evaluate the effects of frost and ripening stage on the quality of Arbequina extra virgin olive oil (EVOO). Physicochemical parameters of quality, antioxidants and volatile compounds in EVOO and glucose content in olive paste were evaluated.

The olives were harvested for five months (from May to September), freezing half of each harvest in a refrigerator at $-3\pm 1^{\circ}\text{C}$ for 12 hours. The oil was extracted from fresh and thawed olives with a Frantoíno model machine at $26\pm 1^{\circ}\text{C}$. The oils were packed in amber glass bottles and frozen at -23°C until analysis. In the EVOOs it was determined: free fatty acid, PV, K232, K270, colorimetry and tocopherols according to AOCS (1993); H-ORAC_{FL} according to

Prior et al., (2003), profile of phenols according to Mateos et al., (2001) and sensory evaluation of olive oils by an external service. Data were analyzed by ANOVA and Fisher's multiple comparisons intervals (LSD), principal component analysis and Partial Least Squares Discriminant Regression (PLS-DA).

According to the quality parameters and the sensory evaluation conducted, the oils from fresh and frozen olives kept the category of extra virgin. An increase in PV and free fatty acid was seen as the maturation stage progressed.

As the olives matured, the content of α -tocopherol and total phenolic compounds decreased significantly in oils from fresh and frozen olives. The first oleuropein derivative (3,4-DHPEA-EDA) predominated in frozen olive oils by the action of the enzyme β -glucosidase on oleuropein in freeze-damaged tissue.

Oils from frozen olives presented a lower concentration of volatile compounds, and no significant differences ($p > 0,05$) were found between ripening stages in AOVEs from fresh and frozen olives. The most abundant volatile compounds were (*E*)-2-hexenal, hexanal, (*E*)-2-hexenol and 1-hexanol. No significant differences ($p > 0,05$) were seen in volatile compounds characteristic of frost between EVOOs from fresh and frozen olives.

The PCA and PLS-DA models showed that there is a clear distinction between EVOOs from fresh and frozen olives, and between ripening stages.

A negative correlation was found between glucose content and fat yield in Arbequina variety olive paste during ripening.

This research work was financed by ANID, FONDECYT Project N. ° 1191682.

I. INTRODUCCIÓN

El olivo (*Olea europaea L.*) es un árbol longevo perteneciente a la familia de las Oleáceas que se caracteriza por tener un tronco retorcido y copa redondeada. La existencia del olivo se remonta a 12000 años, cuyo origen es Asia menor (Siria e Irán) pero su cultivo se remonta 6000 años atrás. En el siglo XVI se produjo un gran movimiento migratorio español que introdujo el olivo en América; primero en México, EE. UU. (California) y Perú, desde donde se difundió a Chile y Argentina. Primero llegó al valle de Azapa y posteriormente al valle del Huasco (Tapia y cols., 2003).

En el antiguo Egipto se cultivaba para obtener aceite para uso en ceremonias religiosas como unguento. El cultivo del olivo fue mejorado por los griegos entre los siglos VIII y VII a.C., cuando Atenas se convirtió en la ciudad más importante. Según el mito, Atenea la diosa de la sabiduría regaló a los griegos un olivo tras ganar la disputa contra Poseidón (dios del mar); en otras palabras, el olivo representaba un regalo de los dioses del Olimpo a los humanos, por ello, a los atletas se les ungía el cuerpo con aceite de oliva en las olimpiadas (Barjol, 2013).

En Chile existe una variedad que se desarrolló a partir del material traído por los españoles, la cual se adaptó a las condiciones agroclimáticas de la zona norte a la zona central del país. A medida que el cultivo adquirió relevancia económica se introdujeron a finales del siglo XX las primeras variedades

destinadas principalmente a la extracción de aceite de oliva: Arbequina, Picual, Frantoio y Leccino (Tapia y cols., 2017). La principal variedad de cultivo a nivel nacional es Arbequina, la cual abarca el 57% de la superficie plantada de olivos, seguida por Arbosana (20%). La variedad Arbequina es originaria de España y su fruto es ovalado y pequeño. El aceite extraído es aromático, verde herbáceo, dulce, muy poco amargo y picante (Chile Oliva, 2019).

La industria olivícola nacional se formó en el año 1952 y a fines de los 90 se dio paso a fuertes inversiones, estrategias de comercialización y exportaciones. El comienzo de la olivicultura moderna en Chile estuvo marcado con la introducción de las principales variedades aceiteras utilizadas a nivel mundial junto a la tecnología de producción. En la actualidad Chile posee más de 24.000 hectáreas plantadas de olivos para la extracción de aceite y la producción aumenta año a año (Chile Oliva, 2019).

1.1 Antecedentes generales

El aceite de oliva es el jugo aceitoso del fruto del olivo (*Olea europea L.*), se extrae por prensado en frío y su color es dorado o verdoso (Albin y Villamil, 2003). Tiene un perfil sensorial característico único entre los aceites vegetales ya que se puede consumir crudo, lo que le permite conservar vitaminas y compuestos fenólicos de importancia nutricional (Petrakis, 2006). La composición del aceite de oliva virgen extra depende principalmente de la composición química del fruto del olivo, que varía con el cultivar, etapa de

maduración, condiciones ambientales de crecimiento como el estrés biótico y abiótico, (Conde y cols., 2008).

1.1.1 Proceso de extracción del aceite de oliva virgen extra

La extracción de aceite de oliva virgen tiene el propósito de separar la fase oleosa de los demás constituyentes del fruto. En este proceso se utilizan mayoritariamente sistemas continuos, donde la separación de las fases se realiza mediante fuerza centrífuga. Las fases que se obtienen de este proceso son: aceite, alpechín (desechos líquidos) y orujo. Si se emplea un sistema de extracción continua de dos fases solo se obtiene aceite y orujo húmedo (García Sánchez y cols., 2001).

A continuación, se describen las etapas del proceso de elaboración del aceite de oliva (ver Anexo 2):

- Recolección: comienza cuando el fruto alcanza la madurez óptima, ya que este parámetro influye en su contenido graso y tipo de compuestos fenólicos y volátiles. Tradicionalmente, las olivas se cosechan cuando la piel es amarilla-verde o negro-violeta, ya que en el mismo árbol la fruta no madura simultáneamente (Petrakis, 2006). Una vez recolectadas las olivas, se transportan a la almazara donde son lavadas (Chile Oliva, 2020).
- Remoción de hojas y lavado: estas etapas son importantes porque se eliminan materias extrañas que puedan contaminar el producto o dañar la

maquinaria. La remoción de hojas es realizada por una potente aspiradora que elimina hojas y ramillas. El lavado se realiza en un depósito que hace circular el agua (Di Giovacchino, 2013).

- Molienda: una vez lavadas, las olivas se llevan al molino para romper las células de las frutas y liberar el aceite contenido en las vacuolas (Petrakis, 2006). El tiempo de trituración más adecuado es de 20 a 30 minutos de 3 a 5°C a una velocidad de rotación de 12 -15 rpm. Esta operación evita la formación de emulsiones y permite que en la malaxación las gotitas de aceites se unan a las grandes (Di Giovacchino, 2013) .
- Malaxación o amasado: esta operación es fundamental para aumentar el rendimiento de la extracción. Su objetivo es romper la emulsión aceite/agua, de modo que por coalescencia las gotas de aceite se unan para formar gotas más grandes. El tiempo óptimo de malaxación es de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente, sin sobrepasar los 22°C-25°C (Petrakis, 2006).
- Centrifugación (decanter): en esta etapa se separan definitivamente los componentes y puede ser de dos o tres fases (Chile Oliva, 2020). Este método se basa en que dos líquidos inmiscibles pueden separarse utilizando una fuerza que los afecte de manera diferente dependiendo de su densidad. El mosto oleoso se somete a decantación para separar el aceite de los sólidos en suspensión y el agua (Petrakis, 2006). En general la centrífuga rota a 3500-3600 rpm (Di Giovacchino, 2013)

- Filtración y almacenamiento: el aceite se pasa por un sistema de filtrado para eliminar restos sólidos y finalmente se almacena en cubas de acero inoxidable hasta su envasado (Chile Oliva, 2020).

1.1.2 Clasificación del aceite de oliva

El Consejo Oleícola Internacional (COI) clasifica al aceite de oliva en diferentes categorías de acuerdo con sus parámetros fisicoquímicos de calidad en la Norma COI/T.15/NC N°3/Rev. 18, junio 2022. La clasificación según la Norma es la siguiente:

- Aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo debido a la forma que se obtienen. Incluyen:

Aceite de oliva virgen Extra: aceite de oliva virgen cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,8 gramos por 100 gramos y cuyas demás características corresponden a las fijadas para esta categoría en la presente Norma (Anexo 1) (International Olive Council, 2022).

Aceite de oliva virgen: aceite de oliva virgen cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 2 gramos por 100 gramos y cuyas demás características corresponden a las fijadas para esta categoría en la presente Norma (Anexo 1) (International Olive Council, 2022).

Aceite de virgen corriente: aceite de oliva virgen cuya acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 3,3 gramos por 100 gramos y cuyas demás

características corresponden a las fijadas para esta categoría en la presente Norma (Anexo 1) (International Olive Council, 2022).

- Aceites de oliva no aptos para el consumo humano. Incluyen:

Aceite de oliva virgen lampante: aceite de oliva virgen cuya acidez libre expresada en ácido oleico es superior a 3,3 gramos por 100 gramos y/o cuyas características organolépticas y demás características corresponden a las fijadas para esta categoría en la presente Norma. Se destina a las industrias de refinado o a usos técnicos (International Olive Council, 2022).

Aceite de oliva refinado: es el aceite de oliva obtenido de los aceites de oliva vírgenes mediante técnicas de refinado que no provoquen ninguna modificación de la estructura glicerídica inicial. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 0,3 gramos por 100 gramos y sus demás características corresponden a las fijadas para esta categoría en la presente Norma (International Olive Council, 2022).

Aceite de oliva: es el aceite constituido por la mezcla de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes aptos para el consumo en la forma en que se obtienen. Su acidez libre expresada en ácido oleico es como máximo de 1 gramo por 100 gramos y sus demás características corresponden a las fijadas para esta categoría en la presente Norma (International Olive Council, 2022).

Aceite de orujo de oliva: es el aceite obtenido por tratamiento con disolventes u otros procedimientos físicos de los orujos de oliva, con exclusión de los aceites

obtenidos por procedimientos de reesterificación y de toda mezcla con aceites de otra naturaleza (International Olive Council, 2022).

1.1.3 Evaluación sensorial

El AOVE se diferencia de los demás aceites vegetales por sus notas sensoriales agradables, conferidas por los compuestos volátiles y fenólicos están relacionados con las percepciones olfativas y gustativas, respectivamente (Cerretani y cols., 2008).

El proceso de evaluación sensorial inicia con la presencia de un estímulo físico o química sobre órganos especializados en recibir estímulos. La cantidad mínima de un estímulo da lugar a la aparición de una sensación se denomina umbral. En el AOVE, las características químicas y sensoriales están asociadas con el tipo de oliva, procesos de extracción, almacenamiento, entre otras (Sancho y cols., 1999).

La Unión Europea (UE) y el Consejo Oleícola Internacional (COI) establecieron parámetros y Normativas para la evaluación del aceites de oliva en función de sus características químicas y sensoriales (evaluadas por un panel de cata oficialmente reconocido) para poder clasificarlo (Sancho y cols., 1999).

1.2 Composición química de la oliva y del aceite de oliva

El peso total de la oliva comprende del 70%-90% a mesocarpio, 9%-27% a endocarpio y 2%-3% a semilla. Los componentes mayoritarios del mesocarpio son aproximadamente 60% de agua, 30% aceite y 4% azúcares (Conde y cols., 2008).

Entre el 98% y 99% del aceite de oliva está compuesto por una fracción saponificable constituida por triglicéridos dominados por los ácidos grasos: Oleico (55% a 83%), palmítico (7,5 a 20%), linoleico (3,5% a 21%) y esteárico (0,5% a 5%) (López y cols., 2008). Parte de la fracción saponificable la forman ácidos grasos libres cuya proporción depende del grado de hidrólisis de los triglicéridos. La composición de los ácidos grasos varía según la variedad, condiciones climáticas, etapa de maduración y producción (Vossen, 2013). La fracción insaponificable corresponde a compuestos minoritarios (aproximadamente 2% del aceite) con más de 230 compuestos químicos menores, como, por ejemplo: alcoholes alifáticos y triterpénicos, esteroides, hidrocarburos, compuestos volátiles, antioxidantes y trazas metálicas como el Cu, Fe, Mn y Pb (López y cols., 2008; Servili y cols., 2014).

1.2.1 Biosíntesis de compuestos fenólicos

El contenido fenólico es un parámetro importante en el AOVE ya que contribuyen al flavor, aroma y protegen al aceite de la oxidación (Morelló y cols., 2005). Los compuestos antioxidantes principales del aceite de oliva se clasifican en fenoles lipofílicos e hidrofílicos:

- Fenoles lipofílicos: son tocoferoles y tocotrienoles, siendo los α -tocoferoles los más abundantes (~90%) y su concentración depende de los mismos factores de los ácidos grasos. Su rango varía entre 23 y 750 mg/kg de aceite (Servili y cols., 2014). Los tocoferoles son fenoles metilados de los cuales el α -tocoferol es el que tiene mayor actividad de vitamina E. Estos antioxidantes inhiben la oxidación de lípidos en los alimentos deteniendo la reacción en cadena de los radicales de oxígeno, previniendo la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Cayuela y García, 2017).
- Fenoles hidrofílicos: son metabolitos vegetales secundarios que se sintetizan principalmente a través del metabolismo de los fenilpropanoides, cuyos precursores se sintetizan en dos vías principales: vía del ácido shikímico y vía del ácido mevalónico (Figura 1). La importancia de estos fenoles radica en las propiedades antioxidantes y en los atributos de sabor que confieren al aceite, como amargor, pungencia y astringencia. En el aceite de oliva se pueden encontrar diferentes grupos

de fenoles, tales como: alcoholes, ácidos fenólicos, lignanos, flavonoides, secoiridoides y sus metabolitos (Tripoli y cols., 2005).

A continuación, se mencionan las rutas metabólicas más importantes de los compuestos fenólicos hidrofílicos:

Metabolismo de los fenilpropanoides: los flavonoides son sintetizados al final de esta ruta a través de la activación de complejos multienzimáticos encontrados en el citosol. El esqueleto básico de los flavonoides se forma con la interacción de malonil-CoA, p-cumaril-CoA y chalcona sintasa, dando origen a flavonas y antocianinas (de la Rosa y cols., 2018).

Ruta del ácido shikímico: la glucólisis no oxidativa de la glucosa produce fosfoenolpiruvato y eritrosa-4-fosfato, ambos son reactivos iniciales para la formación del ácido shikímico, corismato y precursores de la fenilalanina y tirosina. A partir de estos compuestos se forman ácidos fenólicos, flavonoides y antocianinas (El Riachy y cols., 2011). En la Figura 1, se observa parte de la ruta metabólica del ácido shikímico.

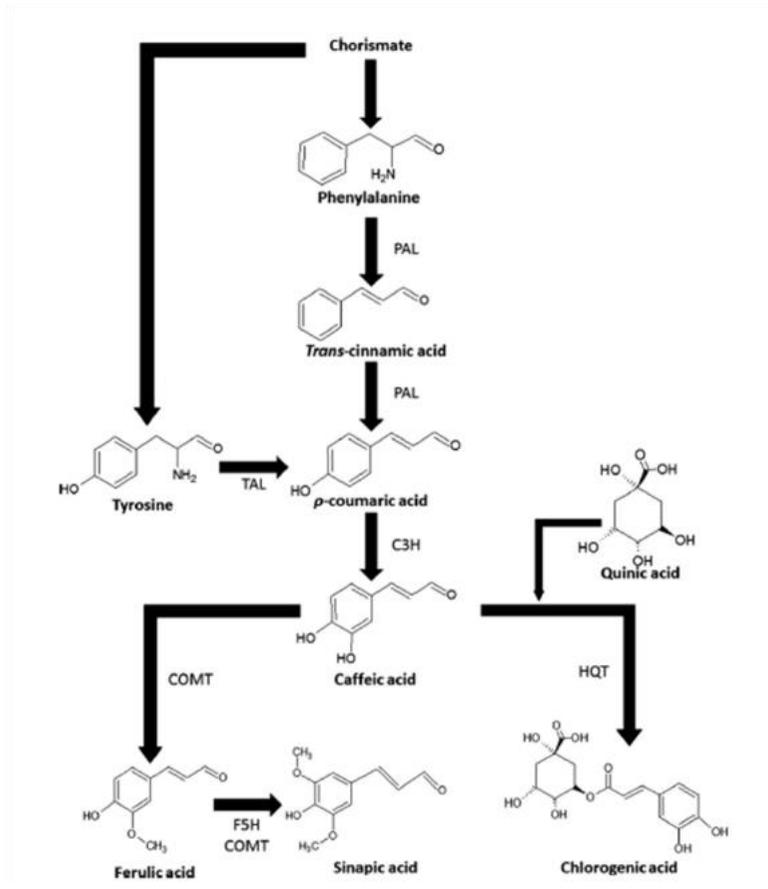


Figura 1. Formación de ácidos fenólicos en la ruta metabólica del ácido shikímico. Abreviaciones: C3H, cumaril-3-hidrolasa; COMT, ácido cafeico o-metiltransferasa; F5H, 5-hidrolasa ferúlica; HQT, hydroxycinnamoyl-coenzyma-A quinato transferasa; PAL, fenilalanina amonio liasa; TAL, tirosina amoniaco liasa. Fuente: (de la Rosa y cols., 2018)

Ruta del ácido mevalónico: el ácido mevalónico es el sustrato inicial para la formación de 7-cetologanina, a partir de la cual se forma el éster 11-metilico oleósido, que da paso al 7 β -1 D-glucopiranosil 11-metil oleósido, este compuesto unido a tirosol da origen al ligustrósido, que por hidroxilación forma la oleuropeína (ver Figura 2) (El Riachy y cols., 2011).

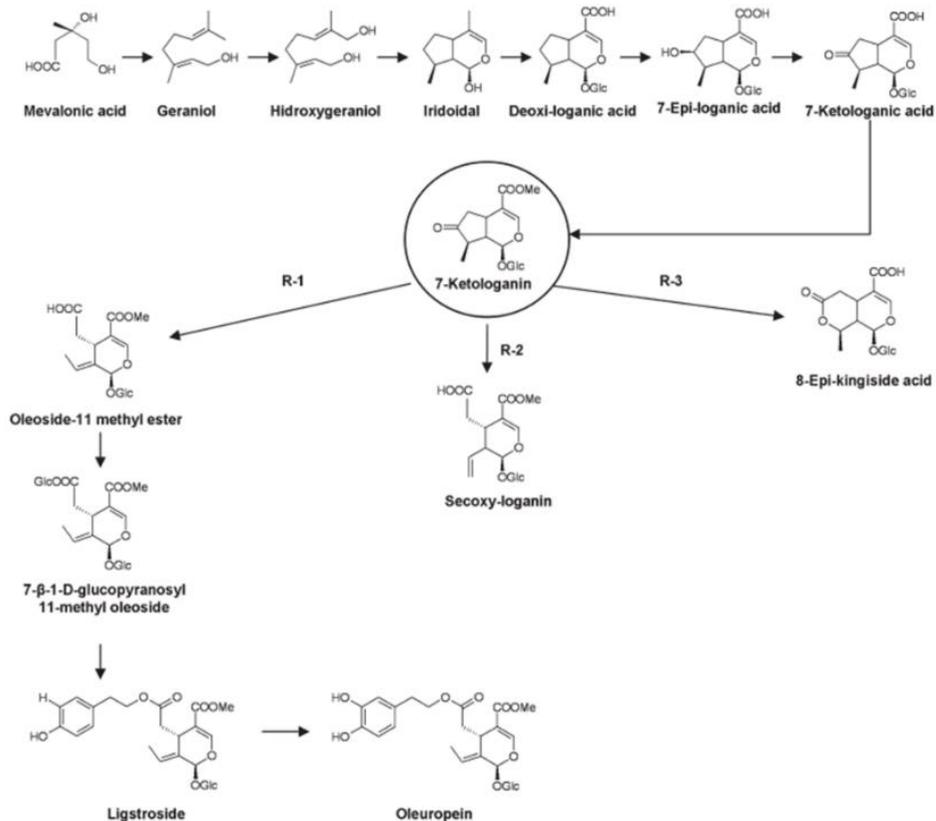


Figura 2. Ruta de la biosíntesis de la oleuropeína y ligustrósido a partir de ácido mevalónico. Fuente: (Gutiérrez-Rosales y cols., 2010).

1.2.2 Biogénesis de compuestos volátiles

Los diferentes matices del aroma en los aceites de oliva vírgenes, se relacionan con las distintas vías que contribuyen a la formación de compuestos volátiles (Angerosa, 2002). Las principales vías implicadas en la producción de compuestos volátiles son:

Ruta de la lipoxigenasa (LOX): se originan compuestos de seis carbonos (C₆) como aldehídos, alcoholes, ésteres y cetonas (Angerosa, 2002). El proceso inicia con la producción de 9 y 13-hidroperóxido de los ácidos grasos linoleico (LA) y

α -linolénico (LnA) mediado por la enzima lipoxigenasa, como se observa a continuación en la Figura 3. La ruptura de los hidroperóxidos es catalizada por hidroperóxido liasas. Esta ruta metabólica es predominante en aceites de alta calidad (Angerosa y cols., 2004).

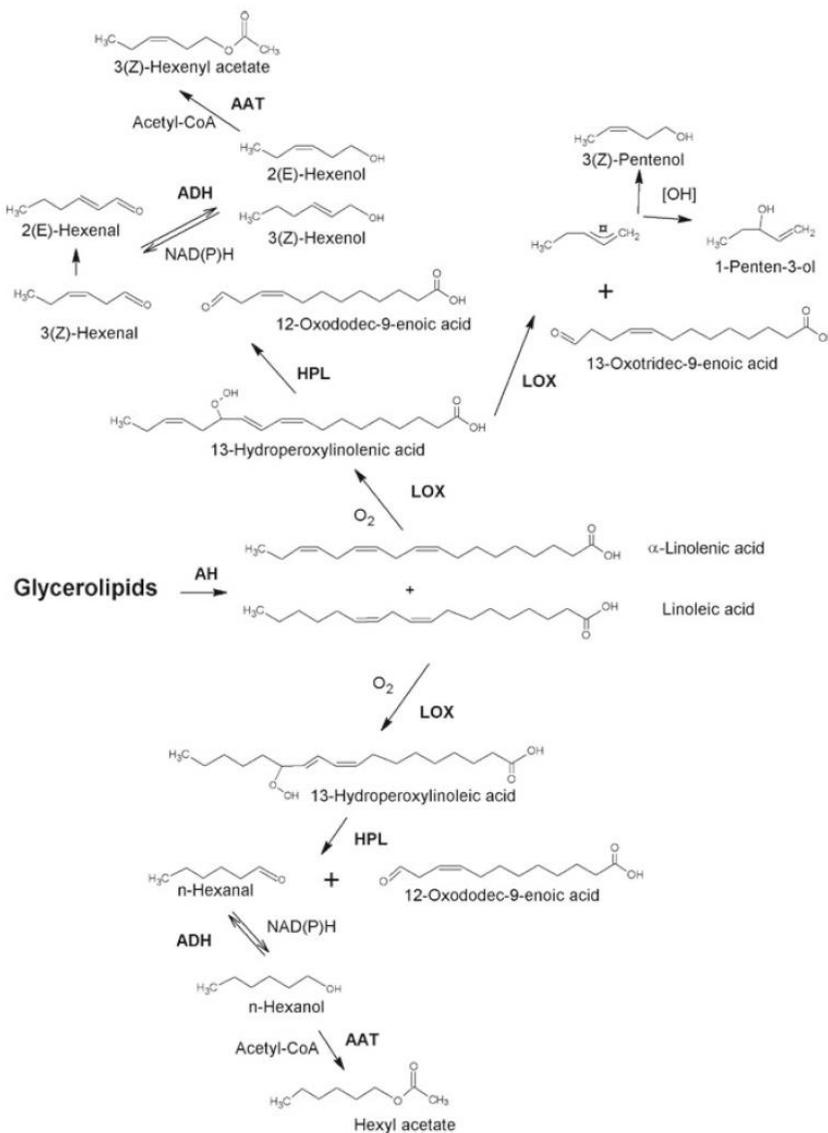


Figura 3. Formación de compuestos volátiles C6 en la cascada de la lipoxigenasa, a partir de ácido linoleico y linolénico. Abreviaciones: LOX lipoxigenasa; HPL hidroperóxido liasa; ADH alcohol deshidrogenasa; AH acil transferasa; AAT alcohol acil transferasa. Fuente: (Salas y cols., 2013).

Metabolismo de ácidos grasos: durante la maduración, las olivas desarrollan la capacidad de convertir ácidos grasos en cetonas, ésteres, y alcoholes (Morales y cols., 2013)

Conversión de algunos aminoácidos: la activación de esta ruta transforma la leucina, isoleucina y valina en compuestos volátiles tales como: 2-metil-butanal, 3-metil-butanal y sus correspondientes alcoholes reducidos enzimáticamente (Angerosa y cols., 2001).

Ruptura del 13-hidroperóxido del ácido linolénico: da lugar a la formación de radicales 1,3-penteno que posteriormente se dimerizan para formar hidrocarburos de 10 carbonos (C₁₀), o se acoplan a un radical hidroxilo para formar alcoholes C₅ (Morales y cols., 2013), como se muestra en la Figura 4.

Fermentación de azúcares: estas reacciones se realizan por la presencia de microorganismos. Si la fermentación es alcohólica se forman alcohol etílico, acetato etílico y ácido acético. Si la fermentación es butírica se forman metil y etil butirato (Angerosa, 2002).

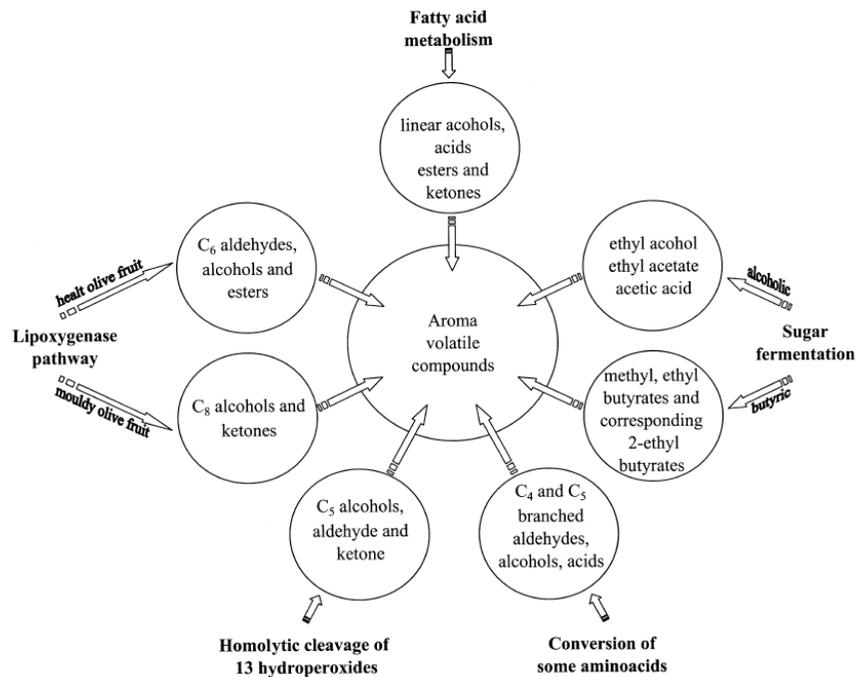


Figura 4. Resumen de las vías metabólicas involucradas en la formación de compuestos volátiles en AOVE. Fuente: (Angerosa, 2002).

1.2.3 Metabolismo de carbohidratos y ácidos grasos

En plantas superiores, el CO₂ se fija por medio la fotosíntesis en los cloroplastos de las hojas. Primero se produce la síntesis de triosa-fosfato, la cual se lleva al citosol para formar sacarosa. La sacarosa se transporta al resto de la planta para el suministro de energía metabólica y carbono reducido para el crecimiento y desarrollo de otros órganos. Oligosacáridos de la rafinosa (galactosa, fructosa y glucosa) y manitol también son sintetizados y trasladados a través del floema hasta los demás tejidos, incluidos los frutos en desarrollo (Salas y cols., 2000).

Conforme avanza el proceso de maduración el contenido de azúcares reductores y solubles totales desciende y al final se mantienen constantes (Beltrán y cols., 2008), ya que parte de los carbohidratos son utilizados por la oliva para la biosíntesis de ácidos grasos y crecimiento celular (Rallo y cols., 2018). La concentración de glucosa cae a medida que el mesocarpio acumula lípidos de almacenamiento y es transformada a Acetil-CoA que posteriormente será metabolizado en ácido graso mediante la adición de dos unidades de carbonos durante el ciclo. Por otro lado, el manitol aumenta durante la maduración para cumplir su función de osmoprotector y reserva de energía (Conde y cols., 2008).

1.3 Efectos del consumo de AOVE en la salud

El aceite de oliva es la principal fuente de grasa en la dieta mediterránea. Se ha relacionado este patrón dietético con la longevidad, menor incidencia en enfermedades coronarias, neurodegenerativas y cáncer (Visioli y cols., 2018). A continuación, se mencionarán los componentes del aceite de oliva asociados a los beneficios en la salud:

- Presencia de compuestos antioxidantes:

Las reacciones bioquímicas que ocurren en el organismo (como la cadena respiratoria, por ejemplo) generan especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan moléculas como el ADN, proteínas y lípidos, a menos que sean

interceptados por antioxidantes rompedores de cadena (EFSA Panel on Dietetic Products, 2011) como lo son los compuestos fenólicos.

Los lípidos se transportan por la sangre dentro de quilomicrones, HDL (lipoproteínas de alta densidad) y LDL (lipoproteínas de baja densidad), estas últimas se ven afectadas por LDL oxidasas produciendo LDL oxidado. Los niveles elevados de LDL oxidado han mostrado una correlación positiva con la gravedad de los eventos coronarios agudos (Covas y cols., 2006). Los polifenoles presentes en el aceite de oliva actúan protegiendo las partículas de LDL reduciendo la cantidad de LDL oxidado (De La Torre-Carbot y cols., 2010).

El EFSA ha declarado los siguientes *claims* saludables para el aceite de oliva: Los polifenoles del aceite de oliva protegen a las partículas LDL del daño oxidativo, presentan propiedades antioxidantes, reduce el estrés oxidativo, protegen las células del cuerpo. Estas propiedades han sido atribuidas al hidroxitirosol y sus compuestos derivados. La condición es que en 20 gramos de aceite estén contenidos 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados. Esta cantidad puede consumirse fácilmente en el contexto de una dieta equilibrada y la población objetivo es la población en general (EFSA Panel on Dietetic Products, 2011).

➤ Efecto del ácido oleico

El consumo de aceite de oliva ayuda a disminuir los riesgos de enfermedades cardiovasculares debido a su perfil lipídico monoinsaturado. El

ácido linolénico representa el 90% de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) presentes en LDL y es el sustrato principal de oxidación. Las dietas ricas en ácido oleico generan partículas más resistentes al proceso oxidativo (Covas y cols., 2006). Por lo tanto, las dietas ricas en ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) reducen la susceptibilidad del LDL a la oxidación, porque el LDL rico en oleato es más resistente que LDL rico en linoleato (Perona y cols., 2006). Por otro lado, el ácido oleico reduce las proporciones de colesterol total/HDL y de LDL/HDL, estos indicadores son muy eficaces para predecir una cardiopatía coronaria (Cicero y cols., 2008).

1.4 Proceso de maduración y heladas en la oliva

1.4.1 Etapas de la maduración

Estudiar la madurez en olivas es importante debido a que afecta la calidad, rendimiento y estabilidad del aceite. Durante el desarrollo del fruto se producen transportes de azúcares y cambios metabólicos que resultan en variaciones fisicoquímicas y bioquímicas (Conde y cols., 2008). A medida que las olivas maduran cambian de tamaño, composición química, color, textura, flavor y susceptibilidad a patógenos. El desarrollo del fruto dura entre 4 a 5 meses y comprende los procesos de división celular (crecimiento del embrión y el endocarpio), expansión celular (desarrollo del mesocarpio) y acumulación de aceite. La síntesis de aceite se incrementa durante la maduración y el mejor momento para la cosecha es cuando se logra un balance entre ácidos grasos y poder antioxidante (Conde y cols., 2008). Cuando el fruto está en envero, está

listo para ser cosechado y su índice de madurez tiene valores próximos a 3,5 (Beltrán y cols., 2008).

El cambio de color de la piel va desde verde a negro, y se produce porque los pigmentos de clorofila son reemplazados por antocianinas (García y cols., 1996).

1.4.2 Heladas en las plantaciones

La helada meteorológica es el descenso de la masa de aire a 1,50 m del suelo cuando la temperatura es de 0°C o inferior. También se suele hablar de helada agronómica con temperaturas mínimas cercanas o inferiores a 2°C (cuando los tejidos de las plantas sufren daños). Este fenómeno meteorológico provoca daños graves a la agricultura, cuyos efectos dependen de la intensidad y duración. La intensidad depende de la velocidad del viento, la humedad del aire, entre otros factores (Luchabeche Vera, 2020).

A medida que la temperatura desciende bajo los 0°C se comienza a formar primero el hielo en el espacio extracelular de los frutos, debido a que este líquido tiene un punto de congelación más alto por la menor concentración de solutos en comparación con el líquido intracelular. El potencial químico del hielo es menor que el del agua líquida y provoca movimiento del agua desde el interior de la célula siguiendo el gradiente químico, produciendo deshidratación celular (Thomashow, 1999). Además de la deshidratación, la formación de los cristales de hielo rompe las membranas celulares causando la muerte de la célula y

aumentando las reacciones de oxidación como consecuencia del contacto entre las enzimas con sus respectivos sustratos (Morelló y cols., 2003).

Las bajas temperaturas previas (sin llegar a temperatura de congelación) desencadenan el aumento a la tolerancia al congelamiento, estabilizando las membranas cambiando la composición lipídica y acumulando azúcares, lo que se conoce como aclimatación (Thomashow, 1999).

Las olivas tienen baja tolerancia a la helada, los cultivares en general sucumben a -12°C (Mancuso, 2000).

II. HIPÓTESIS

La formación de cristales de hielo durante la helada provoca rupturas en las estructuras celulares de las olivas, desencadenando reacciones hidrolíticas y oxidativas. Por otro lado, la madurez produce cambios en la composición química de los frutos. Ambos factores afectan la calidad y el perfil de compuestos fenólicos y volátiles del AOVE, y contribuyen a la percepción de atributos sensoriales diferenciadores en el aceite de oliva.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Analizar la influencia de la helada y la maduración de los frutos sobre la calidad del aceite virgen extra.

3.2 Objetivos específicos

- Objetivo específico n°1: Determinar el efecto de la helada y grado de maduración de las olivas en los parámetros de calidad y color del AOVE.
- Objetivo específico n°2: Determinar el efecto de la helada y grado de maduración de las olivas en la composición de antioxidantes (fenoles y tocoferoles), la capacidad antioxidante, perfil de compuestos volátiles y perfil sensorial del AOVE.
- Objetivo específico n°3: Determinar el efecto de la maduración de las olivas sobre el contenido de glucosa presente en la pulpa.

IV. MATERIALES Y METODOLOGÍA

4.1 Lugar de trabajo

Los análisis se realizaron en el Laboratorio de Química de Alimentos del Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

4.2 Materiales

4.2.1 Muestras

Para realizar esta investigación, se llevaron a cabo análisis fisicoquímicos de calidad y de antioxidantes a AOVEs variedad Arbequina de la temporada 2019-2020, provenientes del Centro Experimental Huasco del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), ubicado en la región de Atacama (28°34'53" S; 70°47'51 O; 470 msnm), cuyo suelo es moderadamente alcalino (pH entre 7,5 y 8,2) y clima de Desierto Subtropical.

Del huerto, se seleccionaron tres árboles al azar de características similares (follaje y carga frutal), para obtener tres muestras en cada mes. Las olivas se cosecharon desde mayo hasta septiembre (Tabla 1) y en cada cosecha, la mitad de la fruta de cada árbol se congeló en un frigorífico por 12 horas a $-3\pm 1^{\circ}\text{C}$ para simular el fenómeno de helada. Se extrajo el aceite de las olivas frescas y descongeladas. Se apartaron olivas enteras para realizar el análisis de azúcares.

Para el proceso de extracción del aceite, las olivas se recolectaron a mano y se almacenaron en cajas cosecheras de 20 kg para ser transportadas inmediatamente a la planta piloto del centro experimental INIA, donde se utilizó un sistema de extracción MORI-Tem modelo Frantoíno Bio (sistema centrífugo de dos fases) a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ y se centrifugó a 3800 rpm. Las muestras de aceite se conservaron hasta su análisis a aproximadamente -23°C en frascos ámbar de 15 mL sin espacio-cabeza.

En la Tabla 1 se presentan datos sobre la fecha de cosecha, estado de maduración y condición de las olivas utilizadas en la producción de los aceites estudiados.

Tabla 1. Estado e índice de madurez de las olivas variedad Arbequinas de la cosecha 2020.

Fecha de cosecha	Índice de madurez	Estado de madurez
15 de mayo	2-3	Envero
18 de junio	3-4	Madura
8 de julio	3-4	Madura
12 de agosto	5-6	Madura
9 de septiembre	5-7	Madura
Condición de las olivas		
<ul style="list-style-type: none"> • Frescas (temperatura ambiente): 25°C • Congeladas: -3°C 		

4.2.2 Reactivos

- n-Hexano para cromatografía líquida, Merck KGaA
- Acetonitrilo para cromatografía líquida, Merck KGaA

- Ácido acético glacial (100%), Merck KGaA
- Metanol para cromatografía líquida, Merck KGaA
- Acetonitrilo para cromatografía líquida, Merck KGaA
- Isooctano para espectroscopia, Merck KGaA
- Etanol absoluto, Merck KGaA
- Yoduro de potasio para análisis, Merck KGaA
- Hidróxido de sodio en perlas para análisis, Merck KGaA
- Tiosulfato de sodio 0.1 N, Merck KGaA

4.2.3 Estándares

Capacidad antioxidante, ORAC

- Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman(*E*)-2-carboxylic acid) de SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim, Germany).
- AAPH (2,2'-azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride), de SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim, Germany).
- Fluoresceína de Merck KGaA (Darmstadt, Germany)

Cuantificación del contenido fenólico

- Ácido *o*-cumárico (2-Hydroxycinnamic acid, predominantly *trans*) SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim, Germany).
- PHPA (DL-*p*-Hydroxyphenyllactic acid) SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim, Germany).

Cuantificación de tocoferoles

- α -tocoferol (all-rac- α -Tocopherol) CalbioChem®, Germany.

Determinación de compuestos volátiles

- Estándar interno: 4-metil-2-pentanol, SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim, Germany).
- Estándares externos: etil-2-metilbutirato, (*E*)-2-heptenal, nonanal, octanal, 2-heptanol, etil propionato, pentanal, 1-hexanol, etanol, 4-metil-2-pentanona, acetato de butilo, hexanol, 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol, 3-octanona, ácido acético, ácido propiónico, 1-octanol, ácido butírico, ácido heptanoico, (*E*)-2-hexenal, (*E*)-2-hexenol, (*E*)-2-nonenal SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH (Steinheim, Germany).

4.2.4 Equipos

- Cámara de vacío, Supelco Visiprep TM. con bomba de vacío Vacuubrand modelo ME1C.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución HPLC marca Waters, con bomba binaria modelo 1525, detector de arreglo de fotodiodos 2998, autosampler 2707 y columna Waters Spherisorb® 5 μ m ODS2. Se utilizó el software EMPOWER 3.
- HPLC marca Merck Hitachi, bomba modelo L-6200, detector de Índice de Refracción (IR) L-4250 y horno L-7350.
- HPLC marca Merck Hitachi LaChrom con bomba L-7110 y detector de fluorescencia modelo 5440 con columna LiChroCart® 250-4.

- Cromatógrafo de gases Shimadzu GC-2010 Plus, detector FID-2010, inyector automático SPME HT280T, columna Teknokroma TRB-Wax (L:60 m, DI:0,25 mm, DE:0,25 μ m), software GC Solution V 2.4
- Espectrofotómetro UV/Vis UV3, Unicam.
- Fluorímetro BioTek FLx800
- Colorímetro PFX195, Lovibond.
- Balanza analítica, Sudelab.
- Baño ultrasónico FS30H, Fisher Scientific.
- Rotavapor Büchi R-124 con bomba de vacío Vacuumbrand modelo MZ 2C NT+AK+EK

4.2.5 Materiales de laboratorio

- Matraz Erlenmeyer de 250 mL
- Matraz de aforo de 50 y 100 mL
- Matraz de pera de 35 mL
- Vasos precipitados de 100 mL
- Placas ORAC, Nunc
- Parafilm
- Espátula
- Cartucho de extracción en fase sólida Sep-pack C18 (500mg y 6mL)
- Inserto 300 μ L 6x29 mm y vial de 12*32 mm con tapón y septum de PTFE/Silicone, Waters.

- Filtro de disco PVDF (0,22µm de tamaño de poro)
- Jeringa hipodérmica de 3 mL BD Plaqtipak
- Cubetas de cuarzo de 10 mm Mundolab S.A.
- Micropipeta de 100, 200 y 1000 µL
- Micro bureta
- Pipetas Pasteur
- Probetas de 100 y 500 ml
- Tubos de ensayo
- Vasos precipitados de 25, 50, 100 y 250 mL
- Viales para SPME de vidrio de 20mL, Restek

4.3 Metodología

Objetivo específico n°1: Determinar el efecto de la helada y grado de maduración de las olivas en los parámetros de calidad y color del AOVE.

4.3.1 Acidez libre

Se determinaron los ácidos grasos libres presentes en la muestra de aceite de acuerdo con el método oficial de AOCS Ca 5a-40. El resultado se expresó en porcentaje de ácido oleico, calculado con la siguiente fórmula:

$$\text{Ácidos grasos libres (\%)} = \frac{V \text{ NaOH (mL)} * N \text{ NaOH} * 28,2}{Pm}$$

Donde:

N: concentración Normal de la solución de hidróxido de sodio.

V: volumen de hidróxido de sodio gastado (mL)

Pm: peso de la muestra (g).

4.3.2 Índice de peróxidos

Se determinó según el método oficial de AOCS Cd 8-53, los resultados se expresaron en términos de mEq de oxígeno peróxido por 1000 g de muestra. Se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de peróxidos} = \frac{(S - B) * N * 1000}{Pm} \left[\frac{\text{mEq } O_2 \text{ peróxido}}{\text{kg de materia grasa}} \right]$$

Donde:

S: volumen de tiosulfato de sodio gastado en la titulación de la muestra (mL).

B: volumen de tiosulfato de sodio gastado en la titulación del blanco (mL).

N: concentración Normal del tiosulfato de sodio.

Pm: peso de la muestra (g).

4.3.3 Espectrofotometría de absorción UV-visible K232 y K270

Se realizó de acuerdo con el método AOCS Ch 5-91. La muestra de aceite se disolvió en isooctano y se determinó el valor de extinción de la solución a las longitudes de onda 232nm y 270nm respecto al disolvente puro. A partir de los

resultados de absorbancia, se calcularon los valores de extinción específicos. Se utilizó la siguiente fórmula para calcular el coeficiente de extinción de la muestra de aceite de oliva en una cubeta de cuarzo de paso óptico 1 cm:

$$K\lambda = \frac{A\lambda}{C \times 1}$$

Donde:

$K\lambda$: Coeficiente de extinción a la longitud de onda λ

$A\lambda$: absorbancia a la longitud de onda λ

C: concentración de la muestra (g/100mL).

4.3.4 Color

Se realizó de acuerdo con el método CIE 1976 L^* , a^* , b^* (ISO 11664-4:2011; Norma UNE 72031/83). Este método consiste en que todos los colores de un objeto quedan representados espacialmente dentro de tres planos cartesianos, siendo el eje central el iluminante y las otras dos coordenadas cromáticas, como se representa en la Figura 5. De esta manera, cada color tiene tres coordenadas dentro del espacio CIE $L^*a^*b^*$, y para conocer la distancia entre dos puntos, se calcula ΔE usando el Teorema de Pitágoras.

Para medir el color del aceite, se puso 10 mL de muestra en una cubeta de vidrio de 1,5 cm de paso óptico y se introdujo en el colorímetro Lovibond Serie PFX195 con iluminante D65 y configuración del observador 10° .

Para el cálculo de ΔE se utilizó la siguiente ecuación:

$$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{1/2}$$

Donde las coordenadas medidas corresponden a:

L*: luminosidad, de blanco a negro (0, 100)

a*: de rojo a verde

b*: de amarillo a azul

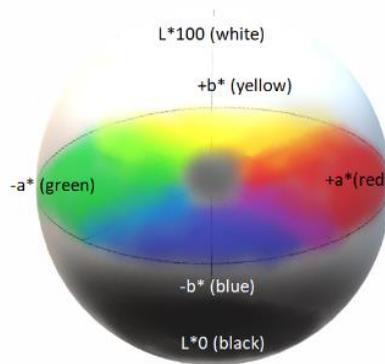


Figura 5. Representación gráfica espacial tridimensional del sistema de coordenadas CIE L*a*b*.

Objetivo específico n°2: Determinar el efecto de la helada y grado de maduración de las olivas en la composición de antioxidantes (fenoles y tocoferoles), la capacidad antioxidante, perfil de compuestos volátiles y evaluación sensorial del AOVE.

4.3.5 Contenido de compuestos fenólicos

Se realizó mediante el método propuesto por Mateos y cols., (2001). En un matraz de pera se pesó 2,5 g de aceite de oliva y se agregó 0,5 mL de estándar interno y se evaporó el solvente a 40°C en rotavapor. La muestra se

disolvió en n-hexano y se eluyó con metanol en una columna de fase sólida Sep-Pak® Diol Vac 3cc en una cámara de vacío. Para recuperar los fenoles del matraz, se evaporó el metanol en rotavapor y se agregó 500 µL de una solución metanol-agua (1:1), la cual se filtró e inyectó en el HPLC marca Waters. Las fases móviles utilizadas fueron Metanol: Acetonitrilo (1:1) y agua Mili-Q: Ácido fosfórico (99,5%: 0,5%).

El cálculo de la concentración de los compuestos fenólicos se realizó con la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración del Fenol} = \frac{1000 * P_{EI} * A_{Fenol} * Fr}{A_{EI} * P_{muestra}} \left[\frac{mg}{kg} \right]$$

P_{EI} : peso del estándar interno (mg)

A_{Fenol} : área del fenol en el cromatograma (mV*s)

Fr : factor de respuesta del fenol en relación con el estándar interno.

A_{EI} : área del estándar interno en el cromatograma (mV*s)

$P_{muestra}$: peso de la muestra (g)

4.3.6 Capacidad de absorbanza de radicales de oxígeno (H-ORAC_{FL})

El ensayo se realizó de acuerdo con el método propuesto por Prior y cols. (2003), en un Fluorímetro BioTek FLx800 con el software GEN 5 versión 2.09. La lectura se hizo desde la parte superior de la placa con un filtro de excitación

de 485 nm con 20 nm ancho de banda, y un filtro de emisión de 528 nm con 20 nm de ancho de banda.

Preparación de los reactivos:

- Se preparó una solución de *buffer* fosfato 0,075 M con agua miliQ a pH 7,4.
- Se preparó 50 mL una solución stock de fluoresceína (FL) de concentración 0,5 mg/mL disolviendo en *buffer* fosfato 0,075 M a pH 7,4. Se hizo una primera dilución con una alícuota de 50 µL de la solución stock y se aforó a 10 mL (2,5 µg/mL) y la segunda dilución se hizo con una alícuota de 2 mL y se aforó a 100 mL (0,5 µg/mL). Ambas se aforaron con *buffer*.
- Se preparó una solución stock de estándar Trolox disolviendo 25 mg en 50 mL con el *buffer* fosfato (0,5 mg/mL) y se hizo una curva de calibración de concentraciones 100 µM, 50 µM, 25 µM y 12,5 µM.
- Se preparó una solución de AAPH a concentración de 46 mg/mL en *buffer* fosfato.

Extracción y lectura de compuestos fenólicos:

- En un tubo centrífuga se pesaron 2,5g de aceite y se agregó 5 mL de una solución Metanol: Agua (80:20) para la extracción. Posteriormente se agitó en un vortex por 15 minutos, se llevó al baño ultrasónico por 15 minutos y se centrifugó por 25 minutos a 5000 rpm. Se tomó una alícuota

de la fase superior de 125 μL y se aforó con buffer fosfato 0,075 M a pH 7,4 en un matraz de 10 mL.

- Preparación de la placa ORAC: primero se llenaron los pocillos del borde de la placa con 300 μL de agua MiliQ. Luego se llenaron los pocillos correspondientes a cada punto de la curva de Trolox con un volumen de 25 μL de Trolox y 150 μL de fluoresceína. Se procedió a llenar los pocillos para la muestra con 25 μL del extracto metanol/agua disuelto en *buffer* fosfato y 150 μL de fluoresceína y los pocillos para el blanco con 25 μL de *buffer* con 150 μL de fluoresceína.
- La placa se incubó por 30 minutos a 37°C y la reacción se inició con la adición desde el inyector del fluorímetro de 25 μL de AAPH (150 mM) en cada pocillo. Las lecturas se obtuvieron en el Lector de Fluorescencia FLx800 –TBID.

La capacidad antioxidante (ORAC) en la muestra (expresada en μmol de equivalente Trolox (ET) /g de aceite) se midió interpolando el valor del área neta bajo la curva en la regresión lineal de la curva de Trolox, generada con la variación cinética del “apagamiento” de la FL que registró el equipo a cada minuto.

4.3.7 Determinación de tocoferoles

Se realizó de acuerdo con el método oficial AOCS Ce 8-89. Se pesó 0,1 g de aceite de oliva variedad Arbequina en un matraz ámbar de 10 mL y se aforó con n-hexano. La fase móvil se preparó con 2-propanol (0,5%) y n-hexano

(99,5%). Se utilizó un cromatógrafo HPLC marca MERK HITACHI modelo L-7110 y un detector de fluorescencia HITACHI modelo FL 5440 HITACHI en un rango de lectura de 290 nm para excitación y 330 nm para emisión. Para la adquisición de datos e integración se usó el software DataApex CLARITY™ versión 2.4.1.43. Se cuantificó inyectando el estándar de alfa tocoferol concentración 3 mg/mL y luego la muestra por duplicado. La concentración de los tocoferoles se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración del Tocoferol} = \frac{C * a * V}{A * m} \left[\frac{\text{mg}}{\text{kg de aceite}} \right]$$

Donde:

C: concentración de estándar de α -Tocoferol ($\mu\text{g/mL}$)

A: área del estándar (mV*s)

a: área de la muestra (mV*s)

V: volumen del matraz de aforo (mL)

m: masa de la muestra (g)

4.3.8 Determinación de compuestos volátiles

Se realizó mediante Micro Extracción en Fase Sólida (SPME), con una fibra triple SUPELCO® de 2 cm, 50/30 cm de espesor de película, dotada con el Flex fase estacionaria estable de divinilbenceno/ carboxen/ polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS). El análisis se hizo con un Cromatógrafo de gases

SHIMADZU GC-2010 PLUS, detector de llama FID-2010, inyector automático SPME HT280T, columna Teknokroma TRB-Wax y software GC-Solution Analysis versión 2.31.00 (2000-2008) Shimadzu.

Se trabajó bajo las siguientes condiciones: inyector a 260°C, detector a 270°C y horno: Temperatura inicial de 40°C por 10 minutos, rampa de 3°C/min hasta temperatura final de 200°C. El gas portador utilizado fue H₂.

El inyector automático se programó mediante el software HT-COMSOFT-S, donde el tiempo de incubación es de 5 minutos, agitación y limpieza 2 minutos, extracción 10 minutos y desorción 5 minutos.

Procedimiento para la determinación y cuantificación de los compuestos volátiles:

- Preparación de la solución estándar interno (E.I) de 4-metil-2-pentanol: en un matraz de 100 mL se pesó 100 mg del compuesto (conc. 1 mg/mL) y se aforó con aceite de maravilla (matriz blanco de aceite desodorizado, sin la presencia de compuestos volátiles). Se tomaron 500 µL de la solución anterior y se aforó con aceite de maravilla a 10 mL (conc. 50 µg/mL).
- Preparación de muestra: se pesaron 2 gr de aceite de oliva variedad Arbequina en un vial de vidrio de 20 mL con tapa de material politetrafluoroetileno (PTFE), y 100 mg de la solución de estándar interno (50 µg/mL). La mezcla se agitó en un vórtex por 30 segundos y se dejó

durante 5 min a 40°C para permitir el equilibrio de los compuestos volátiles en el espacio cabeza (Aparicio y Harwood, 2003).

- Cuantificación: para calcular las concentraciones de los compuestos volátiles presentes en la muestra, se construyeron curvas de calibración absoluta para cada uno de ellos con los estándares SIGMA-ALDRICH, a partir de soluciones patrón de 10000 ppm. Para la construcción de las curvas de calibración se inyectaron los estándares a diferentes concentraciones por triplicado. Se graficó el área relativa del compuesto (área del compuesto/área del E.I) en función del peso (mg) del estándar.

4.3.9 Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron en triplicado y las mediciones de los diferentes parámetros por duplicado. Se calculó promedio, desviación estándar y coeficiente de variación. Se compararon los resultados procedentes de aceites procedentes de olivas frescas y congeladas, y entre los diferentes estados de maduración por Análisis de ANOVA con comparación de rangos múltiples de Fisher LSD con un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el software STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.1.03. Se realizó un análisis multivariado: Análisis de Componentes Principales (PCA) y Regresión Discriminante de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS-DA). El análisis multivariado se basó en un algoritmo NIPALS (mínimos cuadrados parciales iterativos no lineales).

4.3.10 Evaluación sensorial

Las muestras de aceite de olivas frescas y congeladas de los meses de mayo, julio y septiembre fueron analizadas por un panel experto entrenado perteneciente a la Universidad Tecnológica Metropolitana (UTEM), según la Norma COI/T.20/DOC. N°15/REV.10. Los resultados informados corresponden a la media de las respuestas de intensidad de atributos y/o defectos encontrados por los catadores. Para evaluar la intensidad de los atributos o defectos sensoriales el panel se basó en la metodología de la Norma Internacional ISO 5495:2005 22 *Sensory analysis - Methodology - Paired comparison test*, considerando la corrección ISO 5495:2005/Cor.1:2006.

Objetivo específico n°3: Determinar el efecto de la maduración de las olivas sobre el contenido de glucosa presente en la pulpa.

4.3.11 Determinación del contenido de glucosa en pasta de olivas

La determinación de glucosa presente en la pulpa de oliva se realizó mediante el método Bligh & Dyer. Se pesó 2 g de pulpa de oliva (sin carozo) y se ajustó la humedad de la muestra agregando agua hasta completar 4 g de agua en total. Se agregó cloroformo y metanol, se agitó y centrifugó para aislar la fase acuosa de las proteínas y lípidos.

Para la clarificación de la muestra, la fase acuosa (que contiene los azúcares) se pasó por una columna de extracción en fase sólida (SPE) hecha con carbón activado. El eluato se diluyó con agua miliQ en proporción 1:6 y se

inyectó en un HPLC MERCK HITACHI con bomba L-6200, detector de Índice de Refracción, horno LaChrome L-7530, columna SHODEX SUGAR SC 1011 y software CLARITY Data Apex Preliminary Versión 2.4.1.43. La fase móvil utilizada fue agua MiliQ con flujo de 0.9 mL/min a 70°C.

V. RESULTADOS Y DISCUSIONES

5.1 Análisis fisicoquímicos de calidad y color

Para cumplir con el primer objetivo específico, se determinaron parámetros de calidad en los aceites extraídos de olivas frescas y congeladas de variedad Arbequina. A continuación, en la Tabla 2 se muestra un resumen de los análisis de calidad realizados a aceite de olivas frescas del mes de mayo.

Tabla 2. Características fisicoquímicas del aceite de oliva variedad Arbequina procedente de olivas frescas en el primer mes de cosecha.

Parámetro medido	Olivas frescas de mayo
Acidez libre (% ácido oleico)	0,15 ± 0,01
Índice de Peróxidos (meq O ₂ /kg de aceite)	1,49 ± 0,06
K 232	1,96 ± 0,09
K 270	0,100 ± 0,01
Color	
L*	89,11 ± 0,28
a*	-13,43 ± 0,27
b*	64,40 ± 3,66

En la Tabla 2 se observan los análisis de calidad realizados al aceite extraído de las olivas frescas en la cosecha del mes de mayo. Los resultados muestran que según la Norma comercial COI 15NC N°3 del 2022 (Anexo 1) corresponde a la categoría AOVE ya que todos los parámetros están por debajo de los límites establecidos.

Los valores de las coordenadas $L^*a^*b^*$ indican que el aceite presenta un color característico verde-dorado (Gandul-Rojas y cols., 2013), con una alta luminosidad (valor de “L” máximo 100), valor negativo de “a” indicando tono verdoso y valor positivo de “b” que indica amarillez.

5.1.1 Acidez libre

La hidrólisis en el aceite resulta en la formación de ácidos grasos libres (AGL) y residuos de glicerol. Los AGL son una de las principales causas del deterioro del aceite ya que afectan parámetros sensoriales y disminuyen su vida media. Por esta razón la acidez libre es muy importante para evaluar la calidad del aceite de oliva y clasificarlo en categorías según la Norma COI (El-Abassy y cols., 2009).

La Figura 6 muestra los resultados de la variación de acidez libre en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas, durante los cinco meses de cosecha. Se observó un leve aumento de la acidez libre en los aceites provenientes de olivas frescas y congeladas a partir de julio, debido a que durante la maduración se incrementa la actividad de las enzimas lipolíticas. (Navajas-Porras y cols., 2020).

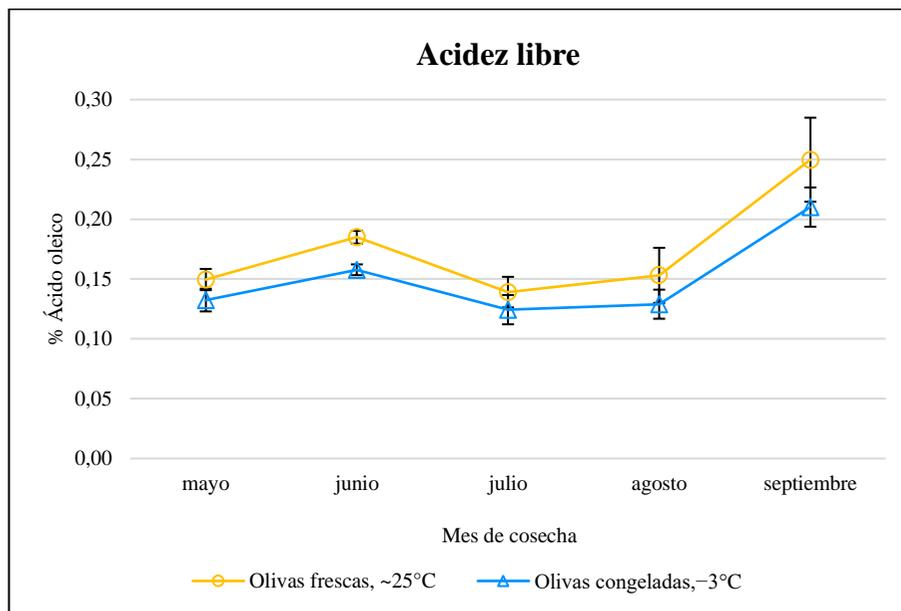


Figura 6. Variación de la acidez libre (expresado como porcentaje de ácido oleico) de los AOVes procedentes de olivas frescas y congeladas en función de los meses de cosecha.

Los aceites procedentes de olivas frescas tuvieron un rango de acidez libre inicial y final de 0,15% y 0,25% respectivamente, mientras que en los aceites de olivas congeladas se obtuvieron valores entre 0,13% y 0,21%. La variación de acidez libre entre ambas condiciones siguió la misma tendencia, pero se obtuvieron valores más bajos en aceites de olivas congeladas. Esto se atribuiría a la reducción en la actividad de las enzimas lipasas producto de la congelación del fruto, afectando la formación de ácidos grasos libres durante la trituración y malaxación en el proceso extracción del aceite (Poerio y cols., 2008).

En todas las muestras evaluadas se obtuvieron valores inferiores a 0,8% de ácido oleico, por lo tanto, según la Norma comercial COI (Anexo 1) los aceites

de olivas frescas y congeladas cumplen con los criterios para clasificarlos como AOVE según el parámetro de acidez libre.

5.1.2 Índice de peróxidos

Los hidroperóxidos son compuestos formados de la oxidación de lípidos insaturados y son susceptibles a descomponerse en productos secundarios de oxidación, afectando negativamente el valor nutricional, sensorial y calidad general del aceite. Existen muchos factores catalizadores que pueden oxidar el aceite, tales como: luz, temperatura, enzimas, metales, entre otros. La medición de índice de peróxidos (IP) se usa como indicador del estado inicial de oxidación midiendo el contenido de hidroperóxidos (Morales y Przybylski, 2013).

En la Figura 7 se presenta la comparación del IP en aceites extraídos de olivas frescas y congeladas cosechadas desde el mes de mayo hasta el mes de septiembre. En aceites de olivas frescas se observó un aumento sostenido de IP con la maduración, presentando en el mes de mayo un valor de 1,49 meq de O₂/kg de aceite y en el mes de septiembre de 3,45 meq de O₂/kg de aceite. En aceites procedentes de olivas congeladas el IP presentó un leve aumento hasta el mes de julio, con un valor máximo de 2,84 meq de O₂/kg de aceite.

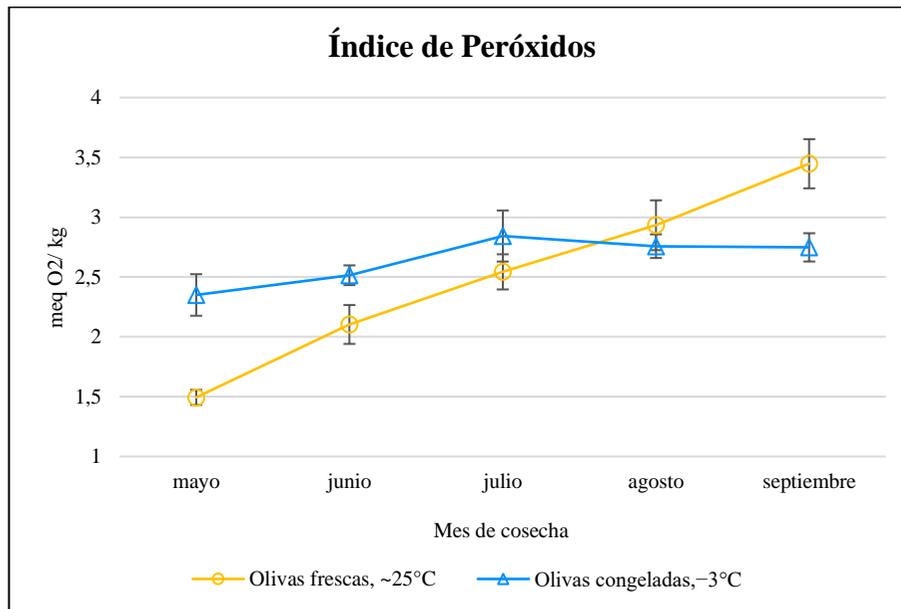


Figura 7. Variación del Índice de Peróxido con los meses de cosecha en AOVE procedente de olivas frescas y congeladas.

El ácido linolénico aumenta su concentración a medida que la oliva madura y la enzima lipoxigenasa (LOX) actúa sobre él formando hidroperóxidos (Mele y cols., 2018), por esta razón, se observó un aumento del IP durante todos los meses de cosecha en los aceites de olivas frescas. Por otro lado, en olivas congeladas, la formación de cristales de hielo dentro de las células destruye tejidos desencadenando procesos oxidativos (Guillaume y cols., 2010). Sumado a esto, los pigmentos clorofílicos también se ven afectados por la reducción en la actividad de LOX, ya que esta enzima (junto a lipasas y peroxidases) al ser inactivada previene la conversión de la clorofila a sustancias incoloras llamadas feofitinas (Minguez-Mosquera y cols., 1990); por lo tanto, en los aceites provenientes de olivas congeladas los pigmentos clorofílicos se acumulan y

actúan como prooxidantes en presencia de luz y oxígeno. Esto explicaría los mayores valores de IP para aceites procedentes de olivas congeladas en los meses de mayo y junio. Posteriormente el valor de IP se mantiene prácticamente sin variación significativa por la disminución de los pigmentos clorofílicos y la ralentización de la actividad de LOX por la baja temperatura (Mele y cols., 2018).

Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) en el valor de IP entre aceites procedentes de olivas frescas y congeladas para los meses de mayo, junio y septiembre.

Los aceites presentaron valores de IP muy por debajo del límite máximo de 20 meq de O_2 /kg de aceite establecido por la Norma comercial COI para AOVE (Anexo 1), lo cual fue el resultado del poco tiempo transcurrido entre el descongelamiento de la fruta y extracción del aceite (Romero y Motilva, 2010), el rápido almacenamiento a aproximadamente $-23^\circ C$ de las muestras hasta el momento del análisis y la casi nula disponibilidad de oxígeno en la muestra envasada, lo que permitió que el aceite se haya mantenido en un estado de oxidación inicial (Masella y cols., 2019).

5.1.3 Espectrofotometría de absorción UV-visible K232 y K270

Los lípidos de los alimentos pueden sufrir cambios químicos en su composición afectando la calidad nutricional y sensorial. Los principales procesos del deterioro son la lipólisis y la oxidación, de los cuales se deriva una amplia variedad de compuestos químicos. Los lípidos oxidados forman principalmente hidroperóxidos, dienos y trienos conjugados (compuestos

primarios), que posteriormente se transforman en productos secundarios de oxidación como aldehídos, cetonas, ácidos y alcoholes (Morales y Przybylski, 2013).

En la Figura 8 se presenta el cambio en el parámetro K232 durante la maduración de los frutos en los aceites extraídos de olivas frescas y congeladas. K232 es el coeficiente de extinción específica de la muestra a la longitud de onda de 232 nm e identifica los compuestos primarios de oxidación.

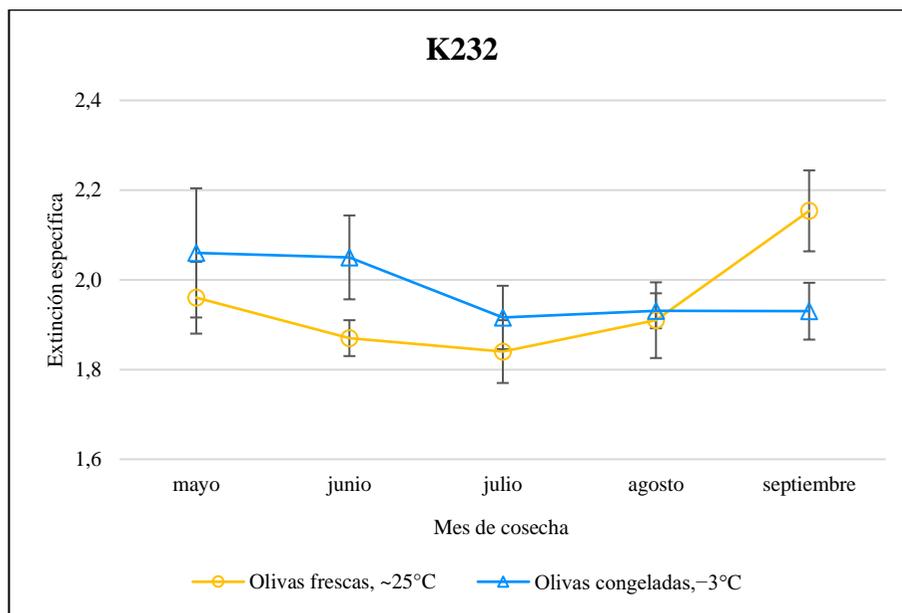


Figura 8. Variación del parámetro K232 del AOVE procedente de olivas frescas y congeladas con los meses de cosecha.

En la Figura 8 se observó que el parámetro K232 en el aceite producido a partir de olivas frescas incrementó un 9,6% entre los meses de mayo y septiembre, mientras que para el aceite de olivas congeladas K232 disminuyó un 6,3%. Sin embargo, estas variaciones fueron leves debido a que los valores

obtenidos en IP mostraron la baja formación de hidroperóxidos en las muestras, por lo que los productos primarios y secundarios de oxidación también fueron bajos.

Durante los meses de mayo hasta julio, los valores de K232 en aceites extraídos de olivas congeladas fueron mayores, lo cual coincide con IP (Figura 7). A pesar de que se observan diferencias entre los aceites procedentes de olivas frescas y congeladas, la variación es leve, lo cual indica que los aceites estaban en una etapa inicial de oxidación, como se mencionó anteriormente.

Los valores obtenidos de K232 están bajo el límite permitido ($\leq 2,50$) por la Norma comercial COI (2022), por lo tanto, las muestras de aceite analizadas

En la Figura 9 se presenta el parámetro K270 en aceites provenientes de olivas frescas y congeladas durante la maduración. Este parámetro corresponde al coeficiente de extinción específica a la longitud de onda de 270 nm e identifica los compuestos secundarios de oxidación.

En la Figura 9 se observó que con la maduración se produjo un descenso del parámetro K270 en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas en un 23% y 27%, respectivamente. La disminución de K270 es contraria a lo observado en el IP. Esto quiere decir que la tasa de formación de hidroperóxidos fue mayor a la tasa de descomposición (Vichi y cols., 2003).

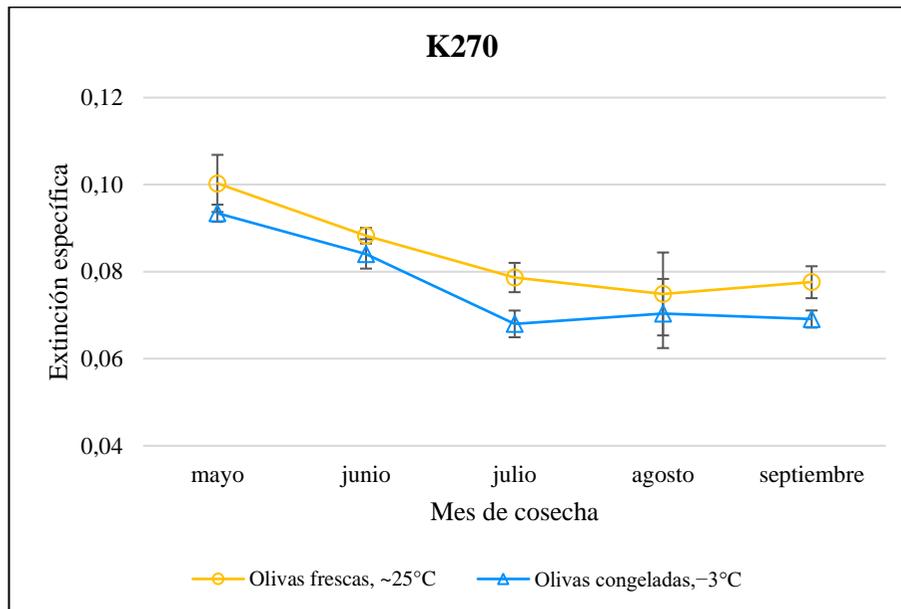


Figura 9. Variación del parámetro K270 en AOVE procedente de olivas frescas y congeladas con los meses de cosecha.

En la Figura 9 se observa que los valores de K270 fueron menores en olivas congeladas durante todos los meses estudiados. Esto se debe a que la baja temperatura sobre las olivas influye en el contenido de compuestos carbonilos (como aldehídos y cetonas), disminuyendo su concentración (García y cols., 1996).

Los valores obtenidos de K270 para el aceite de olivas frescas y congeladas están bajo el límite permitido ($\leq 0,22$) por la Norma comercial COI (2022), por lo tanto, fueron clasificados como AOVE.

5.1.4 Color

El color es un atributo sensorial que resulta de la interacción entre el material (alimento) y el observador (consumidor). Su importancia radica en que es el primer factor de calidad evaluado por el consumidor para decidir si compra el producto. El ojo humano percibe el color compuesto por tres atributos sensoriales: matiz, saturación o croma y luminosidad. El matiz se refiere al tipo de color (amarillo, verde, azul o rojo), es decir al rango de la longitud de onda predominante. La saturación depende de la proporción de luz emitida por la longitud de onda predominante y por último, la luminosidad es la visibilidad del color y depende de la cantidad de luz que reciba el ojo (Durán y Calvo, 2009).

En la Figura 10 se muestra el efecto que tiene la helada y la maduración sobre el color en el AOVE. En el estado de maduración más temprano, se observaron valores de L^* (luminosidad) de 89,1 y 87,7 unidades; valores de a^* (verdor) de -13,4 y -13,6 y valores de b^* (amarillez) de 64,4 y 74,3 en AOVES procedentes de olivas frescas y congeladas, respectivamente. Estos valores son característicos de los aceites procedentes de olivas variedad Arbequina, corresponden a un color “verde amarillento” (Gandul-Rojas y cols., 2013).

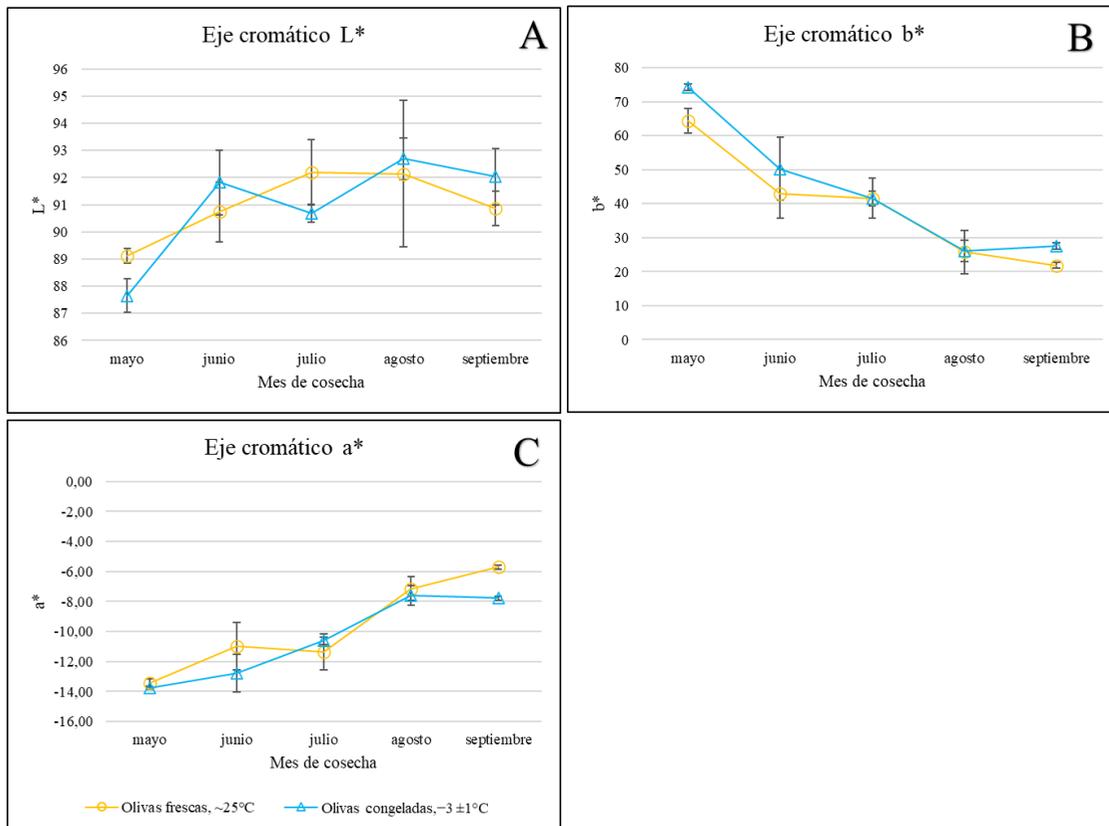


Figura 10. Variación de las coordenadas del espacio CIEL*a*b* en los AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas durante la maduración.

La Figura 10 muestra un incremento leve en la coordenada L* en los AOVEs de olivas frescas y congeladas, a medida que avanza el estado de maduración. Solo se observaron diferencias significativas en el mes de mayo.

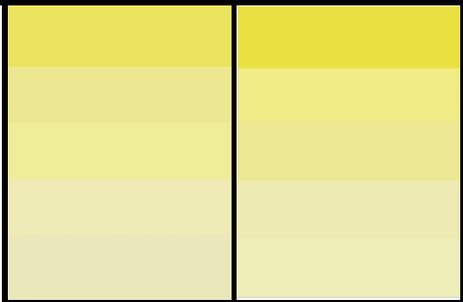
Con el avance del estado de maduración, también se observó un aumento en los valores de la coordenada cromática a* (con valores entre -13,4 y -5,7 unidades en AOVEs de olivas frescas y -13,8 y -7,8 en AOVEs de olivas congeladas), mientras que la coordenada cromática b* presentó una disminución

en los dos tipos de aceites estudiados. Dichos valores variaron entre 64,4 y 21,9 en los aceites extraídos de olivas frescas, y entre 74,3 y 27,5 en aceites procedentes de olivas congeladas. En las coordenadas a* y b* no se encontraron diferencias significativas ($p>0,05$) entre AOVES de olivas frescas y congeladas, pero si hay diferencias ($p<0,05$) entre los estados de maduración.

Las variaciones de las tres coordenadas muestran que a medida que las olivas maduran producen un aceite más pálido, con una pérdida de tonalidad verdosa y amarillenta.

ΔE es una medida de distancia entre dos puntos en el espacio dados por las coordenadas del sistema CIE L*a*b*. Para el cálculo se tomó como punto inicial las muestras del mes de mayo en aceites de olivas frescas y congeladas, según corresponde. A continuación, en la Tabla 3 se representa gráficamente las variaciones de las tres coordenadas cromáticas durante la etapa de maduración de las olivas y los valores de ΔE .

Tabla 3. Efecto de la helada y maduración sobre ΔE en AOVE variedad Arbequina.

Mes de cosecha	ΔE		Representación	
	Olivas frescas (~25°C)	Olivas congeladas (-3°C)	Olivas frescas (~25°C)	Olivas congeladas (-3°C)
mayo	0,00±0,00	0,00±0,00		
junio	21,76±3,23	24,43±8,78		
julio	19,66±5,45	21,97±7,05		
agosto	39,31±9,02	48,89±3,60		
septiembre	43,26±4,00	47,38±1,30		

En la Tabla 3 se observa que el cambio de color que presentaron los AOVE durante la maduración es perceptible a la vista. Los aceites procedentes de olivas congeladas sufren una mayor pérdida de color durante la maduración, pues su ΔE del mes de septiembre es mayor.

El color del aceite de oliva está relacionado con la concentración de pigmentos como la clorofila y los carotenoides (Morelló y cols., 2003). Durante el proceso de maduración de las olivas, el contenido de estos pigmentos fue cambiando y el color amarillo comenzó a ser más predominante que el color verde, porque la fracción clorofílica decrece con mayor rapidez (Minguez-Mosquera y cols., 1990). La desaparición de clorofilas y carotenoides en la fruta da paso a la síntesis de compuestos antocianos, los cuales aparecen primero como pequeñas manchas rojizas sobre la piel de la fruta, hasta llegar a negro en la etapa de maduración completa. Solo las clorofilas y los carotenoides, los cuales son solubles en grasa, son transferidos al aceite de olive virgen durante la extracción (Gandul-Rojas y cols., 2013), dando el color característico que variará dependiendo el mes de cosecha.

Durante el proceso de extracción del aceite, en la etapa de molienda es cuando se pierden la mayor cantidad de pigmentos ya que la ruptura de los tejidos favorece el contacto entre la clorofilasa con su sustrato (Minguez-Mosquera y cols., 1990). Esto mismo ocurre con la congelación, pues los cristales de hielo rompen estructuras celulares, sin embargo, la clorofilasa tiene un rango de temperatura óptimo de actividad enzimática entre los 20°C a 30°C

(Gandul y Mínguez-Mosquera, 1996), por lo que su actividad enzimática se encuentra ralentizada. Esto explicaría la acumulación de pigmentos clorofílicos en el aceite proveniente de olivas congeladas.

5.2 Compuestos fenólicos y capacidad antioxidante

Para cumplir con el segundo objetivo, primero se analizó la composición de compuestos fenólicos hidrofílicos, α -tocoferol y capacidad antioxidante. A continuación, se presentan los resultados obtenidos.

5.2.1 Perfil de compuestos fenólicos

Los polifenoles están relacionados con el gusto del aceite, y junto a los compuestos volátiles influyen en la calidad sensorial del AOVE. Durante la molienda y la malaxación se produce la ruptura de los tejidos celulares poniendo en contacto enzimas y sustratos, lo que origina por acción de la β -glucosidasa sobre oleuropeína y ligustrósido la formación de las agliconas de los derivados secoiridoides (García-Vico y cols., 2017).

Los compuestos fenólicos se identificaron con un detector de arreglo de fotodiodos, en Anexo 3 se especifica la longitud de onda a la que se midieron los compuestos y su tiempo de retención. En la Tabla 4 se presenta la clasificación de los compuestos fenólicos.

Tabla 4. Clasificación de compuestos fenólicos presentes en aceite de oliva virgen extra (AOVE) y su abreviatura.

Ácidos fenólicos y derivados	
<ul style="list-style-type: none"> • Ácido vainílico • Ácido <i>p</i>-Cumárico • Ácido gálico • Ácido cafeico • Ácido protocatequico • Ácido <i>p</i>-Hidroxibenzoico • Ácido ferúlico • Ácido cinámico • Ácido benzoico 	
Alcoholes Fenólicos	
<ul style="list-style-type: none"> • Hidroxitirosol (Etanol (3,4-Dihidroxifenilo), (3,4 DHPEA)) • Tirosol (Etanol (<i>p</i>-Hidroxifenilo)), (<i>p</i>-HPEA)) • Hidroxitirosol acetato • Tirosol acetato • (3,4-Dihidroxifenil) etanol-glucósido • Vainillina 	
Flavonoides	
<ul style="list-style-type: none"> • Luteolina • Apigenina • Metil-luteolina 	
Secoiridoides	
<ul style="list-style-type: none"> • Oleuropeína • Ligustrósido • Decarboximetil aglicona de la oleuropeína, forma dialdehídica (3,4-DHPEA-EDA) • Decarboximetil aglicona del ligustrósido, forma dialdehídica (<i>p</i>-HPEA-EDA) • Aglicona Oleuropeína dialdehídica (3,4-DHPEA-EDA-AOD) • Aglicona del ligustrósido dialdehídico (<i>p</i>-HPEA-EDA-ALD) • Aglicona Oleuropeína, monoaldehído (3,4-DHPEA-EA) • Aglicona Ligustrósido, monoaldehído (<i>p</i>-HPEA-EA) • Aglicona de la Oleuropeína aldehídica e hidroxílica (3,4-DHPEA-EA-AH) • Aglicona de Ligustrósido aldehídico e hidroxílica 	
Lignanós	
<ul style="list-style-type: none"> • Pinosinol • 1-Acetoxipinosinol 	

Fuente: (Consejo Oleíco Internacional (COI), 2009; National Center for Biotechnology Information, 2022; Tsimidou, 2013)

En la Tabla 5 se presentan los valores de los compuestos fenólicos presentes en el AOVE procedente de olivas frescas y congeladas. Se realizó la comparación entre ambos tipos de fruta y entre los diferentes estados de maduración.

Tabla 5. Efectos de la maduración y el congelamiento en el perfil de compuestos fenólicos, α -tocoferol y capacidad antioxidante del AOVE variedad Arbequina.

Compuestos fenólicos (mg kg ⁻¹)	Meses de cosecha										valor-P		Temperatura
	mayo		junio		julio		agosto		septiembre		Meses		
	O. frescas	O. cong.	O. frescas	O. cong.									
Ácido elenólico	231 ± 6 ^{Aa}	226 ± 14 ^{Aa}	93 ± 9 ^{Ab}	116 ± 6 ^{Bb}	74 ± 3 ^{Ac}	113 ± 6 ^{Bb}	66 ± 3 ^{Ad}	73 ± 3 ^{Bc}	64 ± 8 ^{Ad}	68 ± 5 ^{Ac}	0,0000	0,0000	0,0000
Hidroxitirosol	3,8 ± 0,6 ^{Aa}	1,2 ± 0,2 ^{Bb}	0,89 ± 0,08 ^{Ab}	1,6 ± 0,2 ^{Bb}	0,23 ± 0,01 ^{Ac}	0,28 ± 0,04 ^{Bc}	0,20 ± 0,02 ^{Ac}	0,43 ± 0,04 ^{Bd}	0,21 ± 0,04 ^{Ac}	0,08 ± 0,02 ^{Be}	0,0000	0,0000	0,0000
Tirosol	2,3 ± 0,2 ^{Aa}	1,3 ± 0,1 ^{Ba}	0,99 ± 0,15 ^{Ab}	0,8 ± 0,1 ^{Bb}	0,31 ± 0,03 ^{Ac}	0,33 ± 0,06 ^{Ac}	0,22 ± 0,04 ^{Ac}	0,34 ± 0,05 ^{Bc}	0,42 ± 0,05 ^{Ad}	0,27 ± 0,02 ^{Bd}	0,0000	0,0000	0,0000
Ácido vainfílico	0,07 ± 0,01 ^{Aa}	0,09 ± 0,0 ^{Ba}	0,06 ± 0,01 ^{Ab}	0,06 ± 0,01 ^{Ab}	0,09 ± 0,01 ^{Ac}	0,07 ± 0,01 ^{Bc}	0,09 ± 0,01 ^{Ac}	0,07 ± 0,01 ^{Bc}	0,12 ± 0,03 ^{Ad}	0,05 ± 0,01 ^{Bd}	0,0000	0,0000	0,0000
Ácido para-cumárico	ND	0,0000	0,0000	0,0000									
3,4-DHPEA-EDA	68 ± 5 ^{Aa}	85 ± 8 ^{Ba}	65 ± 9 ^{Aa}	89 ± 4 ^{Ba}	31 ± 2 ^{Ab}	49 ± 5 ^{Bb}	9 ± 1 ^{Ac}	50 ± 3 ^{Bb}	23 ± 2 ^{Ad}	0,46 ± 0,01 ^{Bc}	0,0000	0,0000	0,0000
3,4-DHPEA-EDA, oxidada	3,0 ± 0,2 ^{Aa}	3,0 ± 0,2 ^{Aa}	1,0 ± 0,1 ^{Ab}	2,7 ± 0,2 ^{Bb}	1,1 ± 0,1 ^{Ac}	0,1 ± 0,0 ^{Bc}	0,1 ± 0,0 ^{Ad}	0,4 ± 0,0 ^{Bd}	0,1 ± 0,0 ^d	ND	0,0000	0,0000	0,0000
3,4-DHPEA-EDA-AOD	0,07 ± 0,00 ^a	ND	0,09 ± 0,02 ^{Ab}	0,05 ± 0,00 ^{Ba}	0,05 ± 0,01 ^{Ac}	0,08 ± 0,01 ^{Ba}	0,06 ± 0,01 ^{Ac}	0,06 ± 0,01 ^{Aa}	0,10 ± 0,02 ^{Ad}	0,03 ± 0,00 ^{Ba}	0,0000	0,0609	0,7852
p-HPEA-EDA	50 ± 2 ^{Aa}	43 ± 2 ^{Ba}	39 ± 1 ^{Ab}	29 ± 2 ^{Bb}	21 ± 1 ^{Ac}	20 ± 1 ^{Bc}	21 ± 2 ^{Ac}	23 ± 2 ^{Ad}	12 ± 2 ^{Ad}	11 ± 1 ^{Ae}	0,0000	0,0000	0,0000
p-HPEA-EDA, oxidada	0,33 ± 0,02 ^{Aa}	1,37 ± 0,27 ^{Ba}	0,30 ± 0,04 ^{Ab}	0,88 ± 0,09 ^{Bb}	0,06 ± 0,01 ^{Ac}	0,19 ± 0,01 ^{Bc}	0,13 ± 0,01 ^{Ad}	1,29 ± 0,12 ^{Ba}	0,16 ± 0,02 ^c	ND	0,0000	0,0000	0,0000
Pinoresinol	9 ± 1 ^{Aa}	8,8 ± 0,4 ^{Aa}	12 ± 1 ^{Ab}	11 ± 0 ^{Bb}	12 ± 1 ^{Ab}	8,5 ± 0,3 ^{Ba}	8 ± 1 ^{Ac}	9 ± 1 ^{Ba}	6,9 ± 0,3 ^{Ac}	7 ± 1 ^{Ac}	0,0000	0,0000	0,0043
p-HPEA-EDA-ALD	1,8 ± 0,1 ^{Aa}	2,6 ± 2,0 ^{Aa}	1,6 ± 0,1 ^{Ab}	1,7 ± 0,1 ^{Ab}	1,6 ± 0,1 ^{Ab}	0,6 ± 0,1 ^{Bc}	0,8 ± 0,1 ^{Ac}	1,1 ± 0,1 ^{Bc}	0,9 ± 0,1 ^{Ac}	0,8 ± 0,1 ^{Bc}	0,0000	0,0005	0,9722
3,4-DHPEA-EA-AH	30 ± 2 ^{Aa}	36 ± 2 ^{Ba}	13 ± 3 ^{Ab}	14 ± 1 ^{Ab}	10 ± 1 ^{Ac}	2 ± 0 ^{Bc}	6 ± 1 ^{Ad}	7 ± 1 ^{Bd}	5 ± 0 ^{Ad}	0,3 ± 0,0 ^{Bc}	0,0000	0,0000	0,0026
Luteolina	8,0 ± 0,6 ^{Aa}	6,6 ± 1,5 ^{Ba}	8,9 ± 0,8 ^{Aa}	8,5 ± 0,3 ^{Ab}	14 ± 2 ^{Ab}	5,4 ± 0,2 ^{Bc}	8,8 ± 2,2 ^{Aa}	8 ± 1 ^{Bb}	8 ± 1 ^{Aa}	3,4 ± 0,3 ^{Bd}	0,0000	0,0000	0,0000
Apigenina	3,1 ± 0,3 ^{Aa}	2,5 ± 0,4 ^{Ba}	3,1 ± 0,3 ^{Ac}	2,8 ± 0,2 ^{Ab}	4,5 ± 0,7 ^{Ab}	2,4 ± 0,2 ^{Ba}	2,7 ± 0,5 ^{Ac}	2,4 ± 0,5 ^{Aa}	2,6 ± 0,3 ^{Ad}	1,6 ± 0,3 ^{Bc}	0,0000	0,0000	0,0000
Metil luteolina	1,6 ± 0,1 ^{Aa}	1,7 ± 0,7 ^{Aab}	2,0 ± 0,3 ^{Ab}	1,8 ± 0,2 ^{Aa}	2,0 ± 0,2 ^{Ab}	1,8 ± 0,2 ^{Aa}	1,3 ± 0,3 ^{Ac}	1,3 ± 0,2 ^{Abc}	1,4 ± 0,4 ^{Ac}	1,0 ± 0,3 ^{Bc}	0,0000	0,0000	0,0547
Fenoles totales	413 ± 7 ^{Aa}	419 ± 10 ^{Aa}	241 ± 6 ^{Ab}	279 ± 10 ^{Bb}	171 ± 5 ^{Ac}	204 ± 9 ^{Bc}	124 ± 3 ^{Ad}	177 ± 8 ^{Bd}	124 ± 8 ^{Ad}	93 ± 5 ^{Be}	0,0000	0,0005	0,0000
Fenoles no oxidados	410 ± 7 ^{Aa}	415 ± 10 ^{Aa}	240 ± 6 ^{Ab}	276 ± 10 ^{Bb}	170 ± 5 ^{Ac}	204 ± 9 ^{Bc}	124 ± 3 ^{Ad}	175 ± 8 ^{Bd}	124 ± 8 ^{Ad}	93 ± 5 ^{Be}	0,0000	0,0000	0,0000
Fenoles oxidados	3,40 ± 0,16 ^{Aa}	4,41 ± 0,34 ^{Ba}	1,25 ± 0,06 ^{Ab}	3,60 ± 0,22 ^{Bb}	1,15 ± 6 ^{Ac}	0,23 ± 0,01 ^{Bc}	0,24 ± 0,02 ^{Ad}	1,74 ± 0,16 ^{Bd}	0,26 ± 0,02 ^d	ND	0,0000	0,0000	0,0000
α -Tocoferol (mg kg ⁻¹)	166 ± 8 ^{Aa}	123 ± 3 ^{Ba}	131 ± 4 ^{Ab}	115 ± 6 ^{Bb}	125 ± 7 ^{Ab}	114 ± 2 ^{Bb}	117 ± 5 ^{Ac}	97 ± 6 ^{Bc}	114 ± 1 ^{Ac}	99 ± 5 ^{Bc}	0,0000	0,0000	0,0000
ORAC (μ mol ET g ⁻¹ aceite)	12,5 ± 1,4 ^{Aa}	11,6 ± 0,4 ^{Aa}	6,8 ± 0,5 ^{Abc}	8,6 ± 1,7 ^{Ab}	5,7 ± 0,4 ^{Abd}	7,0 ± 0,5 ^{Bc}	7,1 ± 0,2 ^{Ac}	7,1 ± 0,3 ^{Abc}	5,5 ± 0,3 ^{Ad}	5,1 ± 0,6 ^{Ad}	0,0000	0,0000	0,1828

Nota: Los valores se expresan como la media $\bar{X} \pm SD$ (n = 3). Letras mayúsculas diferentes en la misma fila para cada mes indican diferencias significativas entre AOV de olivas frescas y congeladas ($p < 0,05$; LSD Fisher). Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre aceites de diferentes etapas de maduración ($p < 0,05$; LSD Fisher). Se comparan los aceites de aceitunas frescas y congeladas por separado. Se presenta el valor-P de temperatura para la comparación entre olivas frescas y congeladas, y el valor-P entre los meses de maduración para ambas condiciones. Abreviaturas: O.frescas, Aceite de olivas frescas. O.cong, aceite de olivas congeladas. ND, no detectado.

En la Tabla 5 y Figura 11 se presentan los resultados obtenidos de la medición de compuestos fenólicos totales presentes en aceites extraídos de olivas frescas y congeladas durante la maduración. En el mes de mayo el aceite procedente de olivas frescas presentó un contenido de fenoles totales de 413 mg/kg de aceite, mayor al valor obtenido por Caipo y cols., (2021). La Figura 11 muestra que en ambos tipos de aceites la concentración de compuestos fenólicos totales decrece con la maduración de las olivas Arbequinas, llegando casi a la mitad de la concentración en el segundo mes de cosecha (cuando el índice de madurez está entre 3 y 4). En los aceites procedentes de olivas frescas el contenido fenólico se mantuvo entre el rango de 413 y 124 mg/kg de aceite durante la maduración, mientras que, en los aceites procedentes de olivas congeladas el rango de compuestos fenólicos fue entre 419 y 93 mg/kg de aceite. Al comparar los aceites procedentes de olivas frescas y congeladas se observa una mayor concentración fenólica en estos últimos, desde junio hasta agosto, con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre ambos tipos de aceites.

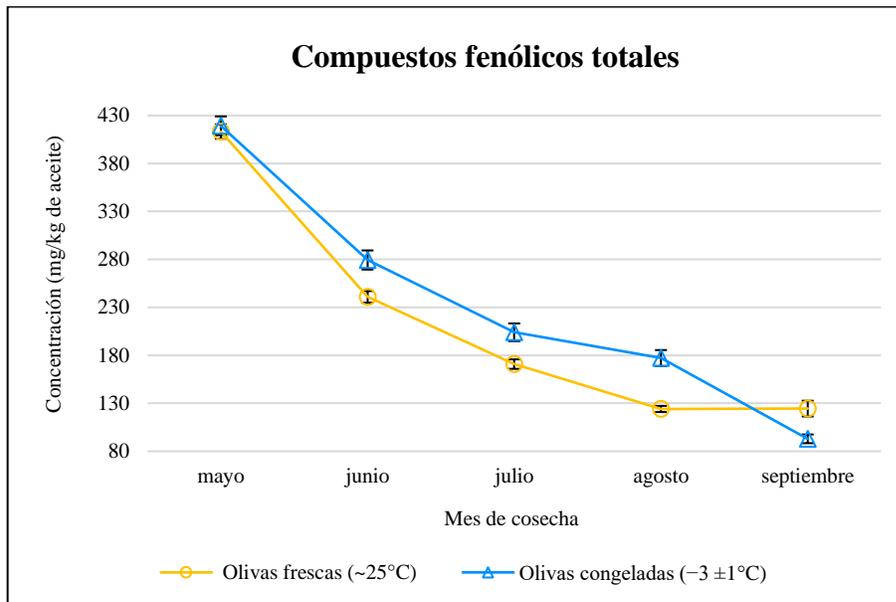


Figura 11. Variación de los compuestos fenólicos totales en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas en diferentes estados de maduración.

Durante la maduración de las olivas, la concentración de compuestos fenólicos aumenta hasta alcanzar un nivel máximo en la etapa “*cherry*” y a medida que avanza la maduración se produce una disminución abrupta. La rápida disminución de los compuestos fenólicos durante esta etapa se debe a una mayor actividad de enzimas hidrolíticas (Conde y cols., 2008).

Entre los compuestos fenólicos de menor concentración están los alcoholes hidroxitirosol y tirosol, los cuales presentaron valores de 3,8 y 2,3 mg/kg de aceite, respectivamente, en aceites de olivas frescas en la etapa de maduración más temprana. En la Tabla 5 se observa que a medida que avanza el estado de maduración, el contenido de los alcoholes fenólicos disminuye en los AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas. Gutierrez-Rosales y

cols., (2010) informaron una disminución en la cantidad de tirosol producto de la maduración en olivas variedad Arbequina y Hojiblanca. La Tabla 5 muestra que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) en la cantidad de tirosol de aceites de olivas frescas y congeladas, siendo ligeramente mayor en olivas frescas. A partir del mes de julio, el contenido de este alcohol se vuelve constante en los dos tipos de aceites estudiados. También se observó que la concentración de hidroxitirosol es mayor en olivas congeladas durante la mayoría de los meses, con la excepción de mayo y septiembre. Hay diferencias significativas entre olivas frescas y congeladas ($p < 0,05$) y al igual que ocurre con el tirosol, a partir de julio las concentraciones de hidroxitirosol son constantes.

Los secoiridoides son compuestos formados a partir de la oleuropeína y ligustrósido, donde el grupo de los derivados de la oleuropeína (DO) está conformado por 3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EDA-AOD y 3,4-DHPEA-EA-AH; y el grupo de los derivados del ligustrósido (DL) por p-HPEA-EDA y p-HPEA-EDA-ALD (Tabla 4). A continuación, en la Figura 12 se presenta la variación estos compuestos fenólicos en aceites procedentes de olivas frescas y congeladas durante la maduración.

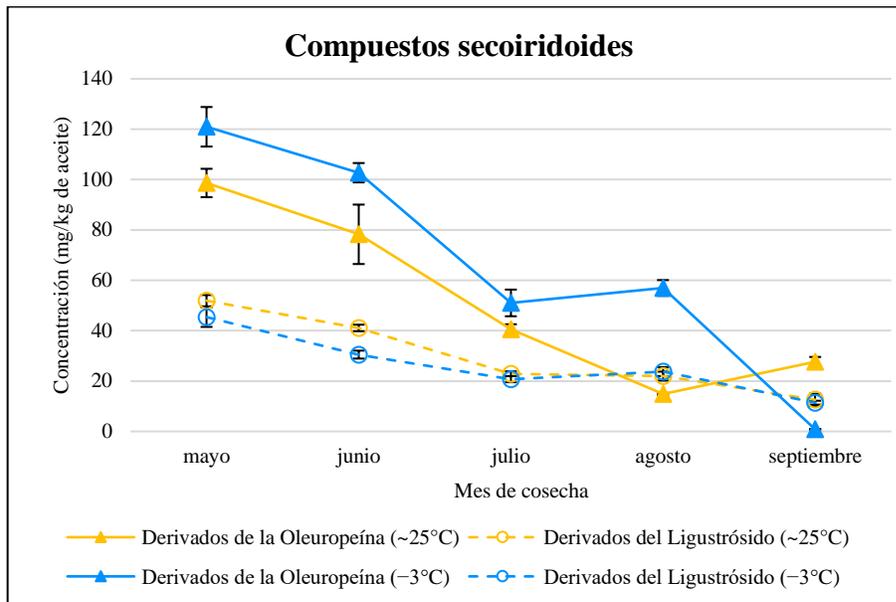


Figura 12. Cambio en la concentración de los compuestos secoiridoides en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas durante la maduración.

En la Figura 12 se observa que, en los aceites procedentes de olivas frescas y congeladas, hay un contenido mayor de compuestos secoiridoides derivados de la oleuropeína que derivados del ligustrósido. Esto se debe a que el compuesto fenólico 3,4-DHPEA-EDA es el más abundante de los secoiridoides (Tabla 5) en los aceites estudiados. Servili & Montedoro, (2002) también encontraron este compuesto fenólico en mayor proporción en aceites de oliva de las variedades Moraiolo, Frantoio y Leccino; Caipo y cols., (2021) obtuvieron resultados similares para la variedad Arbequina.

Se observó un descenso en los compuestos secoiridoides a medida que la fruta de Arbequina madura. En aceites de olivas frescas los compuestos DO mostraron un rápido decrecimiento del 72% (desde 98,65 hasta 27,63 mg/kg de aceite). De forma similar, los DL disminuyeron un 76% (desde 51,91 hasta 12,57 mg/kg de aceite) cuando el índice de madurez está en el rango de 5 a 7. La disminución de estos compuestos está relacionada con la β -glucosidasa. Esta enzima está involucrada en las reacciones catabólicas y anabólicas en la biosíntesis de los secoiridoides (cataliza la eliminación de la glucosa de la oleuropeína y ligustrósido mediante la hidrólisis), y tiene mayor afinidad por la oleuropeína (Romero-Segura y cols., 2012). La actividad de esta enzima es mayor al principio del proceso de maduración y luego decae (Gutierrez-Rosales y cols., 2010). Por otra parte, como se mencionó anteriormente, el descenso del contenido fenólico está relacionado a las enzimas hidrolíticas durante la fase negra de maduración.

En los aceites de olivas congeladas, las concentraciones de los DO fueron mayores durante la mayoría de los meses y disminuyeron un 100% en septiembre (desde 120,96 mg/kg de aceite), mientras que los compuestos DL disminuyeron un 75% (desde 45,39 hasta 11,42 mg/kg de aceite). El contenido mayoritario de 3,4-DHPEA-EDA en los aceites procedentes de olivas congeladas se explica con el crecimiento de los cristales de hielo, los cuales rompen los tejidos celulares causando su descompartimentalización, poniendo en contacto enzimas y sustratos. Este hecho provoca la hidrólisis de la oleuropeína por la enzima

endógena β -glucosidasa dando origen a las agliconas y sus derivados, las cuales pasan a la fase oleosa durante la extracción del aceite de oliva. La ruptura de tejidos producida por el proceso de congelación es comparable con la molturación, por lo tanto, en olivas congeladas la hidrólisis enzimática comienza mucho antes que se inicie la molienda (García-Vico y cols., 2017).

En un estudio realizado por García-Vico y cols., (2017), se encontró que los principales glúcidos fenólicos: oleuropeína y demetiloleuropeína, se vieron gravemente reducidos en el tejido de la oliva a causa de la congelación, observándose además altos niveles de derivados de secoiridoides hidrolizados (3,4-DHPEA-EDA y 3,4-DHPEA-EA) en los frutos dañados por congelación.

En la Figura 13 se presenta la variación en las concentraciones de los compuestos fenólicos pinosinol y flavonoides: apigenina, luteolina y Metil-luteolina, presentes en el aceite de oliva producido a partir de frutos frescos y congelados en función de los meses de cosecha. Se observa que con el avance del estado de maduración de las olivas hay un leve incremento inicial del pinosinol y flavonoides. La luteolina y apigenina (flavonoides más abundantes del aceite de oliva) aumentaron su concentración hasta julio, donde presentaron un máximo de 14 y 4,5 mg/kg de aceite, respectivamente (Tabla 5). A partir del mes de julio, los flavonoides disminuyeron su concentración, manteniendo valores inferiores en olivas congeladas, similar a lo reportado por Masella y cols., (2019) para distintas formas de congelar las olivas.

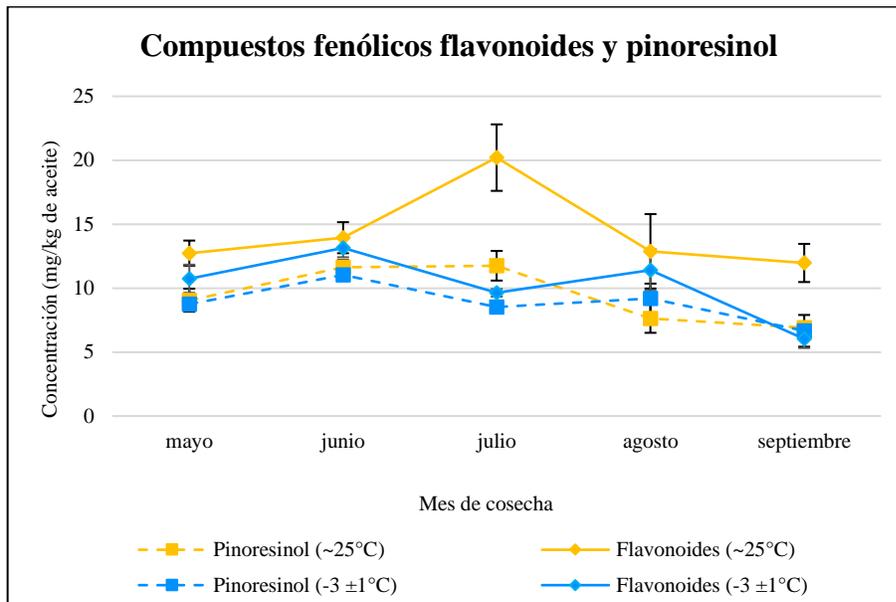


Figura 13. Cambio en la concentración de los compuestos fenólicos flavonoides y pinosresinol en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas durante la maduración.

El pinosresinol mostró un valor de concentración máximo en el mes de julio de 12 mg/kg de aceite en AOVEs procedentes de olivas frescas, manteniendo valores ligeramente mayores a los de AOVEs de olivas congeladas en la mayoría de los meses.

Se observó que los compuestos fenólicos flavonoides y pinosresinol presentaron menor variabilidad frente al estado de madurez y la influencia de la helada que los secoiridoides.

Dentro de los compuestos fenólicos de menor concentración, están los fenoles oxidados provenientes de los derivados de la oleuropeína (DO) y ligustrósido (DL). La Figura 14 muestra la evolución del contenido de fenoles

oxidados en los AOVEs extraídos de Arbequinas frescas y congeladas en cinco estados de maduración.

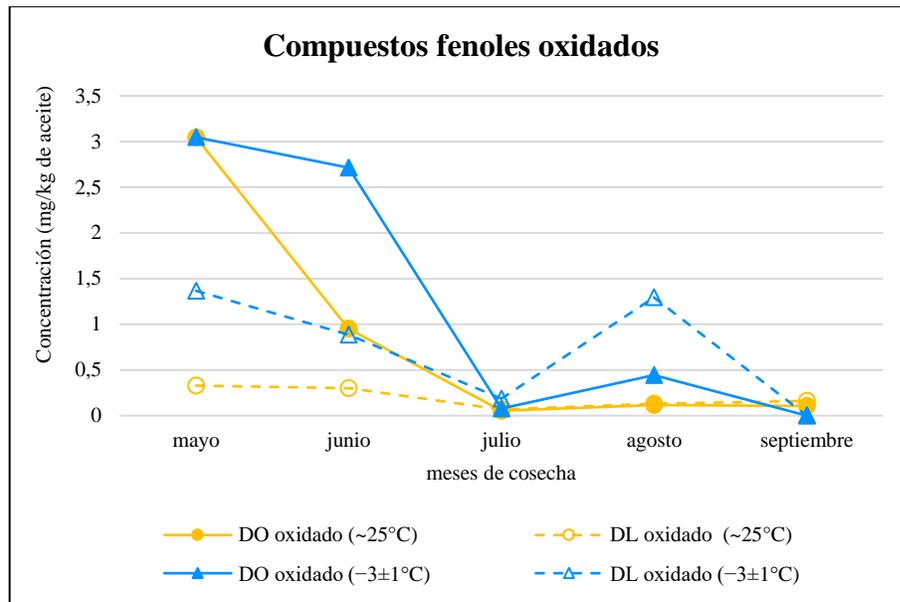


Figura 14. Cambio en la concentración de los compuestos fenólicos oxidados en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas durante la maduración.

La Figura 14 presenta la variación de los compuestos fenólicos oxidados durante la maduración de los frutos. Se observó un decrecimiento de estos compuestos fenólicos tanto en aceites de olivas frescas y congeladas. En el mes de mayo se obtuvieron concentraciones de fenoles totales oxidados de 3,40 y 4.41 mg/kg de aceite en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas, respectivamente (Tabla 5). En general, los valores de fenoles oxidados fueron mayores en olivas congeladas debido al daño protoplasmático provocado por la formación de los cristales de hielo y el contacto de la enzima PPO con sus

sustratos de forma similar a lo ocurrido con la β -glucosidasa (García-Vico y cols., 2017).

La enzima polifenol oxidasa (PPO) se encuentra en el mesocarpio de la oliva y es la principal enzima involucrada en la oxidación de fenoles, asociada a la maduración y ruptura de tejidos. Otra enzima que participa del proceso oxidativo es la peroxidasa (POX), que se encuentra preferentemente en las semillas y actúa en forma sinérgica con la PPO. El proceso de oxidación ocurre en dos tipos de reacciones, una es la hidroxilación de mono-fenoles a orto-difenoles por PPO y la oxidación de los orto-difenoles a quinonas mediante la POX (García-Rodríguez y cols., 2011). La POX se libera cuando comienza la molienda, por lo tanto, actúa después que la PPO (en olivas congeladas), oxidando los orto-difenoles formados a quinonas.

García-Rodríguez y cols., (2011) informaron que las tasas de oxidación más altas se observaron para los compuestos secoridoides ortodifenólicos (3,4-DHPEA-EDA), mientras que los compuestos monofenólicos (p-HPEA-EDA) casi no se detectó actividad. Por esta razón, hay un mayor contenido de fenoles oxidados DO en aceites procedentes de olivas frescas y congeladas, como se muestra en la Figura 14.

5.2.2 Capacidad antioxidante hidrofílica (H-ORAC_{FL})

El ensayo ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) mide la capacidad de los antioxidantes de la muestra para proteger la sonda de fluoresceína (FL) de la oxidación provocada por radicales peroxilos, los cuales se generan por descomposición térmica del AAPH en un *buffer* fosfato acuoso. Los antioxidantes reaccionan rompiendo la reacción en cadena del radical mediante la transferencia de átomos de hidrógeno (Ou y cols., 2001).

En la Tabla 5 y Figura 15 se presentan los resultados obtenidos del ensayo ORAC (expresado en μmol de Equivalente Trolox (ET)) en las muestras de aceites procedentes de olivas frescas y congeladas en cinco estados de maduración.

En la Figura 15 se observa que en el mes de mayo se obtuvieron valores máximos de capacidad antioxidante de 12,5 y 11,6 μmol ET/g de aceite, en aceites de olivas frescas y congeladas, respectivamente. Además, se observó un descenso significativo ($p < 0,05$) de la capacidad antioxidante con el estado de maduración de las olivas (meses de cosecha) alcanzando un 56% de disminución en el estado más tardío de maduración, en ambos tipos de aceites. No se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la capacidad antioxidante entre ambos tipos de aceites para el mismo tiempo de cosecha en la mayoría de los meses (ver Tabla 5).

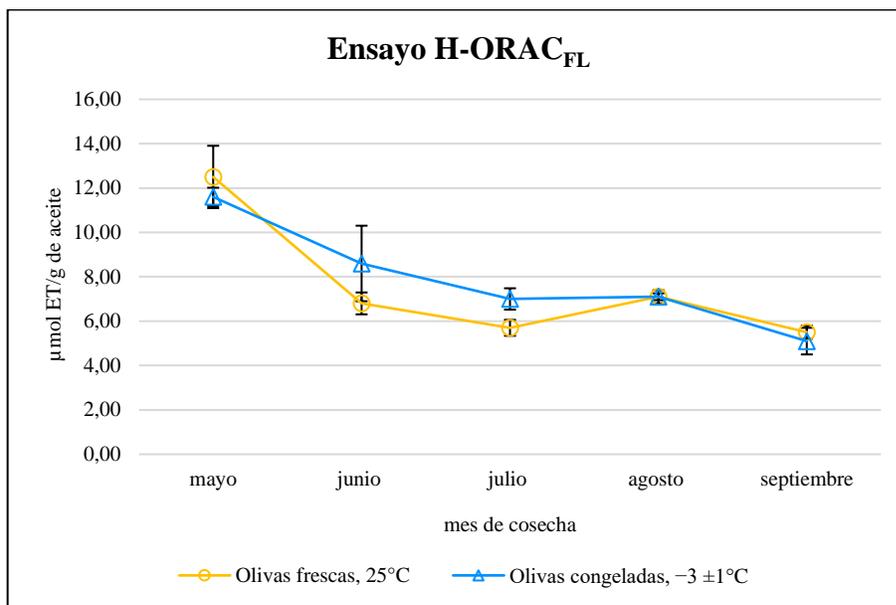


Figura 15. Efecto de la helada y el tiempo de cosecha en la capacidad antioxidante hidrofílica (ORAC) de los AOVes.

Los aceites procedentes de olivas congeladas mostraron valores más altos entre junio y agosto, lo que podría estar relacionado con el contenido ligeramente más alto de fenoles totales y de algunos fenoles particulares como el 3,4-DHPEA-EDA e hidroxitirosol; sin embargo, un estudio anterior reveló que cuando las olivas se ven afectadas por las heladas en el árbol (con caídas de temperatura lentas y continuas o abruptas), la cantidad de fenoles era menor en comparación con los aceites procedentes de olivas no afectadas por heladas (Romero y cols., 2016).

La disminución de la capacidad antioxidante se debe a que está altamente influenciada por la disminución de la fracción de fenoles hidrofílicos durante la maduración de las olivas (Ramos-Escudero y cols., 2015). Navajas-Porras y

cols., (2020) reportaron una disminución de la capacidad antioxidante de los AOVEs de Manzanilla y Picual durante la maduración de las olivas.

Se observó una relación directa entre el contenido total de polifenoles y la capacidad antioxidante (Anexo 6) considerando 24 mediciones ($r^2= 0,9699$), lo que indica que los compuestos fenólicos pueden actuar como eficaces antioxidantes rompedores de cadenas de radicales libres. Ballus y cols., (2015) informaron de una alta correlación positiva y significativa entre el contenido fenólico total y los resultados de ORAC ($r^2= 0,7431$; $p < 0,001$).

5.2.3 Contenido de α -Tocoferol

Los tocoferoles son los principales antioxidantes lipofílicos en el aceite de oliva y forman parte de la fracción insaponificable del aceite, son solubles en lípidos y se oxidan fácilmente en presencia de luz, oxígeno, trazas de metales y pH alcalino (Camacho y cols., 2013). Químicamente, están formados por un anillo complejo cromano y una cadena lateral. Existen 8 vitámeros que se dividen en 2 grupos: 4 tocoferoles y 4 tocotrienoles; la diferencia entre estos grupos es la saturación de la cadena lateral. Los vitámeros se diferencian en el número y posición de los grupos metilos del anillo cromano (α , β , γ y δ). El α -tocoferol es el vitámero que posee mayor actividad de vitamina E (Sayago y cols., 2007).

La Tabla 5 y la Figura 16 presentan la evolución de α -tocoferol en aceites extraídos de olivas frescas y congeladas, a medida que los frutos maduran. Los

cromatogramas obtenidos del HPLC-FL mostraron trazas de γ -tocoferol, por lo que solo se cuantificó el contenido de α -tocoferol.

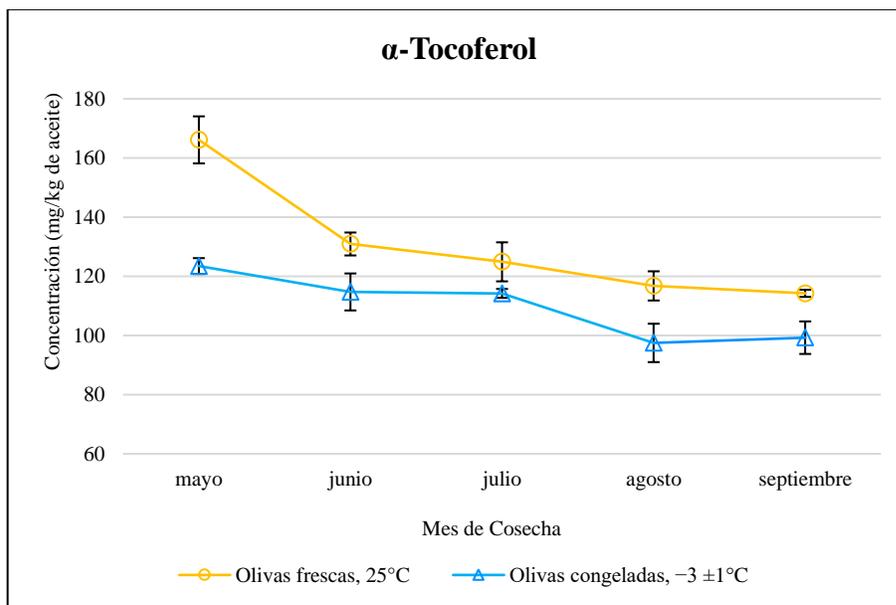


Figura 16. Comportamiento del α -tocoferol en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas en diferentes estados de maduración.

En la Figura 16 se observa que los aceites extraídos de olivas frescas presentaron un rango de concentraciones entre 166 y 114 mg/kg de aceite entre el mes de mayo (índice de maduración 2-3) y el mes de septiembre (índice de maduración 5-7), con una disminución de un 31%. Durante los cinco meses de maduración, los aceites de olivas congeladas presentaron un rango de concentración entre 123 y 99 mg/kg de aceite en este período, con una disminución de un 19%. La cantidad de α -tocoferol presente en el AOVE de olivas frescas en la etapa más temprana de maduración, está dentro del rango para la variedad Arbequina de 188 ± 15 ppm presentado por Ramos-Escudero y cols.,

(2015) y cercano al valor reportado por Caipo y cols., (2021) para AOVEs extraídos de Arbequinas del Valle del Huasco.

La concentración de α -tocoferol disminuye en los aceites procedentes de olivas frescas y congeladas a medida que avanza el estado de maduración del fruto, tal como reportaron Beltrán y cols., (2005) para la variedad Hojiblanca en diferentes temporadas de estudio. Peres y cols., (2016) reportaron una disminución de α -tocoferol con el estado de maduración en dos variedades portuguesas de AOV.

El decrecimiento observado en la concentración de tocoferoles se relaciona inversamente con la tendencia al aumento del índice de peróxidos, debido a que los tocoferoles son los antioxidantes lipofílicos más importantes que posee el aceite de oliva, ya que actúan donando átomos de hidrógeno y atrapando los radicales peroxilos de los ácidos grasos que se propagan en cadena. La estabilidad oxidativa del aceite de oliva durante el proceso de autooxidación (mecanismo de oxidación) no está solo correlacionada con los fenoles polares, sino que la participación de los tocoferoles es igual de importante (Psomiadou y Tsimidou, 2002).

Al comparar los aceites producidos por olivas frescas y congeladas, la mayor pérdida de α -tocoferol debida a la condición de congelación fue observada en el mes de mayo con 26% de pérdida. En los meses restantes las pérdidas de α -tocoferol fluctuaron entre 7 y 17%. El estrés producido por la congelación del

fruto promovería una serie de reacciones químicas y enzimáticas, como por ejemplo, la oxidación de compuestos bioactivos, tales como: fenoles, ácidos grasos insaturados, pigmentos (Morelló y cols., 2003; Romero y cols., 2016), entre otros. La mayor pérdida de tocoferoles en olivas dañadas por la congelación durante las primeras etapas de maduración, podría ser consecuencia de la pigmentación verde de las olivas (clorofila). La clorofila es un pigmento absorbente de luz y sus estados excitados son duraderos. El estado triplete de la clorofila reacciona con oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$) y da origen al oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) que es muy reactivo, produciendo una fotooxidación temprana de los triglicéridos. Los tocoferoles intervienen reaccionando con el $^1\text{O}_2$ para formar 8-hidroperoxi-tocoferona y finalmente α -tocofoeilquinona (Krieger-Liszkay y Trebst, 2006). J.-R. Morelló y cols., (2003) no observaron diferencias significativas ($p>0,05$) en el contenido de α -tocoferol en AOV obtenidos de olivas cosechadas luego de las heladas.

5.3 Determinación de compuestos volátiles

Para cumplir con el segundo objetivo, también se cuantificaron y analizaron compuestos volátiles presentes en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas.

Los compuestos volátiles son responsables del aroma en el AOVE y son producidos principalmente por la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados. Aquellos compuestos biosintetizados por la enzima endógena lipoxigenasa (LOX), están asociados a la percepción positiva del aroma; mientras que la

oxidación química y enzimas exógenas (provenientes de actividad microbiana) son responsables de aromas desagradables o defectos sensoriales (Morales y cols., 2013).

En la cascada de la lipoxigenasa, la enzima LOX actúa en los ácidos grasos linoleico (LA) y α -linolénico (LnA) produciendo 9-hidroperóxido y 13-hidroperóxido, los cuales son catalizados por las enzimas hidroperóxido liasa (HPL), alcohol deshidrogenasa (ADH) y alcohol aciltransferasa (AAT), para convertirse principalmente en compuestos de seis átomos de carbono (C6) como aldehídos, cetonas, alcoholes y ésteres (Angerosa y cols., 2004). La característica principal de estos compuestos es su bajo peso molecular (menor a 300 Da), por lo que se vaporizan a temperatura ambiente (Angerosa, 2002). La importancia de estudiar estos componentes minoritarios es que aún un pequeño cambio en los compuestos volátiles puede tener un impacto importante desde el punto de vista sensorial (Sánchez-Ortiz y cols., 2012).

Para estudiar la variación del perfil de compuestos volátiles durante la maduración de frutos de Arbequina frescas y congeladas, se cuantificaron 23 compuestos volátiles, de los cuales 9 de ellos presentan defectos sensoriales característicos de heladas (Romero y cols., 2016). En el Anexo 4, se clasificaron los compuestos volátiles según sus grupos químicos funcionales.

En la Tabla 6 se presentan los resultados obtenidos de todos los compuestos volátiles analizados en AOVE extraídos de olivas frescas y congeladas en cinco meses de cosecha.

Tabla 6.- Efectos de la maduración y el congelamiento en el perfil de compuestos volátiles en el AOVE variedad Arbequina.

Compuestos volátiles (mg kg ⁻¹)	Meses de cosecha										valor-P		Temperatura
	mayo		junio		julio		agosto		septiembre		Meses		
	O. frescas	O. cong.	O. frescas	O. cong.	O. frescas	O. cong.							
Etol	6,61 ± 4,64 ^{Aa}	1,47 ± 0,45 ^{Ba}	0,51 ± 0,03 ^{Ab}	0,81 ± 0,06 ^{Aa}	1,04 ± 0,50 ^{Ab}	3,04 ± 1,64 ^{Bbc}	2,46 ± 0,41 ^{Ab}	3,77 ± 0,58 ^{Ac}	1,87 ± 0,30 ^{Ab}	2,78 ± 0,75 ^{Ab}	0,0001	0,0000	0,7388
Etil propionato	0,14 ± 0,02 ^{Aa}	0,08 ± 0,01 ^{Ba}	0,09 ± 0,00 ^{Ab}	0,08 ± 0,00 ^{Ba}	0,08 ± 0,01 ^{Ac}	0,08 ± 0,01 ^{Aa}	0,08 ± 0,01 ^{Ac}	0,07 ± 0,01 ^{Ab}	0,07 ± 0,00 ^{Ac}	0,06 ± 0,00 ^{Bb}	0,0000	0,0000	0,0000
Pentanal	0,09 ± 0,02 ^{Aa}	0,08 ± 0,01 ^{Aa}	0,25 ± 0,04 ^{Ab}	0,17 ± 0,08 ^{Bb}	0,15 ± 0,02 ^{Ac}	0,08 ± 0,01 ^{Bac}	0,12 ± 0,02 ^{Ad}	0,06 ± 0,03 ^{Ba}	0,16 ± 0,02 ^{Ac}	0,13 ± 0,07 ^{Bbc}	0,0000	0,0027	0,0000
4-Metil-2-pentanona	0,094 ± 0,01 ^{Aa}	0,07 ± 0,01 ^{Ba}	0,10 ± 0,00 ^{Ab}	0,06 ± 0,00 ^{Ba}	0,09 ± 0,01 ^{Ac}	0,04 ± 0,01 ^{Bb}	0,06 ± 0,00 ^{Ad}	0,03 ± 0,01 ^{Bb}	0,05 ± 0,00 ^{Ae}	0,04 ± 0,00 ^{Bb}	0,0000	0,0000	0,0000
Etil-2-metilbutirato	0,03 ± 0,01 ^{Aa}	0,02 ± 0,00 ^{Ba}	0,02 ± 0,01 ^{Ab}	0,02 ± 0,00 ^{Aa}	0,01 ± 0,00 ^{Ab}	0,02 ± 0,01 ^{Ba}	0,02 ± 0,01 ^{Ab}	0,02 ± 0,00 ^{Aa}	0,02 ± 0,00 ^{Ab}	0,02 ± 0,00 ^{Aa}	0,0000	0,5794	0,2057
Acetato de butilo	0,07 ± 0,01 ^{Aa}	0,04 ± 0,01 ^{Ba}	0,06 ± 0,00 ^{Aa}	0,05 ± 0,00 ^{Ab}	0,07 ± 0,01 ^{Aa}	0,04 ± 0,01 ^{Bad}	0,05 ± 0,00 ^{Ab}	0,03 ± 0,00 ^{Bc}	0,04 ± 0,00 ^{Ac}	0,03 ± 0,00 ^{Bcd}	0,0000	0,0000	0,0000
Hexanal	4,28 ± 0,38 ^{Aa}	4,49 ± 0,24 ^{Aa}	6,98 ± 0,16 ^{Ab}	4,71 ± 0,12 ^{Bab}	6,19 ± 0,31 ^{Ac}	4,38 ± 0,50 ^{Ba}	6,35 ± 0,57 ^{Ac}	4,66 ± 0,41 ^{Bab}	7,21 ± 0,89 ^{Ab}	5,02 ± 0,34 ^{Bb}	0,0000	0,0300	0,0000
2-Metil-butan-1-ol	0,07 ± 0,03 ^{Aab}	0,03 ± 0,00 ^{Ba}	0,05 ± 0,01 ^{Aa}	0,05 ± 0,01 ^{Ab}	0,05 ± 0,00 ^{Aa}	0,06 ± 0,01 ^{Ab}	0,07 ± 0,02 ^{Aab}	0,05 ± 0,00 ^{Bb}	0,08 ± 0,02 ^{Ab}	0,07 ± 0,01 ^{Ac}	0,0310	0,0000	0,0015
3-Metil-butan-1-ol	0,18 ± 0,12 ^{Aa}	0,04 ± 0,01 ^{Ba}	0,04 ± 0,01 ^{Ab}	0,04 ± 0,01 ^{Aa}	0,07 ± 0,01 ^{Abc}	0,07 ± 0,02 ^{Ab}	0,11 ± 0,10 ^{Abd}	0,06 ± 0,01 ^{Ab}	0,12 ± 0,09 ^{Ad}	0,07 ± 0,01 ^{Ab}	0,0129	0,0000	0,0003
E-2-Hexenal	6,43 ± 0,98 ^{Aa}	6,42 ± 0,47 ^{Aa}	11,07 ± 0,40 ^{Ab}	7,31 ± 0,28 ^{Bb}	9,56 ± 0,88 ^{Ac}	6,32 ± 1,02 ^{Ba}	9,58 ± 0,79 ^{Ac}	6,58 ± 0,69 ^{Bab}	9,38 ± 0,94 ^{Ac}	7,07 ± 0,62 ^{Bab}	0,0000	0,0651	0,0000
Octan-3-one	0,20 ± 0,01 ^{Aa}	0,19 ± 0,00 ^{Ba}	0,19 ± 0,00 ^{Ab}	0,19 ± 0,00 ^{Aa}	0,19 ± 0,00 ^{Ab}	0,19 ± 0,00 ^{Aa}	0,19 ± 0,00 ^{Ab}	0,19 ± 0,00 ^{Aa}	0,20 ± 0,00 ^{Aa}	0,19 ± 0,00 ^{Ba}	0,0176	0,3638	0,0017
Octanal	0,056 ± 0,01 ^{Aa}	0,09 ± 0,02 ^{Ba}	0,06 ± 0,00 ^{Aa}	0,05 ± 0,01 ^{Ab}	0,06 ± 0,00 ^{Aa}	0,04 ± 0,01 ^{Bb}	0,07 ± 0,02 ^{Aab}	0,05 ± 0,01 ^{Bb}	0,06 ± 0,01 ^{Aa}	0,05 ± 0,01 ^{Ab}	0,8182	0,0001	0,1082
E-2-heptenal	0,59 ± 0,29 ^{Aa}	0,53 ± 0,02 ^{Aa}	0,66 ± 0,16 ^{Aa}	0,65 ± 0,13 ^{Ab}	0,91 ± 0,15 ^{Ab}	0,63 ± 0,12 ^{Bab}	0,52 ± 0,11 ^{Aa}	0,55 ± 0,23 ^{Ab}	0,51 ± 0,17 ^{Aa}	0,74 ± 0,03 ^{Bb}	0,0067	0,1956	0,6383
Heptan-2-ol	2,28 ± 0,35 ^{Aa}	0,96 ± 0,52 ^{Bac}	3,90 ± 0,62 ^{Ab}	3,38 ± 0,12 ^{Ab}	4,49 ± 0,69 ^{Ab}	0,62 ± 0,77 ^{Ba}	3,79 ± 0,85 ^{Ab}	0,59 ± 0,81 ^{Ba}	2,05 ± 0,62 ^{Aa}	1,62 ± 0,81 ^{Ac}	0,0000	0,0000	0,0000
Hexan-1-ol	5,29 ± 0,91 ^{Aa}	3,94 ± 0,15 ^{Ba}	5,07 ± 0,12 ^{Aa}	3,81 ± 0,06 ^{Bb}	4,72 ± 0,71 ^{Aab}	4,24 ± 0,23 ^{Ac}	4,06 ± 0,47 ^{Ab}	3,79 ± 0,04 ^{Ad}	4,37 ± 0,43 ^{Ab}	4,00 ± 0,28 ^{Abd}	0,0066	0,0056	0,0000
Nonanal	0,92 ± 0,14 ^{Aa}	1,09 ± 0,06 ^{Ba}	0,63 ± 0,02 ^{Ab}	0,61 ± 0,06 ^{Abc}	0,63 ± 0,04 ^{Ab}	0,56 ± 0,02 ^{Bb}	0,66 ± 0,03 ^{Ab}	0,65 ± 0,01 ^{Adc}	0,69 ± 0,04 ^{Ab}	0,71 ± 0,05 ^{Ad}	0,0000	0,0000	0,0000
E-2-nonenal	1,08 ± 0,23 ^{Aa}	1,21 ± 0,34 ^{Aa}	0,79 ± 0,09 ^{Aa}	0,72 ± 0,05 ^{Ab}	1,05 ± 0,21 ^{Aa}	0,78 ± 0,14 ^{Ab}	1,92 ± 0,83 ^{Ab}	0,74 ± 0,04 ^{Bb}	1,10 ± 0,25 ^{Aa}	1,07 ± 0,07 ^{Ab}	0,0000	0,0000	0,3130
E-2-Hexen-1-ol	4,93 ± 0,19 ^{Aa}	4,30 ± 0,05 ^{Ba}	4,65 ± 0,16 ^{Ab}	4,34 ± 0,00 ^{Bb}	4,44 ± 0,07 ^{Ac}	4,24 ± 0,03 ^{Bb}	4,33 ± 0,05 ^{Ac}	4,19 ± 0,03 ^{Bb}	4,30 ± 0,04 ^{Ac}	4,27 ± 0,03 ^{Aa}	0,0000	0,0000	0,0000
Ácido acético	1,73 ± 0,10 ^{Aa}	1,78 ± 0,04 ^{Aa}	1,72 ± 0,03 ^{Aa}	1,67 ± 0,03 ^{Aa}	1,72 ± 0,03 ^{Aa}	2,02 ± 0,38 ^{Bbc}	2,68 ± 0,93 ^{Ab}	2,10 ± 0,15 ^{Ac}	2,72 ± 0,70 ^{Ab}	1,85 ± 0,08 ^{Bab}	0,0006	0,0012	0,0200
Ácido propiónico	0,30 ± 0,02 ^{Aa}	0,29 ± 0,01 ^{Aac}	0,34 ± 0,02 ^{Ab}	0,30 ± 0,00 ^{Bab}	0,34 ± 0,01 ^{Ab}	0,30 ± 0,01 ^{Bb}	0,34 ± 0,03 ^{Ab}	0,30 ± 0,01 ^{Bb}	0,30 ± 0,03 ^{Aa}	0,28 ± 0,01 ^{Ac}	0,0028	0,0085	0,0000
Octan-1-ol	0,41 ± 0,00 ^{Aa}	0,41 ± 0,00 ^{Aab}	0,41 ± 0,01 ^{Aa}	0,41 ± 0,00 ^{Ab}	0,44 ± 0,00 ^{Ab}	0,41 ± 0,00 ^{Bb}	0,43 ± 0,03 ^{Ab}	0,40 ± 0,00 ^{Ba}	0,41 ± 0,00 ^{Aa}	0,41 ± 0,01 ^{Aab}	0,0004	0,2623	0,0000
Ácido butírico	0,31 ± 0,03 ^{Aa}	0,31 ± 0,01 ^{Aac}	0,32 ± 0,01 ^{Aa}	0,29 ± 0,00 ^{Bb}	0,46 ± 0,03 ^{Ab}	0,32 ± 0,01 ^{Bc}	0,44 ± 0,04 ^{Ab}	0,30 ± 0,00 ^{Bab}	0,31 ± 0,01 ^{Aa}	0,31 ± 0,02 ^{Aabc}	0,0000	0,0205	0,0000
Ácido heptanoico	2,31 ± 0,09 ^{Aab}	2,27 ± 0,01 ^{Aa}	2,26 ± 0,01 ^{Aa}	2,22 ± 0,01 ^{Bb}	2,36 ± 0,08 ^{Abc}	2,25 ± 0,01 ^{Bac}	2,40 ± 0,02 ^{Ac}	2,24 ± 0,03 ^{Bbc}	2,28 ± 0,05 ^{Aa}	2,25 ± 0,02 ^{Aac}	0,0020	0,0055	0,0000
Volátiles totales	38,4 ± 2,2 ^{Aa}	30,1 ± 1,70 ^{Ba}	40,2 ± 2,8 ^{Aa}	31,9 ± 2,0 ^{Bab}	39,1 ± 2,5 ^{Aa}	30,7 ± 1,8 ^{Ba}	40,7 ± 2,5 ^{Aa}	31,4 ± 1,9 ^{Bab}	38,3 ± 2,5 ^{Aa}	33,0 ± 1,9 ^{Bb}	0,1897	0,0535	0,0000

Nota: Los valores se expresan como la media ± SD (n = 3). Letras mayúsculas diferentes en la misma fila para cada mes indican diferencias significativas entre AOV de olivas frescas y congeladas (p < 0,05; LSD Fisher). Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencias significativas entre aceites de diferentes etapas de maduración (p < 0,05; LSD

Fisher). Se comparan los aceites de aceitunas frescas y congeladas por separado. Se presenta el valor-P de temperatura para la comparación entre olivas frescas y congeladas, y el valor-P entre los meses de maduración para ambas condiciones. Abreviaturas: O.frescas, Aceite de olivas frescas. O.cong, aceite de olivas congeladas.

A continuación, la Figura 17 presenta la evolución de los compuestos volátiles en los AOVE con el estado de maduración de las olivas frescas y congeladas.

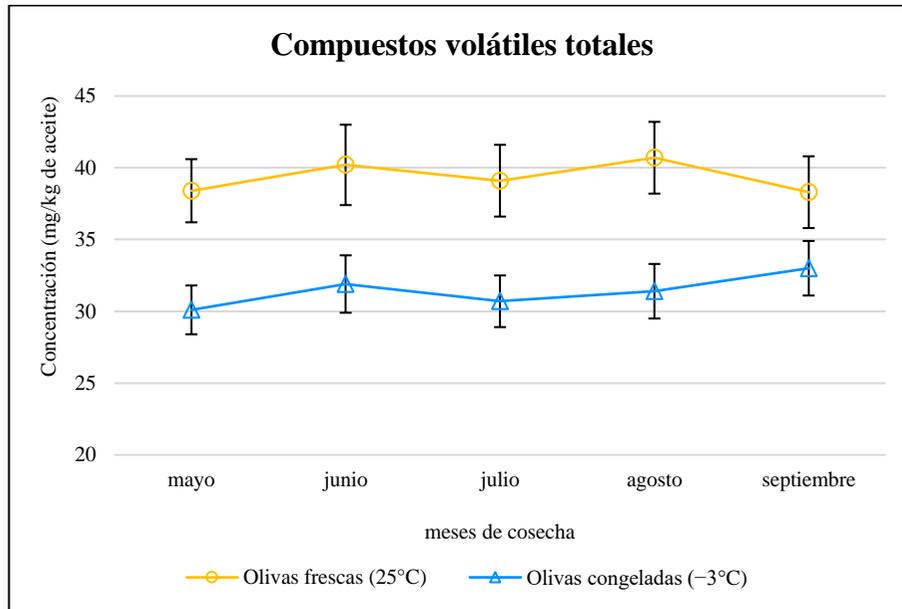


Figura 17. Variación de compuestos volátiles totales en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas, con la maduración de las olivas.

En la Figura 17 se observa que las concentraciones iniciales de compuestos volátiles en los AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas fueron de 38,4 y 30,1 mg/kg de aceite, respectivamente. Estos valores son inferiores a los informados por Caipo y cols., (2021). En la Tabla 6 y Figura 17 no se observan diferencias significativas ($p > 0,05$) en el contenido total de compuestos volátiles en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas durante maduración de los frutos. Sin embargo, se observaron diferencias

significativas ($p < 0,05$) en el contenido total de compuestos volátiles al comparar AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas.

Las enzimas LOX, HPL, ADH son responsables de la síntesis de los compuestos C6 (como se mencionó anteriormente), los cuales corresponden a la fracción mayoritaria del total de compuestos volátiles. Estas enzimas disminuyen su actividad a bajas temperaturas (García-Vico y cols., 2017), por lo tanto, la ralentización de las enzimas durante las fases de malaxación y molienda en el proceso de extracción de aceite de olivas congeladas explicaría que el contenido total de compuestos volátiles sea inferior, principalmente debido a que la actividad de LOX es un factor determinante en la síntesis de compuestos volátiles durante la etapa de molienda (Sánchez-Ortiz y cols., 2012).

En la Figura 18 se compara el cambio de los compuestos volátiles más abundantes en el AOVE entre cinco estados de maduración de olivas frescas y congeladas.

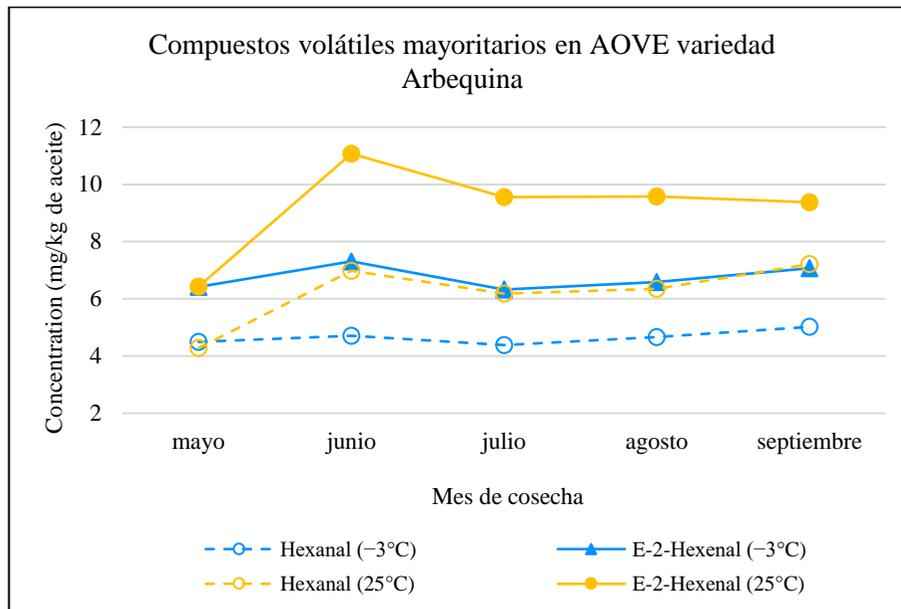


Figura 18. Efecto de la helada y la maduración sobre los compuestos volátiles mayoritarios presentes en AOVE.

De acuerdo con los resultados presentados en la Figura 18, se observa que los AOVEs estudiados muestran un mayor contenido de compuestos volátiles C6, tales como: (*E*)-2-hexenal, hexanal, hexanol y (*E*)-2-hexenol, siendo el (*E*)-2-hexenal el compuesto más abundante durante todos los meses de estudiados y en ambos tipos de aceites. Estos compuestos provienen de la ruta de la lipoxigenasa (como se mencionó anteriormente) y son los más importantes reportados en aceites de oliva virgen (Angerosa, 2002). Las concentraciones observadas para estos compuestos son mayores a las reportadas por Romero y cols., (2016), para aceites procedentes de olivas de variedades Arbequina, Arbosana y Koroneiki con grados de maduración entre de 2 a 6.

En la Figura 18 se observa durante los meses de cosecha un aumento en la concentración de aldehídos en AOVEs procedentes de olivas frescas, mostrando un aumento en la concentración de (*E*)-2-hexenal un 46% y de hexanal un 69%. En los aceites extraídos de olivas congeladas el aumento de ambos compuestos fue menor con un 10% y 12%, respectivamente. En la tabla 6 se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) en los compuestos volátiles C6 de los AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas. Esto se debería a que la baja temperatura durante la malaxación (como ya fue comentado), provocaría inactivación de la enzima LOX y un moderado decrecimiento en la actividad de HPL (García-Vico y cols., 2017). La LOX mantiene su actividad máxima entre los 20°C y 40°C (Ridolfi y cols., 2002).

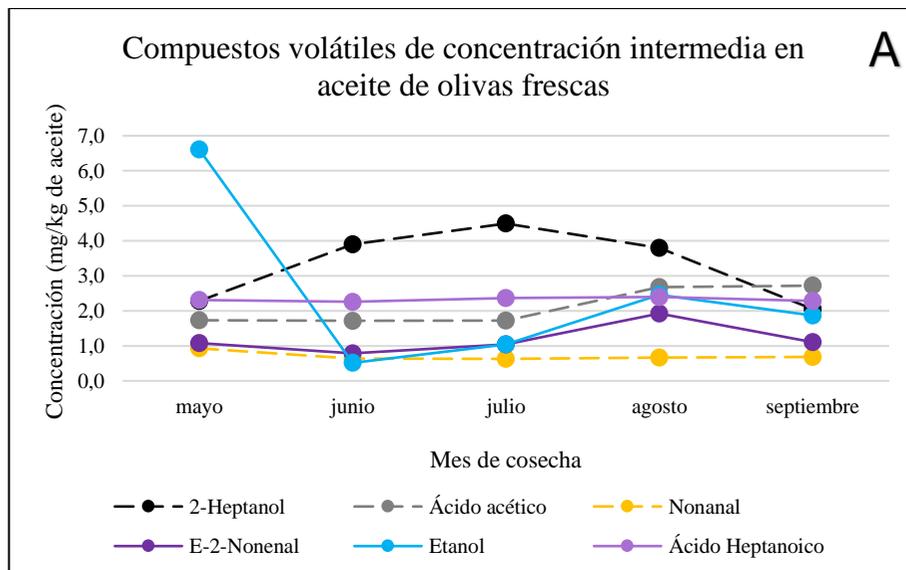
Los aldehídos alcanzan su valor máximo cuando la oliva cambia de verde a púrpura y luego decaen (Kalua y cols., 2007), por esta razón se observa un aumento de concentración hasta junio. La Tabla 6 muestra que contrario a lo que ocurre con los aldehídos, los compuestos alcohólicos disminuyen levemente con el estado de maduración. En los AOVEs procedentes de olivas frescas entre los meses de mayo y septiembre, se observó una disminución del hexanol un 17% y el (*E*)-2-hexenol un 12%, mientras que en AOVEs de olivas congeladas estos compuestos variaron levemente.

En la Tabla 6, se observa que los alcoholes fueron menos afectados por la temperatura que los aldehídos.

Los aceites analizados presentaron un característico aroma frutal similar a manzana verde, conferido principalmente por los compuestos volátiles mayoritarios mencionados, los cuales tienen umbrales de olor pequeños, especialmente el (*E*)-2-hexenal cuyo umbral es de 0,42 mg/kg de aceite y sus descriptores son: aroma verde, almendra amarga y frutal (Anexo 4).

Entre los compuestos volátiles mayoritarios no se encontraron compuestos característicos de la helada.

Los resultados de la variación de compuestos volátiles de concentración intermedia presentes en AOVEs extraídos de olivas frescas y congeladas durante el aumento de grado de maduración de los frutos, se presentan en la Figura 19.



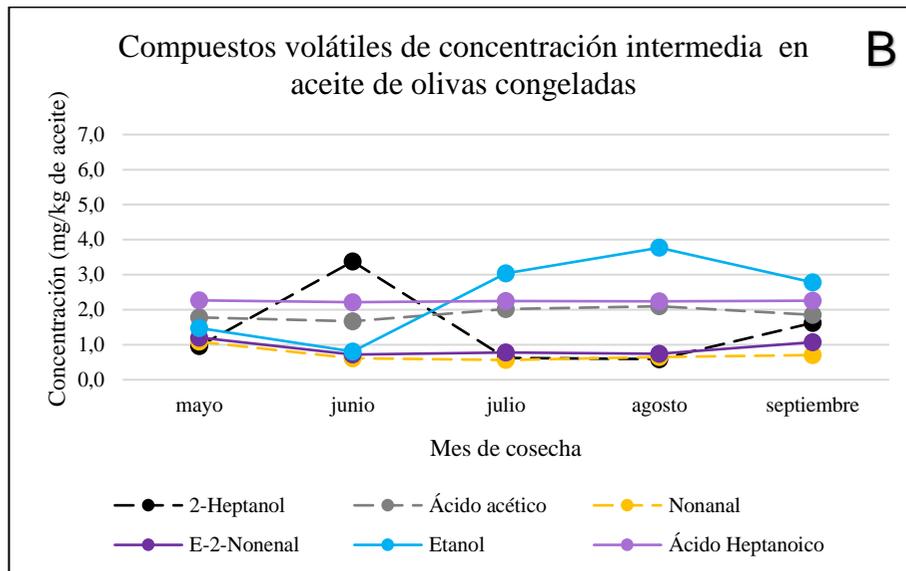


Figura 19. Variación de compuestos volátiles intermedios en AOVes procedentes de olivas frescas (A) y congeladas (B), con la maduración de las olivas. Los compuestos característicos de la helada se representan con una línea punteada.

En la Figura 19 se observa la presencia de tres compuestos característicos de la helada: 2-heptanol, ácido acético y nonanal, entre los compuestos volátiles de concentración intermedia. Los valores de 2-heptanol fueron mayores en AOVes de olivas frescas durante todos los meses, siendo su valor máximo 4,5 mg/kg de aceite en el mes de julio.

El (*E*)-2-nonenal y nonanal, son compuestos volátiles que dan cuenta del estado de rancidez del aceite. Estos compuestos se producen durante la autooxidación de los aceites, por la descomposición de los 9-hidroperóxidos de los ácidos linoleico y oleico, respectivamente. El (*E*)-2-nonenal fue señalado como un predictor de estados tempranos de oxidación (Caipo y cols., 2021) y el nonanal como un marcador de degradación oxidativa del aceite (Vichi y cols.,

2003). En la Figura 19 se observa que, en los aceites producidos por olivas frescas y congeladas, ambos compuestos presentan baja concentración (<2 ppm) aún en el estado de madurez más avanzado, indicando que los aceites no han sufrido procesos oxidativos importantes, como lo indican el índice de peróxidos y K232.

El ácido acético y heptanoico variaron levemente durante el proceso de maduración, obteniendo valores similares en aceites procedentes de olivas frescas y congeladas.

En la Tabla 6 se observa para el etanol que no hay diferencias significativas entre los AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas ($p>0,05$), sin embargo, los valores en los aceites procedentes de olivas congeladas son ligeramente mayores, posiblemente porque las condiciones de congelamiento (grado de humedad y temperatura) propiciaron el crecimiento de levaduras (Angerosa, 2002) que fermentaron los azúcares de la oliva.

Entre los compuestos volátiles característicos de la helada de baja concentración se destacan el (*E*)-2-heptenal y pentanal, ya que los demás compuestos tienen concentraciones inferiores a 0,1 ppm. La Figura 20, presenta la evolución de estos dos compuestos durante la maduración de las olivas.

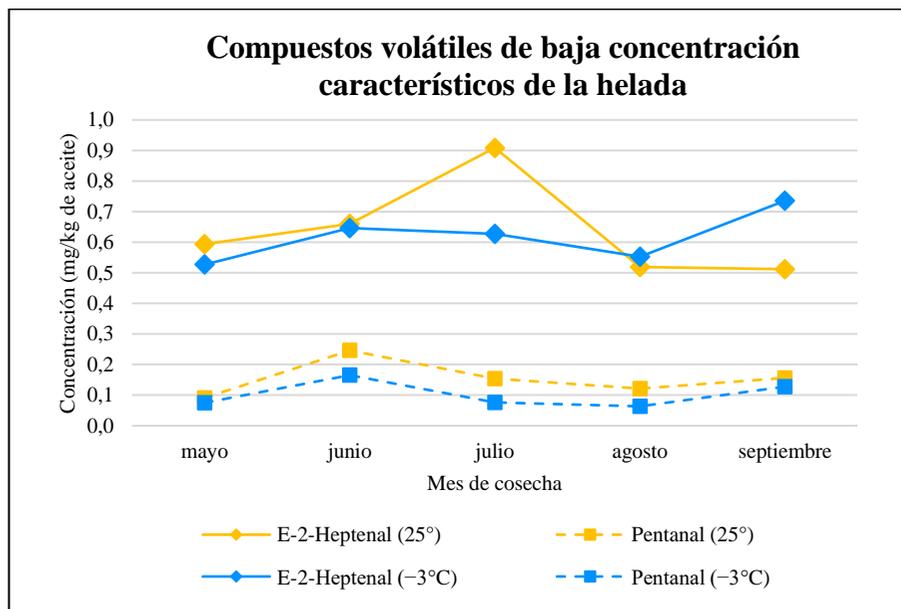


Figura 20. Variación de las concentraciones de (*E*)-2-heptenal y pentanal (valeraldehído) en AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas durante la maduración.

En los tres primeros meses de cosecha, el (*E*)-2-heptenal aumentó ligeramente su concentración. No se observaron diferencias significativas entre los AOVEs de olivas frescas y congeladas ($p > 0,05$), como lo indica la Tabla 6. Este compuesto volátil también está relacionado con los procesos oxidativos y a la percepción de rancidez (Angerosa y cols., 2004). Contrario a lo que ocurre con el (*E*)-2-heptenal, la concentración de pentanal si presenta diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los aceites procedentes de los olivas frescas y congeladas (Figura 20 y Tabla 6). En estos compuestos volátiles se observa que en la mayoría de los meses su contenido es superior en AOVEs procedentes de olivas frescas, a pesar de ser compuestos característicos de la helada.

Compuestos característicos de la helada como: (*E*)-2-heptenal, etil propionato, octanal, y etil-2-metilbutirato, se encontraron en concentraciones mucho menores a los reportados por Romero y cols., (2017), especialmente en el compuesto etil-2-metilbutirato, cuyo valor reportado es aproximadamente 8.000 veces mayor. En el estudio citado, extrajeron aceite de olivas afectadas por heladas en el árbol durante la cosecha, por lo tanto, el hecho que en el presente estudio las olivas hayan sido congeladas en condiciones menos adversas, podría explicar la diferencia entre los resultados.

En la Tabla 6 se observa que otros compuestos volátiles minoritarios (de concentración inferior a 0,4 ppm), tales como: 1-octanol, ácido butírico, ácido propiónico, 3-octanona, 3-metil-1-butanol, 2-metil-1-butanol, acetato de butilo y 4-metil-2-pentanona, presentaron poca variación entre los meses de cosecha y el tipo de oliva usada para la extracción de aceite.

5.4 Evaluación sensorial

Para cumplir con el segundo objetivo, finalmente se realizó un análisis sensorial a los AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas de los meses de mayo, julio y septiembre.

La Tabla 7 muestra los resultados obtenidos de la cata de aceites de oliva realizado por un panel entrenado.

Tabla 7. Análisis sensorial de AOVEs procedentes de Arbequinas frescas y congeladas, en diferentes estados de maduración.

Muestras cosecha 2020			Intensidad						Defecto principal	
Mes de cosecha	Condición de la oliva	categoría	Frutado	CV (%)	Amargo	CV (%)	Picante	CV (%)	Helada	CV(%)
mayo	AMBIENTE	VE	3,6	9,8	3,7	11,5	3,9	5	0	0
mayo	FRIO	V	3,5	6,9	2,6	26,7	3,4	12	1,2	41,9*
julio	AMBIENTE	VE	3,1	7	2,2	14,6	3,3	6,1	0	0
julio	FRIO	VE	2,8	16,7	1,5	27,6	1,9	24,6	0	0
septiembre	AMBIENTE	VE	2,0	17,4	1,0	37,4	1,5	23,6	0	0
septiembre	FRIO	VE	2,8	10,4	1,0	29,4	1,3	34,7	0	0

Los valores informados corresponden a la media (Me) de las respuestas sensoriales de los atributos. El criterio de aceptación corresponde a los valores de CV menos al 20%.

VE: categoría aceite de oliva VIRGEN EXTRA, indica que la mediana de los defectos es 0,0 y la mediana del atributo frutado está por encima de 0,0

V: categoría aceite de oliva VIRGEN, indica que la mediana de los defectos es superior a 0,0 pero no superior a 3,5 y la mediana del atributo frutado es superior a 0,0

* Valor superior al criterio de aceptación, sin embargo, se informa, ya que lo que se está analizando es si se presenta o no defecto, aun cuando el panel no logra llegar a un consenso de intensidad de este.

En general las muestras de aceite de oliva analizados por el Panel de Cata de la UTEM fueron descritas como aceites delicados (Me frutado $\leq 3,0$) y suaves (Me amargo y picante $\leq 2,0$). A excepción del tratamiento con fecha de cosecha más temprana (mayo) el cual se caracterizó según los resultados presentados, como un aceite medio (atributos sobre intensidad 3) relacionado con un frutado verde aportando sensaciones olfativas propias del aceite que recuerda a la fruta sana y en una condición de cosecha más temprana. Sin embargo, la muestra de aceite procedente de olivas congeladas de la cosecha del mes de mayo, si bien en cuanto a sus atributos se describe como un aceite medio, este presenta un defecto perceptible por el grupo entrenado, asociado al flavor característico de los aceites extraídos de aceitunas que han sido dañadas por las heladas

mientras estaban en el árbol, por lo tanto, se clasificó como AOV según la Norma COI (Anexo 1).

Adicionalmente, las muestras fueron presentadas a los panelistas bajo la “prueba de comparación por parejas”, para determinar si existe una diferencia sensorial perceptible o una similitud entre las muestras de dos productos en lo que se refiere a la intensidad de un atributo o defecto sensorial en este caso. Bajo este criterio, del conjunto de pares estudiados en forma integral, presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los aceites procedentes de olivas frescas y congeladas en los meses de mayo y septiembre. Por lo que según la prueba aplicada estos tratamientos fueron determinados por los panelistas como muestras diferentes.

Se observa en la Tabla 7 una disminución en la mediana de la respuesta de los atributos sensoriales “Amargo” y “Picante” con el tiempo de cosecha, puesto que están relacionados a la presencia de los fenoles oleuropeína y ligustrósido, respectivamente. Esta disminución se explica con el descenso de estos compuestos fenólicos durante la maduración. A diferencia de los descriptores mencionados, al estar asociado a los compuestos volátiles, los valores de la mediana de la respuesta del descriptor “Frutado” disminuyen lentamente, ya que como se mencionó anteriormente, el (*E*)-2-hexenal (umbral es de 0,42 mg/kg de aceite) es el compuesto volátil mayoritario, y le otorga al aceite notas frutales y a manzana verde (Anexo 4). Este compuesto y los demás

volátiles C6 permanecieron altos en el estado más tardío de maduración y sus concentraciones en AOVEs de olivas congeladas fueron menores.

5.5 Caracterización Multivariante de las muestras

Para conocer las correlaciones presentes entre las variables estudiadas, se construyó un modelo de análisis de componentes principales (PCA) con 42 variables (parámetros de calidad y compuestos químicos presentes en los AOV).

La técnica del PCA se utiliza cuando el conjunto de datos multivariados analizados es muy grande y altamente correlacionado, de esta manera se reduce su dimensionalidad, es decir, proporciona los medios para resumir los datos y extraer información sobre las diferencias individuales (Kherif y Latypova, 2020).

La Figura 21 muestra las puntuaciones y los diagramas de carga para F1 y F2.

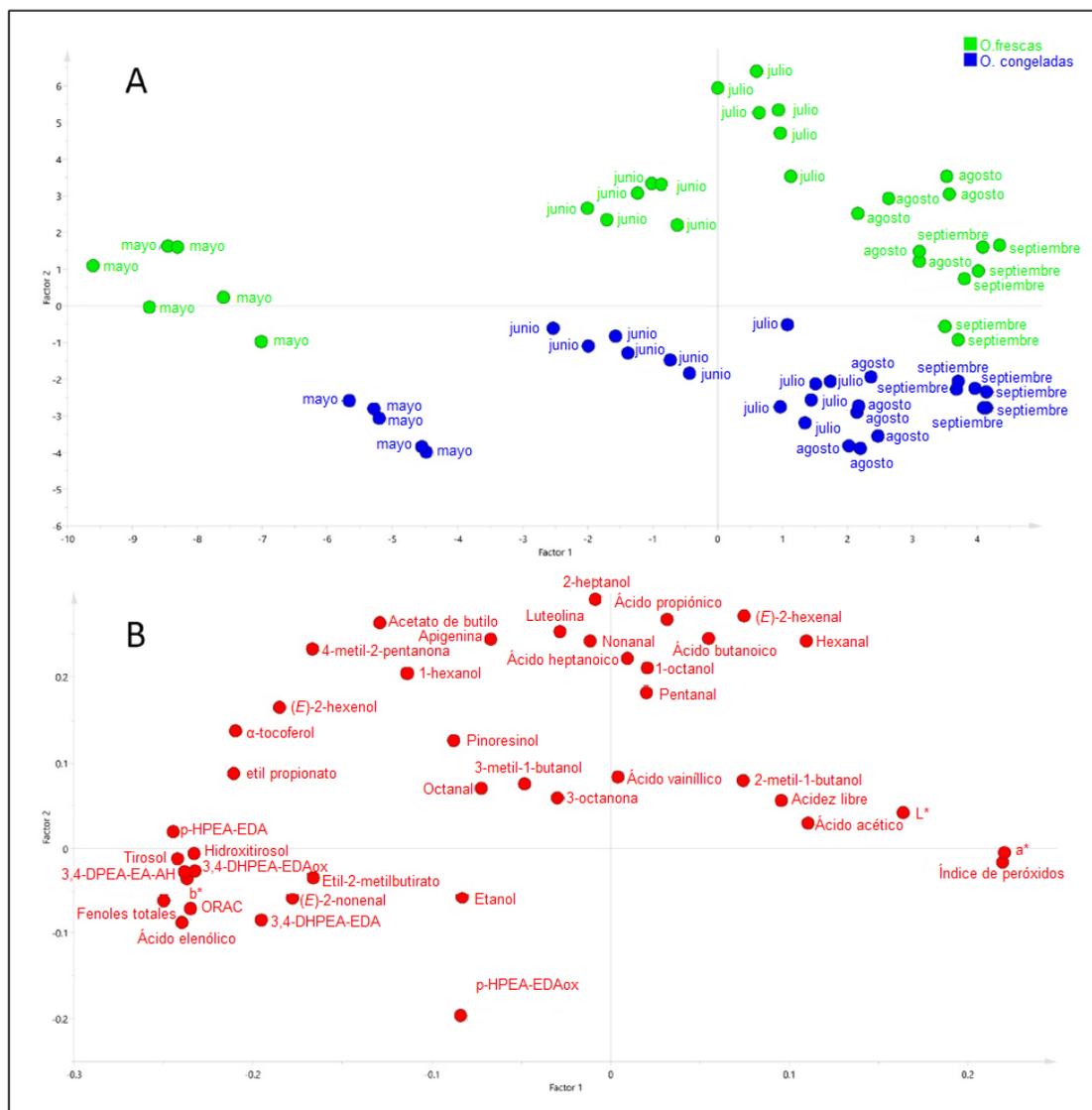


Figura 21. Resultados del análisis de componentes principales (PCA). Se muestran las puntuaciones (A) y los gráficos de carga (B), y los aceites de oliva vírgenes extraídos de olivas frescas en color verde y congeladas en color azul

Los resultados apuntaron a que el 80,2% de la varianza total fue explicada con 5 factores teniendo una varianza de 35,2% (F1), 19,1% (F2), 12,9% (F3), 7,03% (F4) y 5,9% (F5). En la Figura 21 se muestra las puntuaciones y los diagramas de carga para F1 y F2. En las puntuaciones (A) se observa en el factor

2 una separación en los aceites procedentes de olivas frescas y congeladas. Al superponer los hiperplanos A y B, se puede ver la relación que existe entre las variables. Los aceites de olivas frescas están relacionados directamente con las variables de los cuadrantes superiores. Al comparar las puntuaciones y gráfico de carga, es posible observar la influencia de los compuestos fenólicos en los aceites procedentes de olivas frescas en el mes de mayo, cuando la maduración es temprana y la influencia de los compuestos volátiles en el mes de julio. En el estado más avanzado de maduración, el índice de peróxidos es el factor que más contribuye.

Teniendo en cuenta las diferencias en las características de composición y calidad entre los aceites de olivas frescas y congeladas durante la maduración, se aplicó el análisis de discriminación de mínimos cuadrados parciales (*Partial Least Squares Discriminant Analysis* o PLS-DA). La Figura 22 muestra los resultados de este análisis. El modelo PLS-DA retuvo 4 factores, explicando el 94,4% (R^2Y) de la varianza (discriminación entre los dos grupos) y una validez/reproducibilidad del 90,1% (Q^2). Este modelo establece una correlación entre un bloque X de variables independientes y un bloque Y de variables dependientes. Los datos X e Y se descomponen concomitantemente con el objetivo de explicar la mayor parte de la varianza en ambos bloques y, al mismo tiempo, maximizar la discriminación entre clases (Kubota y cols., 2022).

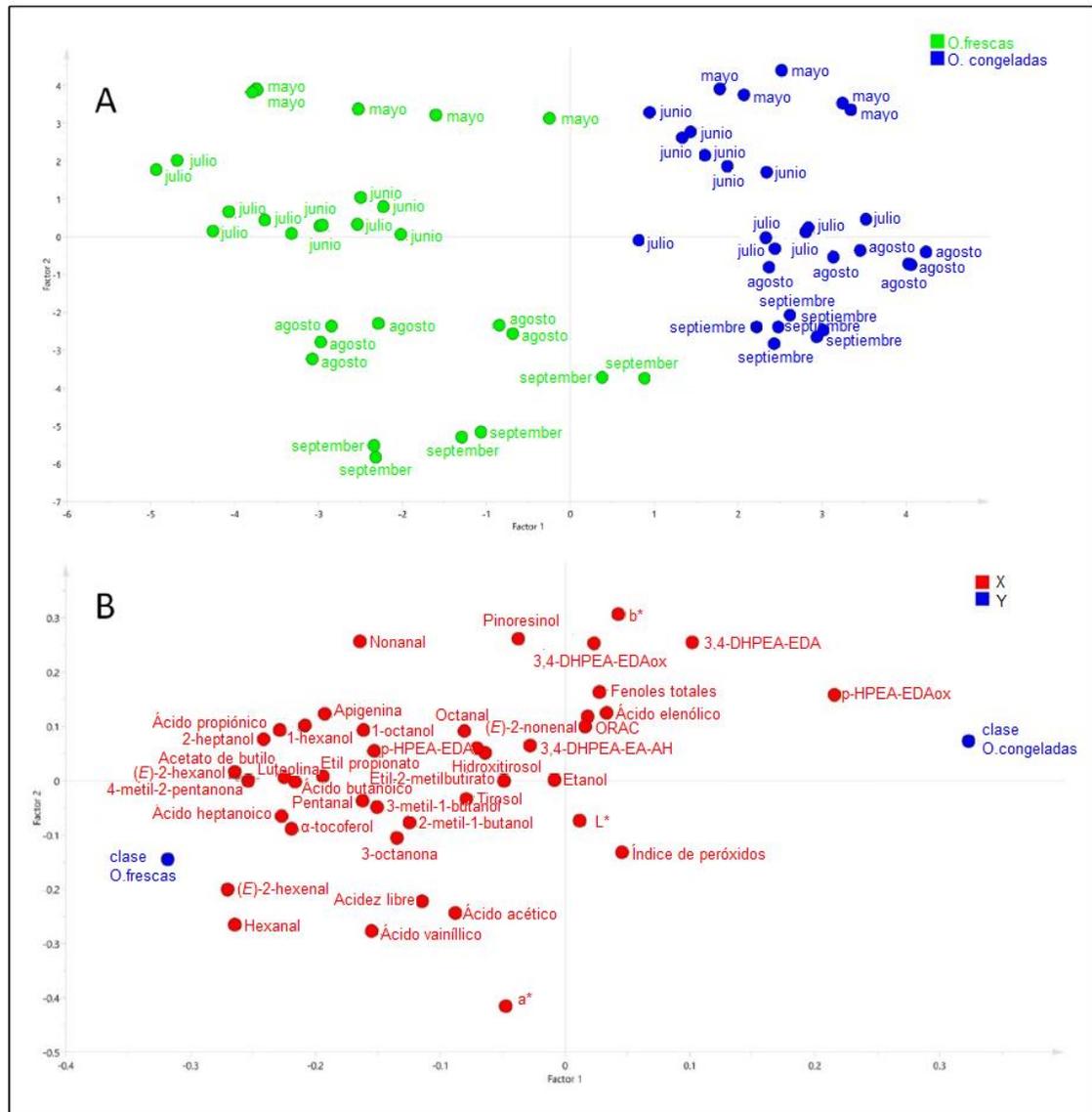


Figura 22. Resultados del análisis de discriminación de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) realizado sobre las variables seleccionadas para clasificar los AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas (A) y el gráfico de cargas correspondiente (B).

En el PLS-DA (Figura 22.A) se observa en el factor 1 una separación clara entre los grupos según el tipo de oliva usada para la extracción del aceite (fresca y congelada). También permitió observar una evolución durante la maduración mediante el factor 2. En el diagrama de carga de la Figura 22.B, mostró también

la contribución de los compuestos fenólicos y volátiles en los aceites procedentes de olivas frescas, pero su relación con la maduración no fue tan clara como en el caso del PCA (Figura 21). También se observó que junto al índice de peróxidos el compuesto fenólico 3,4-DHPEA-EDA tiene influencia clara en los AOVEs procedentes de olivas congeladas.

5.6 Comportamiento de la glucosa durante la maduración

Para cumplir con el último objetivo, se realizó una determinación de azúcares presentes en la pulpa de las olivas, pero debido a la complejidad de la matriz alimentaria, solo se logró identificar glucosa.

Los azúcares son los principales componentes solubles en el tejido de las olivas y su rol es proveer energía para los cambios metabólicos y como fuente de átomos de carbono para la biosíntesis de otros compuestos (Marsilio y cols., 2001). En la Figura 23 se presenta el comportamiento de la glucosa frente a la maduración de las olivas.

En las olivas variedad Arbequina estudiadas se encontró aproximadamente un 0,85% de glucosa (en b.s) en la pulpa. La Figura 23 muestra descenso en la concentración de glucosa durante los cinco meses de cosecha. La disminución de glucosa se debe a que es metabolizada a acetil-CoA para luego entrar en el proceso de síntesis de ácidos grasos (Marsilio y cols., 2001).

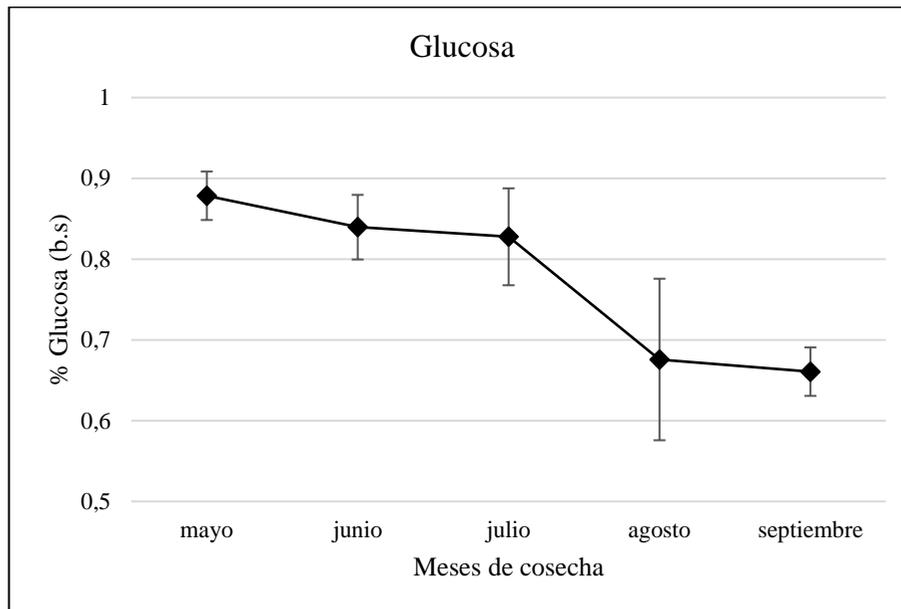


Figura 23. Comportamiento del contenido de glucosa en pasta de olivas variedad Arbequina durante la maduración.

La disminución de glucosa es leve durante los tres primeros meses, lo cual podría deberse a la etapa temprana de madurez (envero, como muestra la Tabla 1), posteriormente, el desarrollo del fruto continúa con la etapa de expansión celular y desarrollo del mesocarpio, donde se produce una ganancia de peso producto de la acumulación intensa de aceite. En este periodo las olivas comienzan a perder compuestos fenólicos y azúcares (Conde y cols., 2008).

En la Figura 24 se presenta el porcentaje de aceite en olivas variedad Arbequina durante la maduración. Este resultado está expresado en base seca (b.s) y los datos fueron proporcionados por el INIA.

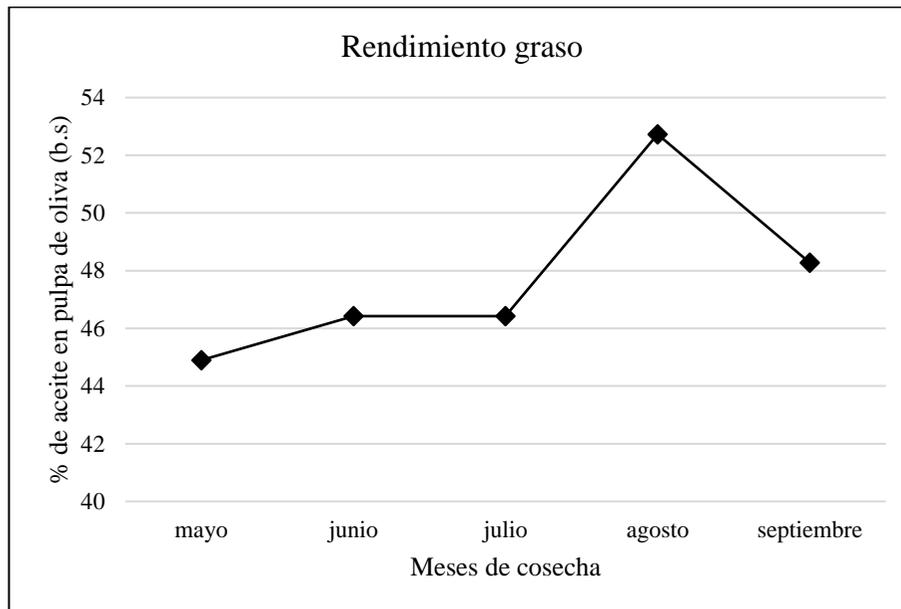


Figura 24. Acumulación de aceite en la oliva durante el proceso de maduración.

En la Figura 24 se observó que a medida que avanza el estado de maduración de las olivas el rendimiento graso se incrementa. El valor máximo se obtuvo en agosto con un valor de 53% de aceite es b.s.

Se realizó una comparación entre la cantidad de aceite y glucosa presentes en la pulpa de oliva para ver si estos dos factores se correlacionan, los resultados se muestran en la Figura 25, para un total de 9 mediciones.

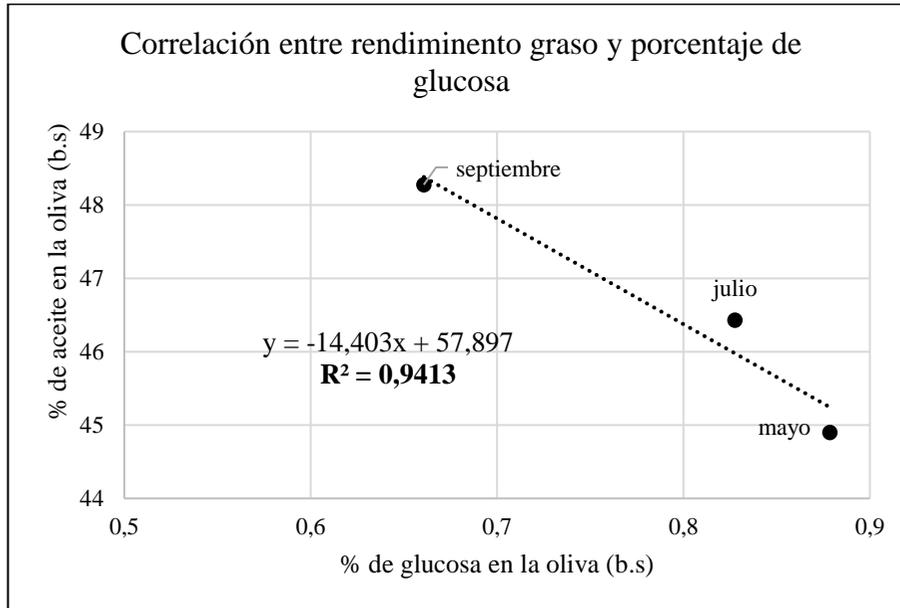


Figura 25. Relación entre la glucosa (%) y el rendimiento graso (%), entre los meses de mayo, julio y septiembre.

En la Figura 25, se observa que existe una correlación negativa entre el decaimiento en la cantidad de glucosa y en el incremento en el contenido de aceite en las olivas durante el proceso de maduración. Esta correlación se explica considerando que los azúcares son precursores en la biosíntesis de ácidos grasos (Brescia y cols., 2007).

VI. CONCLUSIONES

1. Las muestras analizadas de aceites procedentes de olivas frescas y congeladas presentaron valores menores en los parámetros de calidad a los exigidos por la Norma COI/T.15/NC No 3 (2022), por lo tanto, se clasificaron como AOVE. Se observó que el aceite extraído de olivas congeladas es de calidad similar al aceite producido por olivas frescas debido a que los parámetros de congelación no fueron agresivos (-3°C por 12 horas). El análisis sensorial mostró diferencias entre los aceites de olivas frescas y congeladas.
2. La maduración y condiciones suaves de congelación tuvieron efectos claros sobre los tocoferoles y compuestos fenólicos, afectando principalmente a los secoiridoides derivados de la oleuropeína, los cuales mostraron mayor concentración en los aceites procedentes de olivas congeladas.
3. Se observó que la congelación de las olivas redujo el contenido de compuestos volátiles presentes en el aceite; pero no se observaron diferencias significativas ($p>0,05$) con el avance del estado de maduración en los AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas. No se observaron diferencias significativas en los compuestos característicos de la helada al comparar ambos tipos de aceites.
4. Los análisis PCA y PLS-DA mostraron una distinción clara entre AOVEs de olivas frescas y congeladas, lo cual indica que la congelación afecta

las reacciones bioquímicas que se producen en las olivas. También se observaron diferencias entre los estados de maduración. Por lo tanto, se corrobora lo planteado en la hipótesis.

5. Se concluye que las heladas y la maduración son factores importantes para considerar durante el cultivo y la cosecha, ya que aún una temperatura de congelación suave de -3°C en la oliva, mostró tener efectos sobre los parámetros estudiados.
6. Finalmente, se cuantificó la cantidad de glucosa en la pulpa de la oliva y se encontró una correlación negativa con el rendimiento de aceite durante el proceso de maduración del fruto.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Albin, A. y Villamil, J. (2003). Historia y Distribucion del Cultivo, Propiedades, Clasificación Y Principales consumidores Del Aceite de oliva. *Inia*, 25-28.
- American Oil Chemists' Society. (2009). AOCS Official Method Ca 5a-40: Free Fatty Acids. AOCS.
- American Oil Chemists' Society. (1996). AOCS Official Method Cd 8-53: Peroxide Value Acetic Acid (Chloroform Method).
- American Oil Chemists' Society (1991). AOCS Official Method Ch 5–91: Determination of Specific Extinction of Oils and Fats, Ultraviolet Absorption.
- Angerosa, F. (2002). Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 639-660.
- Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C. y Vito, R. (2001). Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chemistry*, 72(1), 19-28. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00194-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00194-1)
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S. y Montedoro, G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: Occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 17-31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.093>
- Ballus, C. A., Meinhart, A. D., De Souza Campos, F. A. y Godoy, H. T. (2015). Total phenolics of virgin olive oils highly correlate with the hydrogen atom transfer mechanism of antioxidant capacity. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(6), 843-851. <https://doi.org/10.1007/s11746-015-2629-0>
- Barjol, J. L. (2013). Handbook of Olive Oil. En Ramón Aparicio & J. Harwood (Eds.), *Handbook of Olive Oil*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5371-4>
- Beltrán, G., Aguilera, M. P., Rio, C. Del, Sanchez, S. y Martinez, L. (2005). Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chemistry*, 89(2), 207-215. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.02.027>
- Beltrán, G., Uceda, M., Hermoso, M. y Frías, L. (2008). Maduración. En D. Barranco, R. Fernández-Escobar, & L. Rallo (Eds.), *El cultivo del olivo* (6ta ed., pp. 163-188).
- Brescia, M. A., Pugliese, T., Hardy, E. y Sacco, A. (2007). Compositional and structural investigations of ripening of table olives, Bella della Daunia, by means of traditional and magnetic resonance imaging analyses. *Food Chemistry*, 105(1), 400–404.
- Caipo, L., Sandoval, A., Sepúlveda, B., Fuentes, E., Valenzuela, R., Metherel, A. H. y Romero, N. (2021). Effect of Storage Conditions on the Quality of Arbequina Extra Virgin Olive Oil and the Impact on the Composition of Flavor-Related Compounds (Phenols and Volatiles). *Foods*, 10(9), 2161. <https://doi.org/10.3390/foods10092161>
- Camacho, M.-L., Morales, M. y Aparicio, R. (2013). Chromatographic Methodologies:

Compounds for Olive Oil Traceability Issues. En R. Aparicio-Ruiz & J. L. Harwood (Eds.), *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties* (pp. 164–213).

- Cano Marchal, P., Gómez Ortega, J., Aguilera Puerto, D. y Gámez García, J. (2011). Situación actual y perspectivas futuras del control del proceso de elaboración del aceite de oliva virgín. *RIAI - Revista Iberoamericana de Automática e Informática Industrial*, 8(3), 258-269. <https://doi.org/10.1016/j.riai.2011.06.013>.
- Cayuela, J. A. y García, J. F. (2017). Sorting olive oil based on alpha-tocopherol and total tocopherol content using near-infra-red spectroscopy (NIRS) analysis. *Journal of Food Engineering*, 202, 79-88. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.01.015>.
- Chile Oliva. (2019). *El olivo en Chile*. Asociación de Productores de Aceite de Oliva. <http://www.chileoliva.cl/es/origen-chile/#tabOlivoChile>.
- Chile Oliva. (2020). *Proceso Productivo*. <http://www.chileoliva.cl/es/aceite-de-oliva-chileno/#tabProcesoProductivo>.
- Cicero, A. F. G., Nascetti, S., Nyssönen, K., Gaddi, A. V., López-Sabater, M. C., Elosua, R., Covas, M. I., Salonen, J. T., Kaikkonen, J., Mursu, J., de la Torre, K., Poulsen, H. E., Zunft, H. J. F., Koenbick, C., Kiesewetter, H. y Baumler, H. (2008). Changes in LDL fatty acid composition as a response to olive oil treatment are inversely related to lipid oxidative damage: The EUROLIVE study. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(2), 314-320. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719705>.
- Conde, C., Delrot, S. y Gerós, H. (2008). Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, 165(15), 1545-1562. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.04.018>.
- Consejo Oleíco Internacional (COI). (2009). Determinación de los biofenoles de los aceites de oliva mediante HPLC. *COI/T.20/Doc.nº29*, 1-8. www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/4142-met29esp%0A%0A.
- Consejo Oleícola Internacional. (2013). *NORMA COMERCIAL APLICABLE A LOS ACEITES DE OLIVA Y LOS ACEITES DE ORUJO DE OLIVA (COI/T.15/NC nº 3/Rev. 7)*. <http://www.internationaloliveoil.org/>.
- Covas, M. I., De La Torre, K., Farré-Albaladejo, M., Kaikkonen, J., Fitó, M., López-Sabater, C., Pujadas-Bastardes, M. A., Joglar, J., Weinbrenner, T., Lamuela-Raventós, R. M. y De La Torre, R. (2006). Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 40(4), 608-616. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2005.09.027>.
- De la Rosa, L. A., Moreno-Escamilla, J. O., Rodrigo-García, J. y Alvarez-Parrilla, E. (2018). Phenolic compounds. En *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813278-4.00012-9>.
- De La Torre-Carbot, K., Chávez-Servín, J. L., Jaúregui, O., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., Nurmi, T., Poulsen, H. E., Gaddi, A. V., Kaikkonen, J., Zunft, H. F.,

- Kiesewetter, H., Fitó, M., Covas, M. I. y López-Sabater, M. C. (2010). Elevated circulating LDL phenol levels in men who consumed virgin rather than refined olive oil are associated with less oxidation of plasma LDL. *Journal of Nutrition*, 140(3), 501-508. <https://doi.org/10.3945/jn.109.112912>.
- Di Giovacchino, L. (2013). Technological Aspects. En J. L. Harwood & R. Aparicio-Ruiz (Eds.), *Handbook of Olive Oil* (2da ed., pp. 57-96). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8_3.
 - Durán, L. y Calvo, C. (2009). Optical Properties in Foods. En G. V. Barbosa-Canovas & P. Juliano (Eds.), *Food Engineering* (Volumen I, pp. 120-142).
 - EFSA Panel on Dietetic Products. (2011). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639), mainte. *EFSA Journal*, 9(4), 1-25. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2011.2033>.
 - El-Abassy, R. M., Donfack, P. y Materny, A. (2009). Rapid determination of free fatty acid in extra virgin olive oil by raman spectroscopy and multivariate analysis. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 86(6), 507-511. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1389-0>.
 - El Riachy, M., Priego-Capote, F., León, L., Rallo, L. y Luque de Castro, M. D. (2011). Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 2: Biosynthesis and biotransformation of phenolic compounds in virgin olive oil as affected by agronomic and processing factors. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(6), 692-707. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201100096>.
 - Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, L., Roca, M. y Aparicio-Ruiz, R. (2013). Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Color Issues. En Ramón Aparicio & J. Harwood (Eds.), *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties* (2.^a ed., pp. 220-254).
 - Gandul, B. y Mínguez-Mosquera, M. I. (1996). Chlorophyllase activity in olive fruits and its relationship with the loss of chlorophyll pigments in the fruits and oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72(3), 291-294. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199611\)72:3<291::AID-JSFA654>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199611)72:3<291::AID-JSFA654>3.0.CO;2-O).
 - García-Vico, L., García-Rodríguez, R., Sanz, C. y Pérez, A. G. (2017). Biochemical aspects of olive freezing-damage: Impact on the phenolic and volatile profiles of virgin olive oil. *LWT - Food Science and Technology*, 86, 240-246. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.07.052>.
 - García, J. M., Sella, S. y Pérez-Camino, M. C. (1996). Influence of Fruit Ripening on Olive Oil Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(11), 3516-3520.
 - García Sánchez, J. L., Molina Grima, E., García Camacho, F., Sánchez Pérez, J. a y López Alonso, D. (2001). Elaboración del aceite de oliva virgen mediante sistema

continuo en dos fases. Influencia de diferentes variables del proceso en algunos parámetros relacionados con la calidad del aceite. *Grasas Y Aceites*, LIX(c), 121-129. <https://doi.org/10.3989/egeogr.2001.i245.267>.

- Guillaume, C., Ravetti, L. y Gwyn, S. (2010). Characterisation of Phenolic Compounds in Oils Produced from Frosted Olives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87(3), 247-254. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1494-0>.
- Gutierrez-Rosales, F., Romero, M. P., Casanovas, M., Motilva, M. J. y Mínguez-Mosquera, M. I. (2010). Metabolites involved in oleuropein accumulation and degradation in fruits of *Olea europaea* L.: Hojiblanca and Arbequina varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(24), 12924-12933. <https://doi.org/10.1021/jf103083u>.
- International Olive Council. (2022). Trade standard applying to olive oils and olive pomace oils. *International Olive Council*, 15(3), 1-17.
- ISO, E. 11664-4: 2011. Colorimetry. Part, 4.
- Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Bishop, A. G., Prenzler, P. D. y Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, 100(1), 273-286. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.059>.
- Kherif, F. y Latypova, A. (2020). Principal component analysis. En *Machine Learning* (pp. 209-225). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815739-8.00012-2>
- Krieger-Liszky, A. y Trebst, A. (2006). Tocopherol is the scavenger of singlet oxygen produced by the triplet states of chlorophyll in the PSII reaction centre. *Journal of experimental botany*, 57(8), 1677-1684. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri002>
- Kubota, L. T., da Silva, J. A. F., Sena, M. M. y Alves, W. A. (2022). *Tools and Trends in Bioanalytical Chemistry* (W. A. Alves (ed.)). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-82381-8>
- López, N. L., Acevedo, R. L. y Carrasco, C. A. (2008). Evaluación sensorial y analítica de la calidad de aceite de oliva extravirgen. *Idesia*, 26(2), 27-44. <https://doi.org/10.4067/s0718-342920080002000054>
- Luchabeche Vera, P. (2020). Definiciones. En R. Bravo, J. Quintana, & M. Reyes (Eds.), *Heladas. Factores, tendencias y efectos en frutales y vides* (pp. 9–19). Dirección Meteorológica de Chile.
- Mancuso, S. (2000). Electrical resistance changes during exposure to low temperature measure chilling and freezing tolerance in olive tree (*Olea europaea* L.) plants. *Plant, Cell and Environment*, 23(3), 291–299.
- Marsilio, V., Campestre, C., Lanza, B. y De Angelis, M. (2001). Sugar and polyol compositions of some European olive fruit varieties (*Olea europaea* L.) suitable for table

olive purposes. *Food Chemistry*, 72(4), 485-490. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00268-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00268-5).

- Masella, P., Guerrini, L., Angeloni, G., Spadi, A., Baldi, F. y Parenti, A. (2019). Freezing/storing olives, consequences for extra virgin olive oil quality. *International Journal of Refrigeration*, 106, 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.ijrefrig.2019.06.035>.
- Mateos, R., Espartero, J. L., Trujillo, M., Ríos, J. J., León-Camacho, M., Alcudia, F., & Cert, A. (2001). Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(5), 2185-2192.
- Mele, M. A., Islam, M. Z., Kang, H. M. y Giuffrè, A. M. (2018). Pre-and post-harvest factors and their impact on oil composition and quality of olive fruit. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 30(7), 592-603. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2018.v30.i7.1742>
- Minguéz-Mosquera, M. I., Gandul-Rojas, B., Garrido-Fernandez, J. y Gallardo-Guerrero, L. (1990). Pigments present in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 67(3), 192-196. <https://doi.org/10.1007/BF02539624>.
- Morales, M. y Przybylski, R. (2013). Olive Oil Oxidation. En R. Aparicio-Ruiz & J. L. Harwood (Eds.), *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties* (2.^a ed., pp. 480-505).
- Morales, M.T., Luna, G. y Aparicio, R. (2005). Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chemistry*, 91(2), 293-301. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.06.011>
- Morales, Maria T., Aparicio-Ruiz, R. y Aparicio, R. (2013). Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Odor Issues. En *Handbook of Olive Oil* (pp. 261-309). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8_8.
- Morelló, J.-R., Motilva, M.-J., Ramo, T. y Romero, M.-P. (2003). Effect of freeze injuries in olive fruit on virgin olive oil composition. *Food Chemistry*, 81(4), 547-553. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(02\)00488-0](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(02)00488-0)
- Morelló, J. R., Vuorela, S., Romero, M. P., Motilva, M. J. y Heinonen, M. (2005). Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenolic compounds of the arbequina cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 2002-2008. <https://doi.org/10.1021/jf048386a>
- National Center for Biotechnology Information. (2022). *PubChem Substance Record for SID 348292353, Oleacein, Source: Human Metabolome Database (HMDB)*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/348292353>.
- Navajas-Porras, B., Pérez-Burillo, S., Morales-Pérez, J., Rufián-Henares, J. A. y Pastoriza, S. (2020). Relationship of quality parameters, antioxidant capacity and total phenolic content of EVOO with ripening state and olive variety. *Food chemistry*,

325(April), 126926. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126926>

- Ou, B., Hampsch- Woodill, M. y Prior, R. L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *J. Agric. Food Chem.*, 4619-4626. <https://doi.org/10.1051/jp2:1995126>
- Peres, F., Martins, L. L., Mourato, M., Vitorino, C. y Ferreira-Dias, S. (2016). Bioactive Compounds of Portuguese Virgin Olive Oils Discriminate Cultivar and Ripening Stage. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(8), 1137-1147. <https://doi.org/10.1007/s11746-016-2848-z>
- Perona, J. S., Cabello-Moruno, R. y Ruiz-Gutierrez, V. (2006). The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 17(7), 429-445. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.11.007>
- Petrakis, C. (2006). Olive Oil Extraction. En *Olive Oil: Chemistry and Technology: Second Edition* (Second Edi). AOCS Press. <https://doi.org/10.1016/B978-1-893997-88-2.50013-4>
- Poerio, A., Bendini, A., Cerretani, L., Bonoli-Carbognin, M. y Lercker, G. (2008). Effect of olive fruit freezing on oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(4), 368-372. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200700216>
- Psomiadou, E. y Tsimidou, M. (2002). Stability of virgin olive oil. 1. Autoxidation studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 716-721. <https://doi.org/10.1021/jf0108462>.
- Rallo, L., Díez, C. M., Morales-Sillero, A., Miho, H., Priego-Capote, F. y Rallo, P. (2018). Quality of olives: A focus on agricultural preharvest factors. *Scientia Horticulturae*, 233(December 2017), 491-509. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.034>.
- Ramos-Escudero, F., Morales, M. T. y Asuero, A. G. (2015). Characterization of bioactive compounds from monovarietal virgin olive oils: Relationship between phenolic compounds-antioxidant capacities. *International Journal of Food Properties*, 18(2), 348-358. <https://doi.org/10.1080/10942912.2013.809542>.
- Ridolfi, M., Terenziani, S., Patumi, M. y Fontanazza, G. (2002). Characterization of the lipoxygenases in some olive cultivars and determination of their role in volatile compounds formation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(4), 835-839.
- Romero-Segura, C., García-Rodríguez, R., Sánchez-Ortiz, A., Sanz, C. y Pérez, A. G. (2012). The role of olive β -glucosidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Research International*, 45(1), 191-196. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.024>.
- Romero, I., Aparicio-Ruiz, R., Oliver-Pozo, C., Aparicio, R. y García-González, D. L. (2016). Characterization of Virgin Olive Oils with Two Kinds of «Frostbitten Olives»

Sensory Defect. *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(27), 5590-5597. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02464>

- Romero, I., García-González, D. L., Aparicio-Ruiz, R. y Morales, M. T. (2017). Study of Volatile Compounds of Virgin Olive Oils with «Frostbitten Olives» Sensory Defect. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(21), 4314-4320. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00712>.
- Romero, M. P. y Motilva, M. J. (2010). Effect of Climatic Conditions on Quality of Virgin Olive Oil. En *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (Número 2001). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374420-3.00005-X>
- Salas, J. J., Harwood, J. L. y Martínez-Force, E. (2000). Lipid Metabolism in Olive: Biosynthesis of Triacylglycerols and Aroma Components. En R Aparicio & J. L. Harwood (Eds.), *Handbook of Olive Oil* (Second Edi). <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5371-4>
- Salas, J. J., Harwood, J. L. y Martínez-Force, E. (2013). Lipid Metabolism in Olive: Biosynthesis of Triacylglycerols and Aroma Components. En *Handbook of Olive Oil* (pp. 97-127). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8_4
- Sánchez-Ortiz, A., Romero-Segura, C., Sanz, C. y Pérez, A. G. (2012). Synthesis of volatile compounds of virgin olive oil is limited by the lipoxygenase activity load during the oil extraction process. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(3), 812-822. <https://doi.org/10.1021/jf204241e>
- Sancho, J., Bota, E. y De Castro, J. . (1999). El análisis sensorial del aceites de oliva virgen. En *Introducción al análisis sensorial de los alimentos* (Primera ed, pp. 183-198). Edicions Universitat de Barcelona.
- Sayago, A., Marín, M. I., Aparicio, R. y Morales, M. T. (2007). Vitamina E y aceites vegetales. *Grasas y Aceites*, 58(1), 74-86. <https://doi.org/10.3989/gya.2007.v58.i1.11>
- Servili, M. y Montedoro, G. F. (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 602-613. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200210\)104:9/10<602::AID-EJLT602>3.0.CO;2-X](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200210)104:9/10<602::AID-EJLT602>3.0.CO;2-X)
- Servili, M., Sordini, B., Esposto, S., Urbani, S., Veneziani, G., Di Maio, I., Selvaggini, R. y Taticchi, A. (2014). Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *Antioxidants*, 3(1), 1-23. <https://doi.org/10.3390/antiox3010001>
- Tapia, F., Astorga, M., Ibacache, A., Martínez, L., Sierra, C., Quiroz, C., Larraín, P. y Riveros, F. (2003). Manual del Cultivo del Olivo. En *Instituto de Investigaciones Agropecuarias* (p. 8). <http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IisScript=BIBACL.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=030545>
- Tapia, F., Salas, C., Riveros, F., Abarca, P., Riquelme, J., Sierra, C., Alfonso, O. y Quiroz, C. (2017). Manual de manejo de huerto de olivo. *Boletín INIA*, 16, 21-22.

- Thomashow, M. F. (1999). Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 50, 571–599.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S. y La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18(1), 98–112.
- Tsimidou, M. Z. (2013). Analytical Methodologies: Phenolic Compounds Related to Olive Oil Taste Issues. En R. Aparicio-Ruiz & J. L. Harwood (Eds.), *Handbook of Olive Oil* (2da ed., pp. 311-333). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8_9
- Tura, D., Failla, O., Bassi, D., Pedò, S. y Serraiocco, A. (2008). Cultivar influence on virgin olive (*Olea europea* L.) oil flavor based on aromatic compounds and sensorial profile. *Scientia Horticulturae*, 118(2), 139-148. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.05.030>
- Vichi, S., Pizzale, L., Conte, L. S., Buxaderas, S. y López-Tamames, E. (2003). Solid-Phase Microextraction in the Analysis of Virgin Olive Oil Volatile Fraction: Modifications Induced by Oxidation and Suitable Markers of Oxidative Status. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(22), 6564-6571. <https://doi.org/10.1021/jf030268k>
- Visioli, F., Franco, M., Toledo, E., Luchsinger, J., Willett, W. C., Hu, F. B. y Martinez-Gonzalez, M. A. (2018). Olive oil and prevention of chronic diseases: Summary of an International conference. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 28(7), 649-656. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2018.04.004>
- Vossen, P. (2013). Growing Olives for Oil. En Ramón Aparicio & J. Harwood (Eds.), *Handbook of Olive Oil* (Segunda ed). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-5371-4>

VIII. Anexo

Anexo 1. Criterios de calidad para el aceite de oliva según norma comercial COI/T.15/NC N°3/Rev. 18, junio 2022.

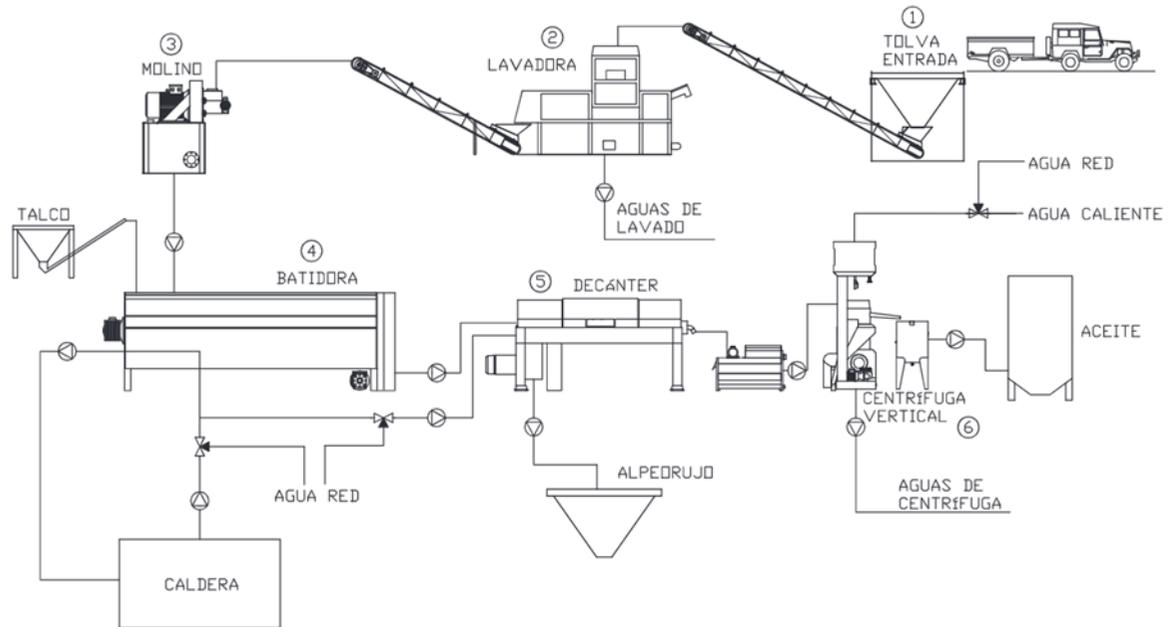
	Aceite de oliva virgen extra	Aceite de oliva virgen	Aceite de oliva virgen corriente	Aceite de oliva virgen lampante*	Aceite de oliva refinado	Aceite de oliva
Características organolépticas						
Olor y sabor					aceptable	bueno
Olor y sabor (sobre una escala continua)						
mediana del defecto	Me=0	0<Me≤3,5	3,5<Me≤6,00**	Me>6,0		
mediana del frutado	Me>0	Me>0				
color					amarillo claro	claro, amarillo a verde
aspecto a 20°C durante 24 horas					limpio	limpio
Acidez libre						
% m/m expresada como ácido oleico	≤0,8	≤2,0	≤3,3	>3,3	≤0,3	≤1,0
Índice de peróxidos						
en meq. de oxígeno de los peróxidos por kg de aceite	≤20	≤20	≤20	no limitado	≤5	≤15
Absorbancia en UV ($K_{1CM}^{1\%}$)						
270 nm (ciclohexano)	≤0,22	≤0,25	≤0,30**		≤1,10	≤0,9
ΔK	≤0,01	≤0,01	≤0,01		≤0,16	0,15
232 nm*	≤2,50**	≤2,60**				

* Esta determinación está destinada a ser aplicada únicamente por los socios comerciales y con carácter facultativo.

** Los socios comerciales del país en que se venda al por menor podrán exigir que se respeten estos límites cuando el aceite se ponga a disposición del consumidor final.

(Consejo Oleícola Internacional, 2013)

Anexo 2. Esquema clásico de una almazara para la elaboración de aceite de oliva virgen.



(Cano Marchal y cols., 2011)

Anexo 3. Identificación de compuestos fenólicos presentes en aceite de oliva variedad arbequina, por HPLC.

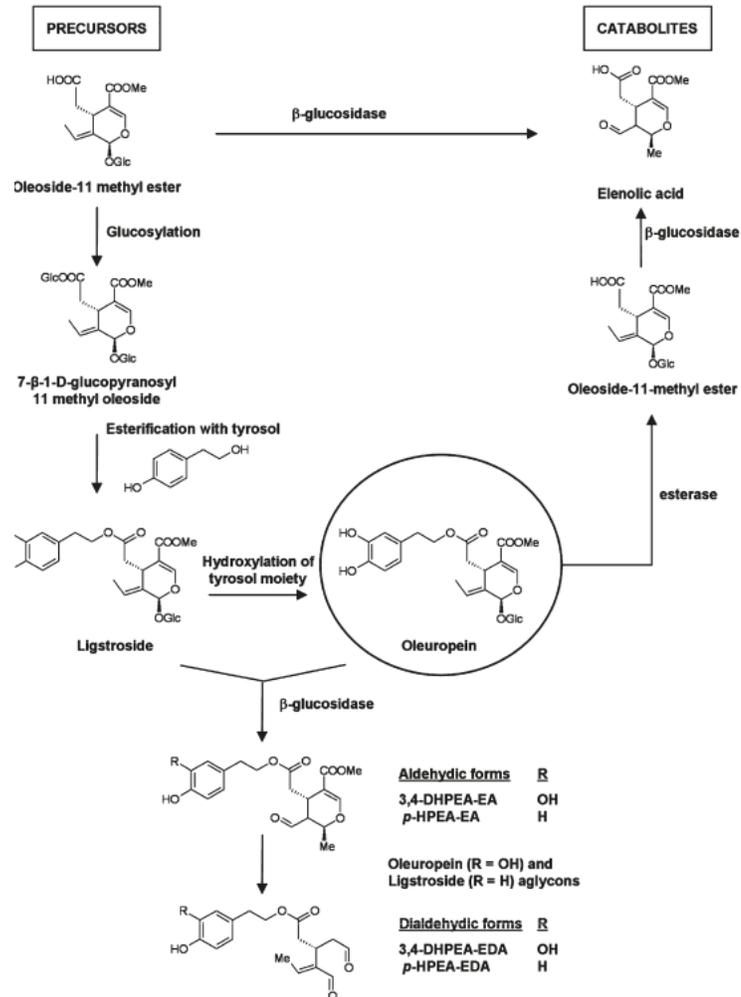
Longitud de onda (λ)	Compuestos fenólicos	TR (min)
235 nm	PHPA (estándar interno)	12.7
	Ácido elenólico	25.8
280 nm	Hidroxitirosol	9.6
	PHPA (estándar interno)	12.7
	Tirosol	13.4
	Ácido vainílico	18.8
	Decarboximetil aglicona de oleuropeína dialdehídica	31.1
	Decarboximetil aglicona de oleuropeína dialdehídica oxidada	32.2
	Aglicona de oleuropeína dialdehídica	34.7
	Decarboximetil aglicona del ligustrósido dialdehídico	37.0
	Decarboximetil aglicona de ligustrósido dialdehídica oxidada	37.6
	Pinoresinol	38.9
	Aglicona de ligustrósido dialdehídica	43.6
	Aglicona de la oleuropeína aldehídica e hidroxílica	47.6
	335 nm	Ácido orto-cumárico (estándar interno)
Luteolina		47.2
Apigenina		52.2
Metil-luteolina		53.5

Anexo 4. Atributos sensoriales y umbral de olor en compuestos volátiles identificados en aceites de oliva virgen extra.

Compuestos volátiles	Umbral de olor (mg/kg de aceite)	Atributo sensorial	Referencia
Alcoholes			
• Etanol	30,0	Alcohol y dulce	(Romero y cols., 2017)
• 2-Metil-1-butanol	0,48	Vinoso y picante	(Morales y cols., 2005)
• 3-Metil-1-butanol	0,10	Quemado y malta	(Romero y cols., 2017)
• 2-Heptanol*	0,01	Terroso y hongo	(IRomero y cols., 2017)
• 1-Hexanol	0,40	Frutal, dulce y fresco	(Romero y cols., 2017)
• E-2-Hexenol	5,00	Grasa verde y hojas	(Kalua y cols., 2007)
• 1-Octanol	0,48	Verde, mohoso, dulce y ceroso	(Tura y cols., 2008)
Aldehídos			
• Pentanal (valeraldehído)*	0,24	Madera, aceitoso y almendra	(Romero y cols., 2017)
• Hexanal	0,08	Verde, manzana verde y aceite	(Romero y cols., 2017)
• E-2-hexenal	0,42	Verde, almendra amarga y frutal	(Romero y cols., 2017)
• Octanal*	0,32	Grasoso y jabonoso	(Romero y cols., 2017)
• E-2-heptenal*	$5,00 \times 10^{-3}$	Dulce, grasoso y madera	(Romero y cols., 2017)
• Nonanal*	0,15	Grasoso y pungente	(Romero y cols., 2017)
• E-2-nonenal	0,90	Papel y grasoso	(Kalua y cols., 2007)
Ésteres			
• Etil propionato*	0,10	Fresa, frutal y dulce	(Romero y cols., 2017)
• Etil-2-metilbutirato*	$0,72 \times 10^{-3}$	Fresa y manzana verde	(Romero y cols., 2017)
• Acetato de butilo	0,30	Verde, frutal y pungente	(Kalua y cols., 2007)
• Etil butanoato*	0,03	Dulce y frutal	(Kalua y cols., 2007)
Cetonas			
• 4-metil-2-pentanona	0,30	Fresa y frutal	(Romero y cols., 2017)
• 3-octanona	0,32	Grasoso y jabonoso	(Romero y cols., 2017)
Ácidos			
• Ácido acético*	0,50	Vinagre, agrio y picante	(Romero y cols., 2017)
• Ácido propiónico	0,72	Desagradable y agrio	(Romero y cols., 2017)
• Ácido butírico	0,65	Queso, desagradable y rancio	(Romero y cols., 2017)
• Ácido heptanoico	0,10	Rancio y grasoso	(Kalua y cols., 2007)

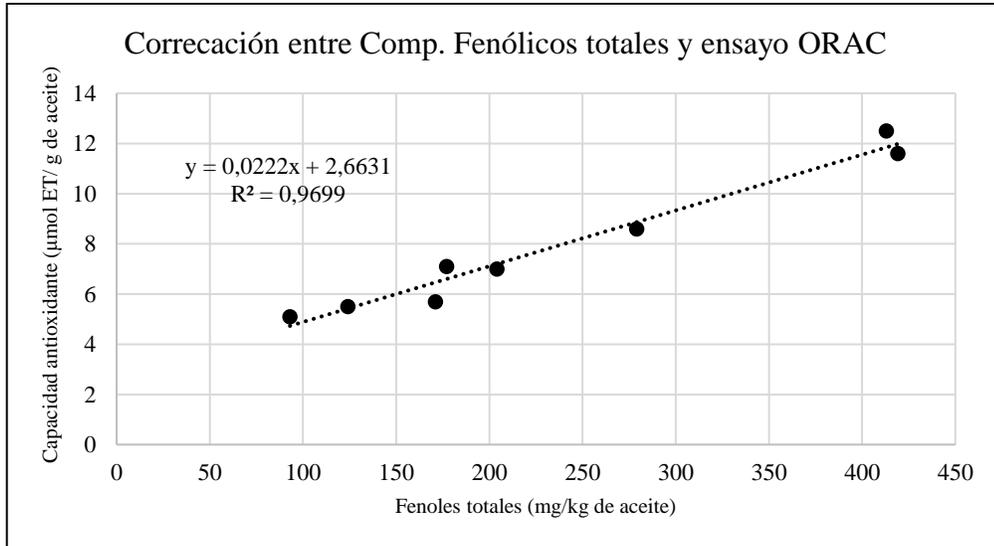
*Compuestos característicos de la helada.

Anexo 5.- Acción de la β -glucosidasa en el metabolismo de compuestos fenólicos en olivas.



Reacciones enzimáticas en los frutos del olivo que implican β -glucosidasa y esterases en la formación de derivados de la oleuropeína. Este mecanismo fue propuesto por Gutiérrez-Rosales y cols., (2010) para las variedades Hojiblanca y Arbequina cvs.

Anexo 6.- Correlación positiva entre compuestos fenólicos totales y la capacidad antioxidante hidrofílica durante la maduración.



Se consideraron los valores obtenidos de AOVEs procedentes de olivas frescas y congeladas.