



Universidad de Jaén

Escuela de Doctorado

TESIS DOCTORAL



**MEJORA DE LAS CARACTERÍSTICAS
ORGANOLÉPTICAS, FUNCIONALES Y
NUTRICIONALES DE ACEITES DE
OLIVA VÍRGENES**

**PRESENTADA POR:
ALFONSO MANUEL VIDAL CASTRO**

**DIRIGIDA POR:
Dr. FRANCISCO ESPÍNOLA LOZANO
Dr. MANUEL MOYA VILAR
Dra. ANTONIA DE TORRES SÁNCHEZ**

JAÉN, SEPTIEMBRE DE 2019

ISBN



UNIVERSIDAD DE JAÉN

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

**Departamento de Ingeniería Química,
Ambiental y de los Materiales**

TESIS DOCTORAL

•

**MEJORA DE LAS CARACTERÍSTICAS
ORGANOLÉPTICAS, FUNCIONALES Y
NUTRICIONALES DE ACEITES DE
OLIVA VÍRGENES**

Alfonso Manuel Vidal Castro, doctorando del Programa de Doctorado en Aceites de Oliva, presenta este trabajo para optar al grado de DOCTOR por la Universidad de Jaén.

Jaén, septiembre de 2019

Alfonso Manuel Vidal Castro
Doctorando de la Universidad de Jaén



UNIVERSIDAD DE JAÉN

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES

Departamento de Ingeniería Química,
Ambiental y de los Materiales

TESIS DOCTORAL

MEJORA DE LAS CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS, FUNCIONALES Y NUTRICIONALES DE ACEITES DE OLIVA VÍRGENES

Los doctores Francisco Espínola Lozano, Manuel Moya Vilar y Antonia de Torres Sánchez, tutor y directores del trabajo realizado por Alfonso Manuel Vidal Castro, autorizan su presentación a trámite, reuniendo las condiciones necesarias para su defensa.

Jaén, septiembre de 2019

Francisco Espínola Lozano

Profesor titular
Universidad de Jaén

Manuel Moya Vilar

Profesor titular
Universidad de Jaén

Antonia de Torres Sánchez

Profesora titular de Escuela Universitaria
Universidad de Jaén

AGRADECIMIENTOS

Con estas palabras quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que con su apoyo, experiencia y colaboración han hecho posible que esta Tesis Doctoral se haya realizado.

En primer lugar agradecer a mis directores, Francisco, Manuel y Antonia, su apoyo, ayuda y comprensión en este largo camino de tesis. Sin vosotros, vuestra experiencia y conocimientos, nada de esto hubiese sido posible.

A Sonia, por enseñarme algunos secretos del laboratorio y del aceite de oliva, ayudarme, apoyarme y aconsejarme en todo este tiempo. También por poner orden en mi trabajo. Agradecerte tu apoyo incondicional, tu paciencia y comprensión a la hora de robarte tiempo para dedicarlo a la tesis. Y a la pequeña Carolina, por robarte un poco de tiempo de tu infancia para escribir esta tesis.

A mis padres y mi hermano, por ser como son, educarme e inculcarme todos los buenos valores que han hecho que hoy sea quien soy y apoyarme en este largo camino. Además de enseñarme todo lo que saben referente al olivar, valores y enseñanzas que han pasado de generación en generación.

A los compañeros del laboratorio, que sin ellos todo este tiempo en el laboratorio, dónde se pasan tantas horas, no habría sido igual. A Juan Miguel, Carlos, Juan Carlos, José Antonio, Antonio Muñoz, Manuel, y a los nuevos: Valeria, Rubén, Carmen, Irene, María José, María del Mar, Antonio Lama. Os agradezco vuestra amistad y apoyo dentro y fuera del laboratorio. También a todas aquellas personas que estuvieron en el laboratorio haciendo alguna estancia.

A los miembros del grupo de investigación, Encarna, Cristóbal, Inmaculada, Lola, Mayte y Eulogio, por vuestra ayuda y vuestros sabios consejos.

A la toda la familia y amigos. También a los que faltan y ya no están.

A las profesoras Dras. Mónica Rubilar y Francisca Acevedo, por su cálido recibimiento, su ayuda y amabilidad durante mi estancia en La Universidad de la

Agradecimientos

Frontera (Temuco, Chile). También agradecer a todo el personal del BIOREN y la Universidad de la Frontera por su amabilidad y gentileza durante la estancia.

A todo el personal de las empresas Monva S.L. (Mancha Real), Vadolivo (El Molar, Cazorla) y Todolivo (Córdoba), por habernos permitido trabajar y recoger muestras en sus instalaciones y fincas, y por tratarme tan bien en esos días tan largos y duros. También quiero agradecer el apoyo técnico del CICT de la Universidad de Jaén.

¡Gracias a todos!

ÍNDICE



ÍNDICE

1. RESUMEN	1
ABSTRACT	9
2. INTRODUCCIÓN	15
2.1 El olivo	18
2.1.1 Variedades de olivo	20
2.1.2 Sistemas de cultivo	23
2.1.3 Índice de madurez.....	28
2.1.4 Importancia económica	30
2.1.5 Futuro de la olivicultura	33
2.2 Proceso de elaboración de aceite de oliva virgen. Almazara	37
2.2.1 Molturación.....	41
2.2.2 Batido.....	42
2.2.3 Centrifugación sólido-líquido.....	48
2.2.4 Centrifugación líquido-líquido	51
2.2.5 Decantación	54
2.2.6 Filtración	55
2.2.7 Almacenamiento.....	56
2.3 Proceso de elaboración de aceite de oliva virgen. Laboratorio	59
2.4 Aceite de oliva	62
2.4.1 Clasificación de los aceites de oliva	63
2.4.2 Parámetros de calidad.....	65
2.4.3 Normativa vigente.....	69
2.4.4 Composición del aceite de oliva	73
2.4.5 Aceite de oliva y salud	92
2.5 Metodología de Superficies de Respuesta.....	96
2.5.1 Diseño experimental	100
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	105
3.1 Hipótesis.....	107
3.2 Objetivos.....	109

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	111
4.1 Resumen global.....	113
4.2 BLOQUE 1. Extracción de aceites en laboratorio mediante el sistema Abencor.....	116
4.2.1 Campaña 2014/15: cultivo tradicional	116
4.2.2 Campaña 2015/2016: cultivo superintensivo	117
4.3 BLOQUE 2. Ensayos a escala industrial mediante el sistema de dos fases.	121
4.3.1 Producción de aceite de oliva equilibrado.....	121
4.3.2 Uso de talco en la almazara	122
4.3.3 Influencia de la centrifugación, decantación y filtración de los aceites.....	123
4.4 Discusión conjunta	124
4.4.1 Eficacia de extracción.....	126
4.4.2 Compuestos volátiles	127
4.4.3 Compuestos fenólicos	128
4.4.4 Capacidad antioxidante.....	131
4.4.5 Ácidos grasos.....	131
4.4.6 Pigmentos fotosintéticos: clorofilas.....	133
5. CONCLUSIONES	137
CONCLUSIONS.....	143
6. BIBLIOGRAFÍA.....	145
7. ANEXOS	167
ARTÍCULO 1	169
ARTÍCULO 2	183
ARTÍCULO 3	191
ARTÍCULO 4	221
ARTÍCULO 5	249
ARTÍCULO 6	261
ARTÍCULO 7	271

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Distribución del cultivo del olivo en la cuenca del Mediterráneo (Olivares Vivos, 2019).....	17
Figura 2.2. Distribución geográfica del olivo	19
Figura 2.3. Aceitunas de la variedad Picual.....	21
Figura 2.4. Aceitunas de la variedad Arbosana.....	21
Figura 2.5. Aceitunas de la variedad Koroneiki.....	22
Figura 2.6. Aceitunas de la variedad Arbequina.....	23
Figura 2.7. Sistema de cultivo tradicional, olivos con dos y tres troncos.....	25
Figura 2.8. a) Cultivo intensivo; b) Recolección con paraguas invertido	26
Figura 2.9. Recolección en un sistema de cultivo superintensivo	27
Figura 2.10. Grupos de aceitunas según su madurez (IFAPA Córdoba)	28
Figura 2.11. Evolución de la producción de AOVE en España (MAPA).....	31
Figura 2.12. Producción de AOVE en España y Andalucía (Datos: MAPA).....	32
Figura 2.13. Evolución del precio de aceite de oliva (Fuente: MAPA).....	33
Figura 2.14. Esquema del proceso de elaboración de aceite de oliva virgen	39
Figura 2.15. a) Tolva de recepción; b) Cinta transportadora	39
Figura 2.16. Limpieza de hojas de las aceitunas	40
Figura 2.17. Diagrama del cuerpo de fábrica (Fuente: Moya et al., 2010).....	40
Figura 2.18. Molino de martillos	41
Figura 2.19. Cribas de molino: a) Ovalada; b) Circular.	42
Figura 2.20. Termobatidoras: a) Horizontal; b) Vertical.....	43
Figura 2.21. Pasta de aceitunas batiéndose en la termobatidora.....	44
Figura 2.22. Representación de las tres fases durante la centrifugación.....	49
Figura 2.23. Centrífuga horizontal o decánter	50
Figura 2.24. Representación gráfica del interior y de las salidas de un decánter de tres fases (Fuente: Gea Westfalia S.A.)	50
Figura 2.25. Representación gráfica del interior y de las salidas de un decánter de dos fases (Fuente: Gea Westfalia S.A.).....	51

Figura 2.26. Tamiz vibratorio	52
Figura 2.27. Centrífuga vertical	52
Figura 2.28. Decantadores de fondo cónico.....	55
Figura 2.29. Molino de martillos del sistema Abencor	60
Figura 2.30. Detalle del cazo y las paletas de la termobatidora.....	60
Figura 2.31. Termobatidora del sistema Abencor	61
Figura 2.32. Centrífuga del sistema Abencor	61
Figura 2.33. Grupos de compuestos del aceite de oliva.....	74
Figura 2.34. Formación de un triglicérido mediante esterificación.....	74
Figura 2.35. Representación molecular de varios compuestos volátiles.....	78
Figura 2.36. Esquema de la ruta de la lipoxigenasa	80
Figura 2.37. Clasificación de los compuestos fenólicos (Bonvino et al., 2018).	83
Figura 2.38. Estructura molecular de varios compuestos fenólicos.....	85
Figura 2.39. Estructura molecular de los secoiridoides.....	86
Figura 2.40. Estructura molecular de la clorofila.....	89
Figura 2.41. Estructura molecular del β -caroteno.....	90
Figura 2.42. Superficie de respuesta	98
Figura 2.43. Diseños factoriales donde los puntos representan el número experimentos: a) Diseño 2^2 ; b) Diseño 3^2 (Hibbert, 2012)	103
Figura 2.44. Diseño Box-Behnken para tres factores (Ferreira et al., 2007)	104
Figura 4.1. Resumen global.....	114

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Tipos de sistemas de cultivo (COI, 2015).....	24
Tabla 2.2. Producción, consumo, exportación e importación de AOVE	30
Tabla 2.3. Categorías de los aceites de oliva según sus características de calidad (CEE, 2016).....	64
Tabla 2.4. Principales ácidos grasos presentes en el aceite de oliva.....	77
Tabla 2.5. Descripción sensorial de algunos volátiles presentes en el AOVE.....	79
Tabla 4.1. Resultados de algunas respuestas para todas las muestras analizadas.....	125

ABREVIATURAS

- ⇒ (3,4-DHPEA-EA) aglicona de oleuropeína, forma aldehídica e hidroxílica
- ⇒ (3,4-DHPEA-EDA) decarboximetil aglicona de oleuropeína, forma dialdehídica – **oleaceína**
- ⇒ (AAT) alcohol aciltransferasa
- ⇒ (AINE) antiinflamatorio no esteroideo
- ⇒ (ANOVA) análisis de varianza
- ⇒ (AOV) aceite de oliva virgen
- ⇒ (AOVE) aceite de oliva virgen extra
- ⇒ (CEE) Comunidad Económica Europea
- ⇒ (CG) cromatografía de gases
- ⇒ (COI) Consejo Oleícola Internacional
- ⇒ (DAD) detector de diodo array
- ⇒ (DEE) Diseño Estadístico de Experimentos
- ⇒ (DPPH) 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
- ⇒ (FID) detector de ionización llama
- ⇒ (HDL) lipoproteína de alta densidad
- ⇒ (HPL) hidropéroxido liasa
- ⇒ (HPLC) cromatografía de líquidos de alta presión
- ⇒ (HS-SPME) espacio de cabeza - microextracción en fase sólida
- ⇒ (IMS) espectrometría de movilidad iónica
- ⇒ (IOC) International Olive Council
- ⇒ (JCR) Journal Citation Report
- ⇒ (IM) índice de madurez
- ⇒ (K₂₃₂) absorbancia a 232 nm
- ⇒ (K₂₇₀) absorbancia a 270 nm
- ⇒ (LDL) lipoproteína de baja densidad
- ⇒ (LOX) ruta lipoxigenasa
- ⇒ (MAPA) Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
- ⇒ (MS) espectrometría de masas
- ⇒ (MSR) Metodología de Superficies de Respuesta
- ⇒ (MUFA) ácidos grasos monoinsaturados
- ⇒ (OMS) Organización Mundial de la Salud
- ⇒ (p-HPEA-EA) aglicona de ligustrósido, forma aldehídica e hidroxílica
- ⇒ (p-HPEA-EDA) decarboximetil aglicona de ligustrósido, forma dialdehídica – **oleocantal**
- ⇒ (PREDIMED) Prevención Dieta Mediterránea
- ⇒ (PUFA) ácidos grasos poliinsaturados
- ⇒ (SAO) Sociedad Andaluza Oleocantal
- ⇒ (SFA) ácidos grasos saturados
- ⇒ (UE) Unión Europea
- ⇒ (UV) ultravioleta

1. RESUMEN



La presente Tesis Doctoral, titulada “Mejora de las características organolépticas, funcionales y nutricionales de aceites de oliva vírgenes”, ha sido realizada en los laboratorios del Departamento de Ingeniería Química, Ambiental y de los Materiales de la Universidad de Jaén, dentro del Grupo de Investigación TEP-233 de la Junta de Andalucía y el Equipo de Investigación EI_TEP01_2017 de la Universidad de Jaén. Asimismo, se han utilizado los equipos del Centro de Instrumentación Científico-Técnica (CICT) de esta Universidad para realizar algunos ensayos de cromatografía. A nivel industrial, se han realizado ensayos en una almazara, Cortijo Virgen de los Milagros, de Mancha Real (Jaén). El trabajo que se presenta se enmarca en la línea de investigación “Calidad y elaboración de aceite de oliva” del Programa de Doctorado en Aceites de Oliva de la Universidad de Jaén. La investigación se ha financiado mediante el Proyecto de Excelencia de la Junta de Andalucía “Modelado y optimización del proceso de elaboración de aceites de oliva para la mejora de sus características organolépticas, nutricionales y funcionales”, con código PI11-AGR-7726.

Jaén, como provincia, y Andalucía, como región, son las principales productoras de aceite de oliva del mundo. El olivar es la principal fuente de riqueza de estas zonas geográficas. El aceite de oliva es un producto de elevado interés alimentario por sus características nutricionales y organolépticas, aunque también es importante su uso tópico, bien de forma directa sobre la piel o en forma de jabones y cremas. El aceite de oliva es muy aceptado por los consumidores debido a sus propiedades beneficiosas para la salud y su capacidad antioxidante, motivada en gran parte a la presencia de compuestos fenólicos, y otros compuestos minoritarios, en su composición. El aceite de oliva tiene la proporción idónea de ácidos grasos saturados, mono y poliinsaturados que aconseja la Organización Mundial de la Salud (OMS) para una dieta saludable.

España es el principal país productor de aceite de oliva a nivel mundial. El cultivo del olivo se concentra en el sur del país y a lo largo de la cuenca del Mediterráneo, aunque existen olivares en otros países del mundo con climatología similar. Tradicionalmente, el olivar se ha plantado en marcos óptimos para cultivos de secano, normalmente de 10x10 o de 12x12 m², y con árboles de 1 a 3 pies. Este tipo de cultivo se caracteriza por una baja producción y por altos costes de laboreo

y de recolección de la aceituna. Por ello, en las últimas décadas se han introducido nuevos sistemas de cultivo más rentables, los cultivos intensivos y superintensivos de olivar. Sin embargo, los cultivos tradicionales siguen predominando en la provincia de Jaén, debido a su orografía, cultura y elevado coste de transformar un cultivo ya existente en otro totalmente distinto.

El trabajo experimental se ha enfocado en la evaluación de la influencia de los principales factores tecnológicos y agronómicos sobre los parámetros de calidad, composición del aceite de oliva, rendimientos y eficacia de extracción. Para estudiar la influencia de los factores tecnológicos se ha utilizado la Metodología de Superficies de Respuesta y el Diseño Estadístico de Experimentos, con el objeto de obtener la máxima información con el mínimo de ensayos. Se han tenido en cuenta factores agronómicos como el momento de recolección del fruto, la variedad de aceituna y el sistema de cultivo empleado.

Las muestras de aceitunas se han recogido en tres campañas oleícolas, entre 2014-15 y 2016-2017; de distintas procedencias, con diferentes estados de maduración, de cultivos de regadío y secano y de sistemas de cultivo tradicional y superintensivo; habiéndose utilizado diferentes variedades: Picual, Koroneiki, Arbequina y Arbosana.

En la primera campaña, 2014-15, se han hecho ensayos de laboratorio utilizando el analizador de rendimientos Abencor, con una muestra de aceitunas procedentes de olivos de la variedad Picual, de secano, procedentes de Sierra Mágina (Cambil, Jaén). Los factores tecnológicos estudiados fueron el tiempo de batido, variando entre 30 y 90 min, la temperatura de batido, entre 20 y 40 °C, y el tamaño de criba, entre 4,5 y 6,5 mm.

El factor que ha mostrado mayor influencia en las respuestas analizadas (compuestos volátiles, fenólicos y capacidad antioxidante) ha sido la temperatura de batido. Para los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante la influencia de la temperatura de batido es positiva, a mayor temperatura mayor es el valor de ambas respuestas. Las condiciones óptimas para obtener el contenido máximo de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante (813,5 mg/kg y 2795 µmol trolox/kg, respectivamente) fueron 40 °C de temperatura de batido y 4,5 mm de

diámetro de criba. Por el contrario, para los compuestos volátiles la temperatura tiene una influencia negativa, al aumentar la temperatura disminuye el contenido de estos compuestos. Estos disminuyen su contenido hasta un 36 % al aumentar la temperatura de 20 a 40 °C. Las condiciones óptimas para obtener el contenido máximo de volátiles (12,7 mg/kg) fueron 20 °C de temperatura de batido y un diámetro de criba de 6,5 mm. El tiempo de batido ha mostrado una influencia estadísticamente poco significativa en estas respuestas.

Realizando una optimización conjunta de los modelos para obtener un aceite de oliva virgen extra equilibrado, de la variedad Picual, se obtienen las condiciones óptimas de elaboración. Estas condiciones son: temperatura de batido entre 20 y 25 °C y con un diámetro de orificio de la criba del molino de 6,5 mm. Estas condiciones del proceso hacen que los aceites obtenidos sean fragantes, amargos y picantes, y, nutricionalmente, saludables.

En la segunda campaña, 2015-16, se ha utilizado aceitunas de las variedades Arbequina, Koroneiki y Arbosana, de cultivo superintensivo, de regadío y seco, con diferentes estados de maduración. Para el estudio de la influencia de los factores tecnológicos, se ha variado el tiempo de batido (30, 60 y 90 min.), la temperatura (20, 30 y 40 °C) y el tamaño de criba (4,5, 5,5 y 6,5 mm), a escala de laboratorio.

La composición de los aceites de oliva depende de la variedad de aceituna utilizada en el proceso de extracción. También depende del estado de madurez de estas y de las condiciones de cultivo, regadío o seco. El contenido total de compuestos volátiles de la ruta de la lipoxigenasa es mayor en aceites de oliva obtenidos de aceitunas procedentes de cultivo de regadío. El mayor contenido en estos compuestos se obtuvo a partir de aceitunas de variedad Arbequina (35 mg/kg). Por el contrario, el contenido de compuestos fenólicos totales es mayor en aceites de oliva obtenidos de aceitunas procedentes de cultivo de seco. El mayor contenido en estos compuestos se obtuvo a partir de aceitunas de variedad Koroneiki (1320 mg/kg). Comparando los resultados obtenidos entre las variedades estudiadas se deduce que es posible elaborar aceites de oliva ricos en compuestos volátiles, muy fragantes y aromáticos para el consumidor. También se

pueden elaborar aceites con una gran cantidad de compuestos bioactivos, como por ejemplo con gran concentración de los compuestos oleaceína y oleocantal. O bien, elaborar un aceite que sea equilibrado en ambos grupos de compuestos.

Respecto del perfil ácido de los aceites, el contenido de ácidos grasos monoinsaturados se incrementa al aumentar el índice de madurez, en el rango estudiado, y disminuye la proporción de ácidos grasos saturados. De las tres variedades estudiadas, la variedad Koroneiki presentó la proporción más elevada de ácidos grasos monoinsaturados (79,6 %) y la menor proporción de saturados (14,7 %).

El mayor contenido de pigmentos fotosintéticos se obtuvo para los aceites obtenidos a partir de aceitunas con índice de madurez bajo, procedentes de cultivos de secano. De las variedades estudiadas, la que tuvo un mayor contenido fue Koroneiki (51,9 mg/kg).

Finalmente, se han realizado ensayos a escala industrial en la campaña 2016-17, con aceitunas de la variedad Picual, todas de cultivo tradicional y regadío. Los ensayos se realizaron en la almazara del cortijo Virgen de los Milagros de la empresa Monva S.L. (Mancha Real, Jaén). En estos se modificó la temperatura de batido en la batidora (22 y 32 °C); el tamaño y tipo de criba, tamaño de 5 a 6 mm (forma circular u ovalada); tiempo de batido, entre 60 y 120 min.; y el uso de talco como coadyuvante tecnológico en el batido de la pasta de aceituna. Asimismo, se ha hecho un estudio de cómo afecta a la calidad y composición del aceite de oliva la centrifugación vertical, almacenamiento y filtración.

Como novedad importante se realizó un Diseño Estadístico de Experimentos a escala industrial y se utilizó la Metodología de Superficies de Respuesta para optimizar las respuestas de los compuestos volátiles y fenólicos, pigmentos fotosintéticos y capacidad antioxidante, y conseguir un aceite de oliva equilibrado. La temperatura de batido fue el factor con mayor influencia. A mayor temperatura, 32 °C, y mayor tiempo de batido, 120 minutos, se obtienen aceites ricos en compuestos fenólicos (338 mg/kg), en pigmentos fotosintéticos (32,5 mg/kg) y con una gran capacidad antioxidante (992 µmol/kg). Igualmente, La eficacia de extracción alcanza su máximo (88,9 %) con estas condiciones del proceso. Por el

contrario, el mayor contenido de compuestos volátiles de la ruta LOX (12,2 mg/kg) se obtuvo a la temperatura de batido más baja (22 °C), tiempo de batido alto (120 min.) y tamaño de criba pequeño (5 mm).

El uso del talco a nivel industrial mejora la eficacia de extracción sin tener que aumentar la temperatura de batido de la pasta de aceituna en la termobatidora. Además, el uso de coadyuvante no modifica la categoría del aceite de oliva. Se realizó un estudio siguiendo una metodología tradicional para determinar la dosis adecuada de talco y su influencia en la composición de los aceites. El máximo de eficacia de extracción se obtuvo para una dosis de 0,75 % de talco.

La centrifugación vertical influye sobre la composición del aceite extraído, disminuyendo el contenido en compuestos volátiles y fenólicos y, por tanto, también la capacidad antioxidante. Esto es debido al uso de agua en esta etapa, ya que algunos compuestos se transfieren al agua por su constante de partición agua/aceite. Destacando la disminución en un 53 % del contenido en etanol durante la centrifugación vertical de los aceites.

La decantación durante el almacenamiento de los aceites de oliva disminuye un 33,5 % el contenido total de compuestos fenólicos. Además, el contenido en clorofilas disminuye un 54,9 %. Por el contrario, existe un aumento del índice de peróxidos del 30 %.

La filtración no tiene una influencia estadísticamente significativa en las distintas respuestas analizadas, excepto en el contenido en clorofilas. Este contenido disminuyó un 47 % después de la filtración. La filtración no afecta significativamente a la composición de ácidos grasos y compuestos volátiles y fenólicos del aceite de oliva del aceite de oliva, solo elimina partículas en suspensión y humedad.

Con los resultados obtenidos durante las tres campañas oleícolas consideradas se han elaborado siete publicaciones científicas, algunas ya publicadas en revistas indexadas en el JCR y otras cuyo objetivo es también publicar. Además, se han realizado numerosas comunicaciones a congresos internacionales, como póster u orales.

ABSTRACT

The present Doctoral Thesis, title as "Improvement of the organoleptic, functional and nutritional characteristics of virgin olive oils", has been carried out in the laboratories of the Department of Chemical Engineering, Environmental and Materials of the University of Jaén, within the Research Group TEP-233 of "Junta de Andalucía" and the Research Team EI_TEP01_2017 of the University of Jaén. Likewise, the Scientific-Technical Instrumentation Center of this University has been used to perform some chromatography trials. On an industrial level, trials have been carried out in an oil mill, Cortijo Virgen de los Milagros, in Mancha Real (Jaén). The work presented is part of the research lines "Quality and preparation of olive oil" of the Doctorate Program in Olive Oils of the University of Jaén. These investigations have been financed by the Excellence Project of the "Junta de Andalucía" called "Modeling and optimization of the process of preparation of olive oils for the improvement of their organoleptic, nutritional and functional characteristics ", with code PI11-AGR-7726.

Jaén, as a province, and Andalusia, as a region, are the main producers of olive oil in the world. The olive crop is the main source of wealth of these geographical areas. Olive oil is a product of high nutritional interest due to its nutritional and organoleptic characteristics, although its topical use is also important, either directly on the skin or in the form of soaps and creams. Olive oil is very accepted by the consumers for its health beneficial properties and its antioxidant capacity, due largely to the presence of phenolic compounds, and others minority compounds, in its composition. Furthermore, olive oil has the ideal proportion of saturated, mono and polyunsaturated fatty acids that World Health Organization (WHO) advises for a healthy diet.

Spain is the mainly producer of olive oil worldwide. The olive tree cultivation is found in the south of the country and along the Mediterranean basin, although there are olive crops in other countries of the world with similar climatology. Traditionally, the olive tree have been planted in optimal frameworks for rainfed crops, usually 10x10 or 12x12 m², and with trees of 1 to 3 feet. This type of crop is characterized by low production and high costs of tillage and olive harvest. Thus,

in the last decades, new cultivation systems have been introduced more profitable, the intensive and superintensive crops. However, traditional crops still prevail in the province of Jaén, on account of its orography, culture and high cost of transforming an existing crop into a totally different one.

The experimental work has focused on the evaluation of the influence of the main technological and agronomic factors on the parameters of quality, composition of olive oil, yields and extraction efficiency. Response Surface Methodology and Statistical Design of Experiments have been employed in order to study the influence of technological factors, to obtain the maximum information with the minimum number of trials. Agronomic factors have been taken into account, such as the ripening time of the olive, the olive cultivar and the growing system used.

The olives have been collected during three olive oil campaigns, between 2014-15 and 2016-2017; from different origins, with different maturation stages, from irrigated and rainfed crops and from traditional and superintensive systems; using different cultivars: Picual, Koroneiki, Arbequina and Arbosana.

In the first season, 2014-15, trials in the laboratory have been carried out using the Abencor yield analyzer, with samples from olive of cultivar Picual and rainfed, from Sierra Mágina (Cambil, Jaén). The technological factors studied were the malaxation time, between 30 and 90 min; the malaxation temperature, between 20 and 40 °C; and the hole diameter of sieve in the milling, between 4.5 and 6.5 mm.

The factor with the greatest influence is the malaxation temperature for the analyzed responses (volatile and phenolic compounds, and antioxidant capacity). For phenolic compounds and antioxidant capacity the influence of the malaxation temperature is positive. At high temperature, higher is the value of both responses. The optimal conditions to obtain the maximum content of phenolic compounds and antioxidant capacity (813.5 mg/kg and 2795 µmol/kg, respectively) were 40 °C of malaxation temperature and 4.5 mm of hole diameter of sieve. On the contrary, for volatile compounds the temperature has a negative influence, at high temperature, the content of these compounds decreases. These decrease their content by 36 % when increasing the temperature from 20 to 40 °C. The optimal conditions to obtain the maximum volatile content (12.7 mg/kg) were 20 °C of

malaxation temperature and hole diameter of sieve of 6.5 mm. The malaxation time has little significant statistic influence on these responses.

Carrying out an optimization jointly of the models to obtain an extra balanced virgin olive oil, of the cultivar Picual, the optimal processing conditions are obtained. These conditions are: malaxation temperature between 20 and 25 °C and with a hole diameter of sieve of 6.5 mm. These process conditions make the oils obtained fragrant, bitter and spicy, and, nutritionally, healthy.

In the second season, 2015-16, cultivar Arbequina, Koroneiki and Arbosana have been used, from superintensive crops, irrigated and rainfed, with different ripening stages. In order to study the influence of technological factors on a laboratory scale, malaxation time (30, 60, and 90 min), malaxation temperature (20, 30, and 40 °C) and the hole diameter of sieve (4.5, 5.5, and 6.5 mm) have been modified.

The composition of olive oils depends on the cultivar of olives used in the extraction process. It also depends on the stage of maturity of these and the conditions of cultivation, irrigation or rainfed crops. The total content of volatile compounds in the lipoxygenase pathway is higher in olive oils obtained from olives from irrigated crops. The highest content in these compounds was obtained from olives of the cultivar Arbequina (35 mg/kg). On the contrary, the content of total phenolic compounds is higher in olive oils obtained from olives from rainfed crops. The highest content in these compounds was obtained from olives of cultivar Koroneiki (1320 mg/kg). Comparing the results obtained among the cultivars studied, it follows that it is possible to produce olive oils rich in volatile compounds, very fragrant and aromatic for the consumer. Olive oils can also be produced with a large amount of bioactive compounds, such as with a high concentration of oleacein and oleocanthal compounds. Or, make an olive oil that is balanced in both groups of compounds.

Regarding the acidic profile of the olive oils, the content of monounsaturated fatty acids increases with increasing maturity index, in the range studied, and the proportion of saturated fatty acids decreases. In addition, irrigated samples have a higher proportion of monounsaturated than rainfed crops. Of the three cultivars

studied, the cultivar Koroneiki presented the highest proportion of monounsaturated fatty acids (79.6 %), and the lowest proportion of saturated (14.7 %). The highest content of photosynthetic pigments was obtained for oils obtained from olives with low maturity index, from rainfed crops. Of the cultivars studied, the one with the highest content was Koroneiki (51.9 mg/kg).

Finally, trials on an industrial scale have been carried out. In the 2016-17 season, olives of cultivar Picual have been processed, all irrigated and from traditionally growing system. Trials were carried out in the mill “cortijo Virgen de los Milagros”, from the company Monva S.L. (Mancha Real, Jaén). In these trials, malaxation temperature (22 and 32 °C); the hole diameter of sieve, size of 5 and 6 mm and circular or oval shape; and malaxation time, between 60 and 120 min have been modified; and the use of talc as a technological coadjuvant in the olive paste in the malaxation. Likewise, a study has been made on how vertical centrifugation, storage and filtration affect the quality and composition of olive oil.

As an important novelty, Response Surface Methodology was used to optimize the responses of volatile and phenolic compounds, photosynthetic pigments and antioxidant capacity, to obtain a balanced olive oil. At a higher malaxation temperature, 32 °C, and a longer malaxation time, 120 minutes, oils are obtained rich in phenolic compounds (338 mg/kg), in photosynthetic pigments (32.5 mg/kg) and with a high antioxidant capacity (992 µmol trolox/kg) Likewise, the extraction efficacy reaches its maximum (88.9 %) with these process conditions. On the contrary, the highest content of volatile compounds of the LOX pathway (12.2 mg/kg) was obtained at the lowest malaxation temperature (22 °C), high malaxation time (120 min) and small hole diameter of sieve (5 mm).

The use of talc on an industrial level improves the extraction efficacy without having to increase the malaxation temperature of the olive paste in the thermomalaxer. In addition, the use of coadjuvant does not change the category of olive oil. A study was carried out following a traditional methodology to determine the appropriate dose of talc and its influence on the composition of the oils. The maximum extraction efficacy was obtained for a dose of 0.75 % of talc.

Vertical centrifugation influences the composition of olive oil extracted, decreasing the content of volatile and phenolic compounds and, therefore, the antioxidant capacity. This is due to the use of water at this stage, since some compounds are transferred to water by their water/oil partition constant. Highlighting the 53 % decrease in ethanol content during vertical centrifugation of oils.

Decantation during storage of olive oils decreases the total content of phenolic compounds by 33.5 %. In addition, the chlorophyll content decreases by 54.9 %. On the contrary, there is an increase in the peroxide index of 30 %.

Filtration does not have a statistics influence on the different responses analyzed, except in the chlorophyll content. Its content decreased after filtration by 47 %. Filtration does not affect significantly the composition of fatty acids, and volatile and phenolic compounds of olive oil, and only removes suspended particles and moisture.

With the results obtained during the three olive oil seasons considered, seven scientific publications have been elaborated, some of them have been published in journals indexed in the JCR, and others whose objective is also to publish. In addition, numerous communications have been made to international congresses as a poster or oral.

2. INTRODUCCIÓN



El olivo es un icono de la cultura mediterránea. El comienzo de su cultivo se produjo en la Edad del Bronce, en Oriente Medio, hace unos seis milenios (Barranco, Fernández y Rallo, 2017). Se extendió de este a oeste por la cuenca del Mediterráneo. La expansión desde la zona oriental se representa en la Figura 2.1 con flechas rojas. El color verde representa la distribución del olivo en la cuenca mediterránea. Cada país tiene detallado su área cultivada de olivar y su producción media.

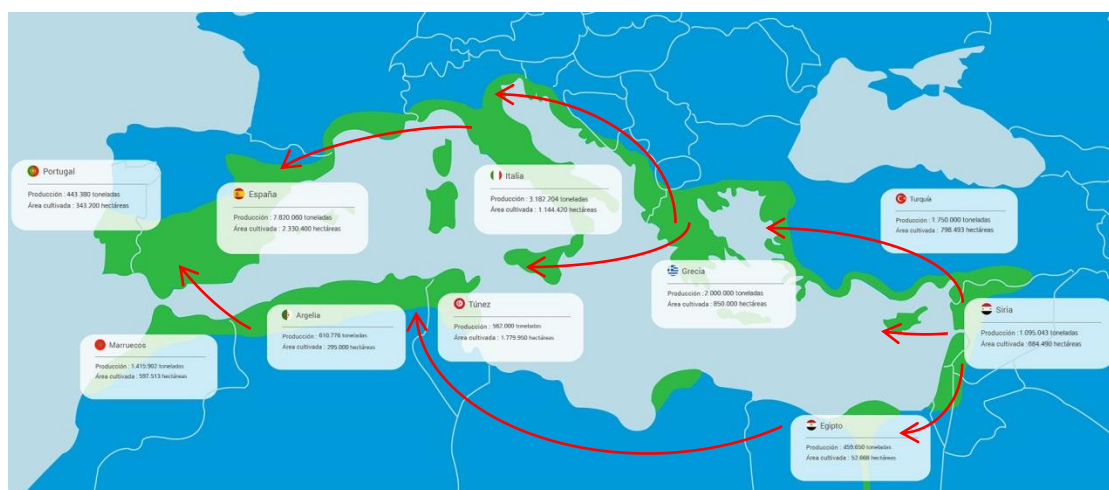


Figura 2.1. Distribución del cultivo del olivo en la cuenca del Mediterráneo (Fuente: Olivares Vivos, 2019)

A lo largo del tiempo se han originado diferentes variedades de olivo debido a la selección natural, de forma que se ha consolidado la variedad que mejor se adaptó a las condiciones climáticas y edáficas de cada región. Actualmente, el ser humano sigue recolectando las aceitunas para obtener el preciado producto, el aceite de oliva virgen extra (AOVE). El AOVE es el zumo oleoso obtenido de los frutos del olivo. Este zumo, aunque es una grasa líquida, no deja de ser un producto conocido mundialmente por sus beneficios para la salud humana. Esto es debido, en parte, a que contiene ácidos grasos mono y poliinsaturados, esenciales para el ser humano. Asimismo, en su composición existen compuestos con múltiples cualidades como propiedades antioxidantes o anticancerígenas, que tienen el poder de disminuir el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, obesidad y Alzheimer, entre otras (Covas, Fitó y de la Torre, 2015). Por todas estas razones, el AOVE es un pilar fundamental como alimento en la dieta mediterránea, y actualmente está muy extendido y es apreciado a nivel mundial.

Últimamente se están produciendo cambios muy notables en el sector del olivar, promovidos por la tendencia del mercado y la demanda del consumidor. Aunque se puede decir que es un sector que va evolucionando en el tiempo, ha habido una evolución mayor con la introducción de las nuevas tecnologías. Los procesos han sido automatizados, desde la recolección hasta el envasado. Todos estos cambios han propiciado cambios en los aceites de oliva vírgenes. Además, las campañas de recogida de aceituna comienzan cada vez más temprano, para recoger los frutos en el periodo óptimo de maduración (previo al envero) y prevenir que lleguen a caer al suelo y se deterioren. Esto conlleva unos aceites de alta calidad, de un color verde intenso característico y unas propiedades nutricionales y sensoriales excepcionales.

La tendencia en un futuro cercano, gracias a las nuevas tecnologías, va a ser la de un productor de aceite de oliva que tenga controlado el producto en tiempo real, que conozca las necesidades del olivar, el estado del fruto y el momento óptimo de la recogida. Y, que a priori, tenga el conocimiento de saber qué características va a tener el aceite obtenido de esos frutos, siguiendo las indicaciones adecuadas. Para así poder decidir cuándo hacer la recogida al objeto de obtener los mejores aceites. En definitiva, el olivarero del futuro deberá estar conectado con las nuevas tecnologías, deberá saber interpretar los resultados obtenidos en tiempo real y actuar de forma eficaz y respetando el medio ambiente, en la medida de lo posible.

2.1 El olivo

El olivo (*Olea europaea* L.) es un árbol perennifolio, longevo, con copa ancha y tronco grueso. El fruto es la aceituna, que es una drupa succulenta y muy oleosa, ovoide, de 1 a 3,5 cm de longitud, dependiendo de la variedad. El fruto tiene color verde al principio, pero en su plena madurez adquiere un color negro-morado. De este fruto se obtiene el aceite de oliva, siendo este muy apreciado en gastronomía. Sus hojas tienen de 2 a 8 cm de longitud y forma lanceolada. Por el haz tiene color verde grisáceo y por el envés un color más claro. El árbol del olivo es una especie típicamente mediterránea, es resistente a la temperatura y a las condiciones climáticas (Barranco et al., 2017; Green, 2002). Existen 58 países productores de

AOVE. Su distribución geográfica se localiza, principalmente, entre las líneas negras de la Figura 2.2. Estas líneas representan la latitud de 30° y 45°, del hemisferio norte y del sur. No obstante, alrededor del 95 % del cultivo del olivo se concentra en la cuenca mediterránea (Vilar y Pereira, 2018).

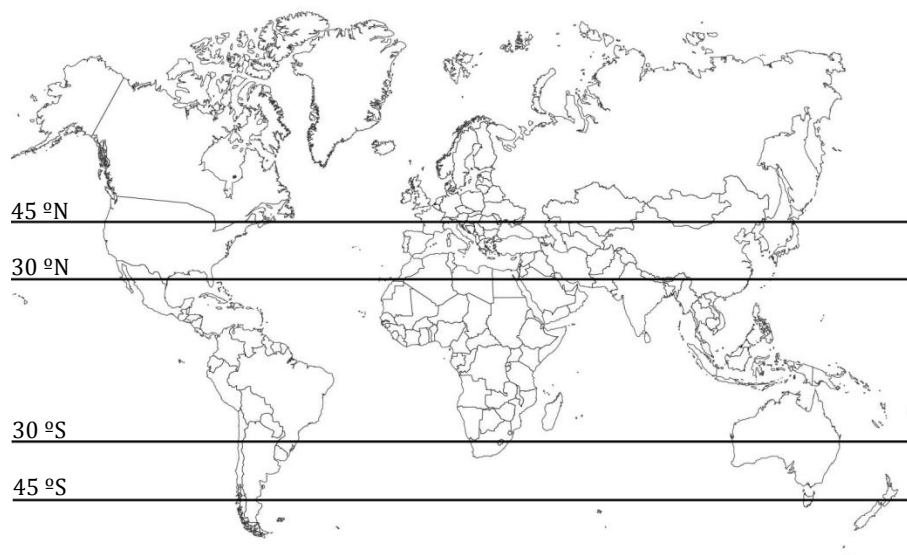


Figura 2.2. Distribución geográfica del olivo

El olivo pertenece al reino *Plantae*, división *Magnoliophyta*, clase *Magnoliopsida*, orden *Lamiales*, familia *Oleaceae*, género *Olea*. La especie que predomina en Europa es *Olea europaea*. Dentro de esta especie, existen 6 subespecies identificadas por su área geográfica (Cárdenas, Vilar, Marcos, Talavera, Velasco y Puentes, 2013). Existe una variedad de olivo que crece de forma silvestre, llamado acebuche (*Olea europaea* var. *sylvestris* Brot.), con hojas con forma oval. Suele ser de menor tamaño que el olivo cultivado, y proporciona unos frutos más pequeños, llamados acebuchinas. Suelen aparecer en el bosque mediterráneo, en zonas montañosas, acompañando a otros arbustos y árboles típicos de este clima, como las encinas o los quejigos.

Algunos restos arqueológicos obtenidos de las grandes civilizaciones emergidas en el Oriente Medio durante el neolítico demostraron la relación que tenían con el olivo y el aceite de oliva. La domesticación del olivo está atribuida a un periodo posterior. Aunque algunas investigaciones demuestran que el cultivo del olivo se originó local o regionalmente por diversos procesos y posiblemente debido a

grandes fluctuaciones en las condiciones climáticas (Besnard, Terral y Cornille, 2018).

2.1.1 Variedades de olivo

El origen de las distintas variedades fue causado por la selección natural. Las diferencias entre variedades están en el árbol, la inflorescencia, las hojas y el fruto. Existen más de un millar de variedades de olivo en el mundo. Cada variedad de olivo tiene unas características diferentes y un fruto diferente, que va a proporcionar aceites con diferentes composiciones (Rallo, Barranco y Caballero, 2005). En esta Tesis se detallan las variedades utilizadas en el trabajo, entre las que se encuentran la más representativa de la provincia de Jaén, la variedad Picual.

En las nuevas plantaciones se han introducido nuevas variedades de olivo. Esto es debido a la proliferación de viveros que suministran las plantas para los modelos de plantación de alta densidad, dónde se necesitan plantar variedades que tengan unas determinadas características para mejorar su adaptación a estos. Actualmente, en el olivar de alta densidad se usan las variedades Arbequina, Koroneiki y Arbosana, entre otras, debido a su vigor moderado, porte compacto, rápida entrada en producción, poca vecería y de fructificación en racimos (Barranco et al., 2017).

a) Variedad Picual

La variedad Picual es muy importante en España porque ocupa la mayor superficie de cultivo y particularmente localizada en la provincia de Jaén. En Andalucía ocupa el 60 % del total de hectáreas del olivar cultivado. Esta variedad se caracteriza por ser precoz en la entrada en producción, tener alta productividad, maduración media, facilidad de cultivo, rendimiento graso elevado y muy buena adaptación al clima y al suelo. Por el contrario, es muy sensible al repilo y la verticilosis. Además, no tolera bien los suelos calizos. En la Figura 2.3 se muestran dos imágenes del fruto del olivo de la variedad Picual. La aceituna de esta variedad presenta una buena extractabilidad. El peso medio del fruto es de 3,2 gramos, con una relación pulpa/hueso de 5,6 (Barranco et al., 2017).



Figura 2.3. Aceitunas de la variedad Picual

Respecto de su aceite, esta variedad presenta aceites ricos en compuestos fenólicos y medios en volátiles, con un alto contenido en ácido oleico y muy alta estabilidad a la oxidación. Presenta matices organolépticos como el frutado, amargo y picante, y otros más específicos como la higuera y la madera fresca que lo hacen fácilmente diferenciable de los aceites de oliva de otras variedades.

b) *Variedad Arbosana*

Variedad que se puede encontrar en las nuevas plantaciones de alta densidad por su gran adaptación a este tipo de cultivos, siendo típica de Cataluña. Posee un porte abierto, su vigor es bajo, es precoz en la entrada en producción y su productividad es constante y muy elevada. Soporta bien el frío, tolera el repilo, verticilium y mosca, aunque es sensible a tuberculosis. Los frutos son pequeños y redondeados. En la Figura 2.4 se muestran las aceitunas de esta variedad. El aceite obtenido tiene una buena armonía aromática, es suave y tiene distintos puntos de frutado (Rallo et al., 2005).



Figura 2.4. Aceitunas de la variedad Arbosana

c) *Variedad Koroneiki*

Variedad originaria de regiones del Peloponeso, aunque se ha extendido a lo largo del mundo por su gran adaptación al sistema de cultivo superintensivo. Representa en torno al 60 % del olivar de Grecia. La forma del árbol tiene un porte abierto y un vigor medio-alto. Esta variedad es resistente a la falta de agua y al repilo, aunque es susceptible al frío y a la tuberculosis. Tiene una entrada en producción muy precoz. Sus frutos son de tamaño pequeño, con un peso medio de 1,1 gramos, aunque tiene un elevado contenido graso (Barranco et al., 2017). En la Figura 2.5 se muestra una imagen de las aceitunas de esta variedad.



Figura 2.5. Aceitunas de la variedad Koroneiki

El aceite tiene un color característico de verde oscuro. Este es muy valorado por su alto contenido en compuestos fenólicos y en ácido oleico y por tener buena estabilidad a la oxidación.

d) *Variedad Arbequina*

Variedad originaria de Palestina e introducida en Cataluña, dónde es la variedad predominante. Actualmente, se ha introducido en los nuevos cultivos con sistema superintensivo o de alta densidad. Esta variedad es resistente al frío y sequía. Tiene un porte erecto y un vigor medio-bajo. Es precoz en la entrada en producción. Su productividad es elevada y constante. También tiene un buen rendimiento graso. Su aceite es de buena calidad, pero por el contrario, tiene baja estabilidad. Presenta tolerancia natural al verticilium. Sus frutos son pequeños, con

un peso medio de 1,9 gramos y una relación pulpa/hueso igual a 4,6. La maduración de sus frutos es temprana (Barranco et al., 2017). En la Figura 2.6 se muestra una imagen de aceitunas de esta variedad.



Figura 2.6. Aceitunas de la variedad Arbequina

El aceite tiene características de frutado intenso con múltiples sabores a hierba fresca y fruta, permitiendo su comercialización como monovarietal o para mejorar a otros aceites.

2.1.2 Sistemas de cultivo

Existen varios tipos de sistemas de cultivo y se clasifican según su densidad. Las nuevas plantaciones han ido evolucionando con una mayor densidad de árboles por hectárea. Se ha pasado del sistema tradicional (menos de 180 árboles/ha) a sistemas intensivos (200-500 árboles/ha) y superintensivos (más de 1500 árboles/ha). Estos sistemas de cultivo llevan asociados diferentes formas de recolección, siendo esta labor la de mayor coste para el agricultor (Alcalá-Reyes, 2016). Según el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2015) existen siete tipos de sistemas diferentes de cultivo, recogidos en la Tabla 2.1. Esta clasificación permite categorizar el olivar internacional en función de su densidad, orografía, y presencia o no de regadío.

El número de plantas por hectárea es un factor clave para la productividad del olivo. Sin embargo, la información sobre la influencia de la densidad de los árboles sobre la calidad y composición del aceite de oliva es escasa. Existen algunas

investigaciones recientes, como por ejemplo el estudio de Rodrigues et al. (2018) sobre el efecto de distintas densidades en cultivos de variedad Arbequina. La composición, los parámetros de calidad, la actividad antioxidante y la estabilidad oxidativa se vieron significativamente afectados por la densidad del cultivo.

Tabla 2.1. Tipos de sistemas de cultivo (COI, 2015)

Tipo de olivar	Regadío/ secano	Pendiente	Densidad, árboles/ha
Tradicional	Secano	> 20 %	< 180
Tradicional	Regadío	> 20 %	< 180
Tradicional	Secano	< 20 %	< 180
Tradicional	Regadío	< 20 %	< 180
Intensivo	Secano	< 20 %	180- 800
Intensivo	Regadío	< 20 %	180- 800
Superintensivo	Regadío	< 20 %	> 800

El manejo del riego es importante en el sistema de cultivo del olivo. Es una de las prácticas principales para reducir costes en los olivares. La falta de riego produce aceites de oliva que se caracterizan por un amargo excesivo, un picante muy alto y sabores herbáceos y leñosos. Esto es debido a la mayor producción de compuestos fenólicos, como método de defensa ante el estrés hídrico. Para niveles de riego intermedios se producen aceites con equilibrio, complejidad y características sensoriales típicas de la alcachofa, el pasto, la manzana verde y algunos frutos maduros. Por último, el riego excesivo induce a la formación de frutos con una baja extractabilidad, disminuye la eficacia de extracción del aceite. Esto es debido a la gran proporción de humedad que tienen los frutos. Además, se producen aceites casi sin los atributos de amargo o picante puesto que se genera una cantidad pequeña de compuestos fenólicos (Berenguer, Vossen, Grattan, Connell y Polito, 2006).

Se debe controlar el riego para controlar la composición del AOVE, y también, para hacer un uso eficiente y ahorrar agua, ya que éste es un bien escaso. Una ventaja del déficit de riego radica en la desaceleración del crecimiento vegetativo, siendo útil para controlar la dimensión de los árboles en cultivos de alta densidad (Gucci, Caruso, Gennai, Esposito, Urbani y Servili, 2019).

a) *Sistema tradicional*

Este sistema está muy extendido en países como España, Italia o Grecia, debido a que es el sistema en el que se han plantado los olivos desde siempre. Anteriormente, no era posible ninguna mecanización ni riego en estos cultivos. Posee una densidad de árboles baja, menos de 180 por hectárea, y siguen un esquema de cuadrícula de 10x10 a 12x12 m² aproximadamente. Un ejemplo de este cultivo puede observarse en la Figura 2.7. Algunos de estos olivos cuentan con dos o tres troncos para incrementar la producción y, generalmente, son olivares que cuentan con decenas de años e incluso algunos pueden llegar a ser centenarios.



Figura 2.7. Sistema de cultivo tradicional, olivos con dos y tres troncos

Dentro de esta categoría, se pueden clasificar en tradicional mecanizable y no mecanizable. El cultivo con suelos con menos de un 20 % de pendiente corresponde con el sistema tradicional mecanizable. En este caso se puede mecanizar algunas tareas como la recolección o los tratamientos foliares, entre otros, abaratando los costes al agricultor. Por el contrario, el cultivo en suelos con más de un 20 % de pendiente, dónde no se puede llevar a cabo la mecanización de la recolección o el cambio de tipo de cultivo por la orografía, se denomina sistema tradicional no mecanizable (Barranco et al., 2017).

b) *Sistema intensivo*

Este sistema está constituido por olivos aislados con un solo pie, jóvenes, colocados en marcos de, generalmente, 6x6 o 6x3 m², alcanzando unas densidades de 200 a 500 árboles por hectárea. Pueden superar los 40 años de vida útil, por lo que la renovación de los árboles no es frecuente. Se pueden utilizar vibradores con paraguas invertido, siendo la recolección mecanizada, como se muestra en la Figura 2.8. La recolección mecánica con vibradores de tronco ha sido considerada el método más eficiente para reducir los costes de recolección en las plantaciones intensivas. Sin embargo, existen algunas limitaciones por ser un sistema discontinuo de recolección de la aceituna.



a)

b)

Figura 2.8. a) Cultivo intensivo; b) Recolección con paraguas invertido

c) *Sistema superintensivo*

Este sistema de cultivo se diseña para buscar una solución que permita reducir los altos costes de recolección y optimizar el aprovechamiento de la superficie. La técnica de cultivo se basa, y es similar, al cultivo de la vid en espaldera. Se realiza una plantación de olivos en hilera, para así aprovechar al máximo la superficie cultivable, como se muestra en la Figura 2.9. Estos cultivos se sitúan en zonas llanas o con poca pendiente, y de gran superficie. La recolección está mecanizada y es muy rápida, disminuyendo así los costes. La productividad por hectárea es mayor que la del cultivo tradicional. El único inconveniente es que a lo largo de los años se va perdiendo el vigor en los árboles, debido a la falta de iluminación en algunas zonas y la pérdida de aireación.



Figura 2.9. Recolección en un sistema de cultivo superintensivo

La adaptación de los cultivos a una alta densidad ha permitido poder introducir máquinas cosechadoras en las explotaciones agrarias. Estas máquinas recolectoras en continuo han sido desarrolladas y adaptadas a las nuevas necesidades de la olivicultura de alta densidad. Estas pasan por encima del olivo, vibrando sus ramas y recogiendo los frutos. Es por ello que el tamaño del olivo debe controlarse mediante la poda, para adaptarlo a las dimensiones de la cosechadora. Se ha utilizado con gran eficacia en cultivos jóvenes formados en seto; no obstante, su uso está limitado para árboles que no sean excesivamente grandes (Barranco et al., 2017).

Este sistema requiere mayores inversiones iniciales, debido a tener que implantar un entutorado de los olivos, para que estos permanezcan totalmente verticales y en hilera. También requieren de terrenos muy amplios y con poca pendiente, para que las máquinas de recolección puedan moverse fácilmente por los setos.

Suelos excesivamente fértiles y profundos favorecen el desarrollo de los árboles, dificultando con ello el manejo de los setos cuando están en plena producción. Las distancias entre los árboles son inferiores a un metro y medio, por lo que tras dos años se forma un seto. A partir del séptimo año, la competencia lumínica y la escasa aireación generan algunos problemas, y disminuye la producción y el rendimiento graso (Pastor, Vega e Hidalgo, 2006).

2.1.3 Índice de madurez

El índice de madurez (IM) es un parámetro numérico que expresa el nivel de maduración de los frutos del olivo. Depende de la época de recolección, de los factores agronómicos y medioambientales. El procedimiento propuesto por Uceda y Frías (1975) se basa en cuantificar el grado de madurez según el cambio de color de la piel de las aceitunas de la variedad Picual y de su pulpa durante todo el proceso de maduración.

Para la determinación del IM se evalúan 100 aceitunas al azar ($n_T = 100$), recogidas de todas las orientaciones geográficas del olivo. Estas se clasifican en ocho grupos mediante una evaluación subjetiva del color de la piel y de la pulpa de la aceituna. Estos grupos se numeran desde el cero al siete, como en la Figura 2.10. Se caracterizan por (grupo G = 0) piel verde intenso; (grupo G = 1) piel verde-amarillenta; (grupo G = 2) piel verde con manchas rojizas en menos de la mitad del fruto; (grupo G = 3) piel verde con manchas rojizas en más de la mitad del fruto; (grupo G = 4) piel negra con la pulpa blanca; (grupo G = 5) piel negra con menos de la mitad de la pulpa de color púrpura; (grupo G = 6) piel negra con más de la mitad de la pulpa de color púrpura; y (grupo G = 7) piel negra con toda la pulpa púrpura.

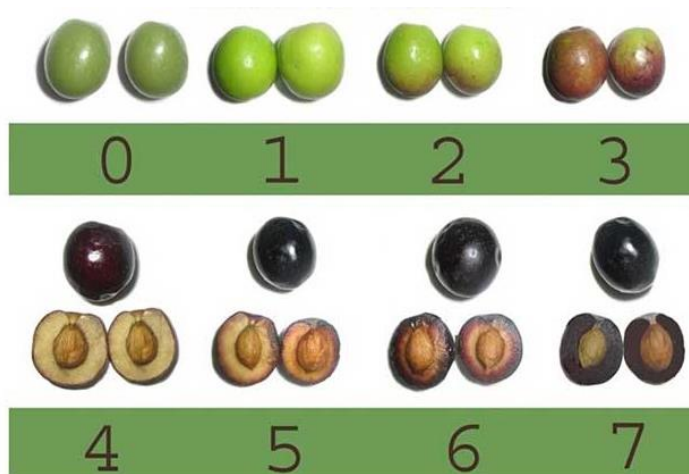


Figura 2.10. Grupos de aceitunas según su madurez (Fuente: IFAPA Córdoba)

El índice viene dado por la Ecuación 2.1, donde G es el número del grupo y n_i es el número de aceitunas en ese grupo. Los valores del índice de madurez varían de 0 a 7. El cálculo se realiza sumando los productos obtenidos del número de frutos por el valor numérico de cada grupo o clase, dividido por el número total de aceitunas.

$$IM = \frac{\sum G_i n_i}{n_T} = \frac{0*n_0+1*n_1+2*n_2+3*n_3+4*n_4+5*n_5+6*n_6+7*n_7}{n_T} \quad [2.1]$$

Sería posible determinar un tiempo óptimo de recolección según el IM, para obtener mejores resultados de rendimiento y propiedades fisicoquímicas, nutricionales y sensoriales del AOVE. El contenido total de fenoles y la estabilidad oxidativa muestran una tendencia similar, aumentando al inicio de la maduración hasta un máximo, próximo al envero (o de cambio de color de la aceituna), y luego disminuyendo. El contenido de α -tocoferol y pigmentos fotosintéticos disminuye durante la maduración (Benito et al., 2013), para aceitunas maduras. Durante la maduración de los frutos, se produce un aumento en el contenido de ácido oleico. Este aumento se debe a la biosíntesis activa de los triglicéridos. Esto implica una disminución en el porcentaje relativo del contenido de ácido palmítico en el AOVE. Por otro lado, durante la biosíntesis de los triglicéridos aumenta el contenido de ácido linoleico, debido a la activación de la enzima oleato desaturasa, que transforma el ácido oleico en ácido linoleico. La proporción de los otros ácidos grasos se mantiene prácticamente sin cambios durante la maduración de la aceituna (Fregapane, Gómez-Rico y Salvador, 2010).

El IM se usa, comúnmente, para decidir cuándo comenzar la recolección. En general, se recomienda la recolección en el IM = 3 a 3,5, dentro del período denominado envero, para asegurar el contenido máximo de aceite. Sin embargo, la maduración modifica drásticamente los rasgos físico-químicos y los compuestos del fruto del olivo. Por lo tanto, estos cambios deben considerarse para lograr perfiles específicos organolépticos y nutracéuticos al adelantar o retrasar la fecha de cosecha (Rallo, Díez, Morales-Sillero, Miho, Priego-Capote y Rallo, 2018).

El proceso de maduración de las aceitunas también está asociado con transformaciones químicas y enzimáticas específicas para los pigmentos fotosintéticos. El inicio de la maduración implica un cese de la actividad fotosintética, así como el inicio del catabolismo de los pigmentos responsables de la fotosíntesis. Las clorofilas se degradan conforme va aumentando la madurez de los frutos (Vergara-Domínguez, Ríos, Gandul-Rojas y Roca, 2016).

2.1.4 Importancia económica

El olivar es un cultivo minoritario a nivel mundial. No obstante, en ciertos países pertenecientes a la cuenca mediterránea es un cultivo muy extendido, dónde tiene gran repercusión económica y social. La superficie total de olivar mundial es actualmente de 11,5 millones de hectáreas, produciendo de media 17,8 millones de toneladas de aceituna, lo que supone una media de 2,9 millones de toneladas de aceite de oliva, y 2,6 millones de toneladas de aceituna de mesa. Este sector está repartido en 58 países de los cinco continentes, generando 12.740 millones de € y creando miles de puestos de trabajo (Vilar y Pereira, 2018).

España es la potencia mundial más importante en producción de AOVE y, en especial, la provincia de Jaén. En ella se sitúa gran parte del olivar español y, por lo tanto, esta provincia es responsable de gran parte de la producción mundial. En la Tabla 2.2 se muestran los diez países con una mayor producción de AOVE, ordenados de mayor a menor producción. Otros datos de interés recogidos en la tabla son el consumo, exportación e importación de AOVE.

Tabla 2.2. Producción, consumo, exportación e importación de AOVE

País	Producción (toneladas)	Consumo (toneladas)	Exportación (toneladas)	Importación (toneladas)
España	1342330	503830	274770	55470
Italia	386770	603630	213670	54470
Grecia	250670	136670	17270	0
Túnez	183330	34000	154830	0
Turquía	148330	115330	26670	0
Siria	131670	133500	17170	8830
Marruecos	126670	120000	5300	0
Portugal	87230	71670	47300	4130
Argelia	65170	64500	0	330
EEUU	10330	305830	6500	303670

(Datos promedios de las últimas 5 campañas; COI, 2018)

Aproximadamente, el 60 % de la producción de la Unión Europea y el 45 % de la producción mundial es generada en España. Andalucía representa el 80 % de la producción de AOVE en España, siendo ésta, la comunidad autónoma española con mayor porcentaje de cultivo del olivar.

En España, la superficie dedicada al cultivo del olivar es de 2.650.801 hectáreas, que representa el 14 % de la superficie agraria útil. El 72 % sobre el total de la superficie cultivada de olivo se cultiva en secano. En Andalucía la superficie de olivar cultivada es de 1.601.295 ha, lo que representa el 60 % del cultivo del olivo en España. En la campaña oleícola 2018/2019 la producción de aceituna ha sido de 6.811.611 toneladas, y la de AOVE ha sido de 1.767.756 toneladas, según datos del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA). La producción de esta campaña ha sido un poco más alta que la media de los cuatro últimos años, como puede observarse en la Figura 2.11. La media es de 1.199.575 toneladas de aceite de oliva, representada con una línea roja discontinua.

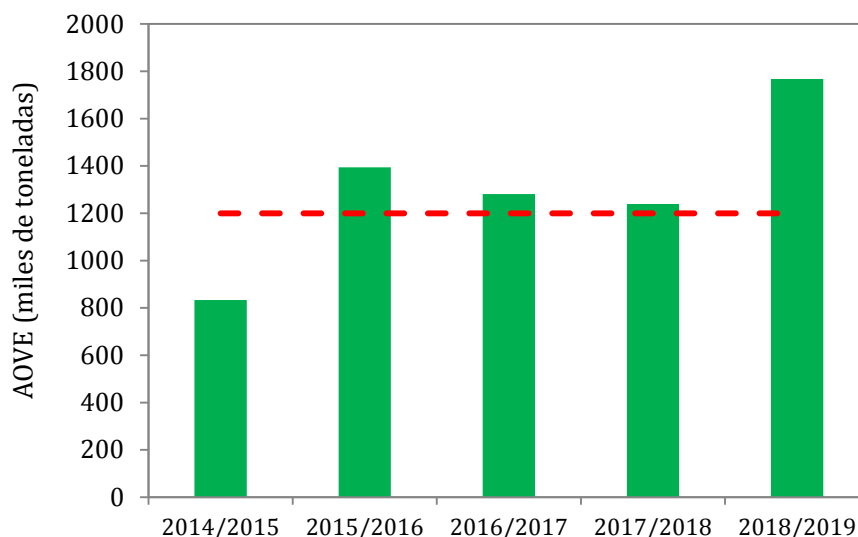


Figura 2.11. Evolución de la producción de AOVE en España (Datos: MAPA, 2019)

En la Figura 2.12 se representa el porcentaje de la producción de AOVE de Andalucía y sus provincias a nivel de España. Es de destacar el gran porcentaje que tiene Andalucía en el total de la producción española, y entre las provincias, Córdoba y sobretodo Jaén.

Según datos del COI (2015), el consumo de AOVE a nivel mundial supone sólo un 1,7 % con respecto al total de las grasas vegetales y animales. El aceite de oliva es un producto que tiene una gran exportación en España, con una media anual de unas 850.000 toneladas exportadas, siendo exportado a más de 180 países. España aún exporta un gran porcentaje de su aceite sin envasar (comúnmente denominado a granel). Sin embargo, la exportación del AOVE envasado se ha

incrementado en los últimos años. Para el AOVE existen controles de calidad muy estrictos, las autoridades e incluso los propios productores realizan análisis para garantizar la máxima calidad del producto exportado.

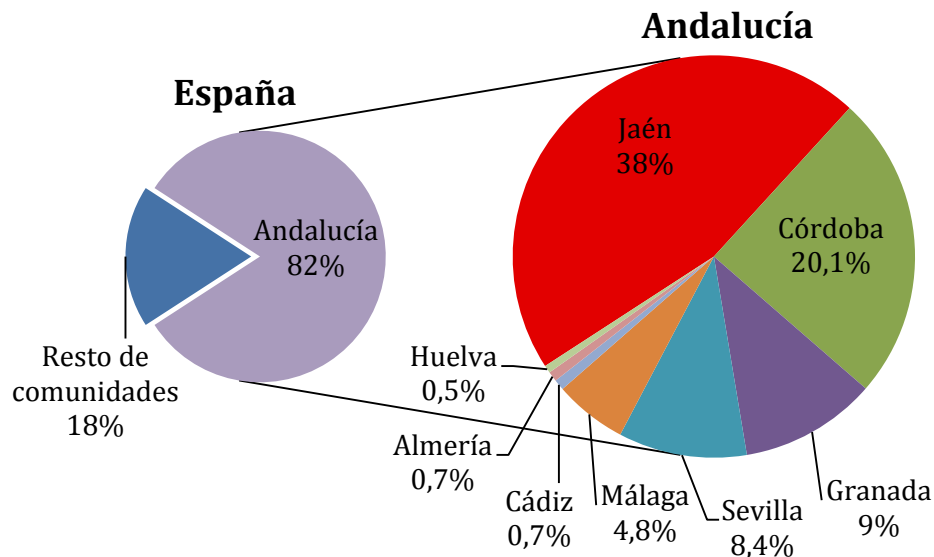


Figura 2.12. Producción de AOVE en España y Andalucía (Datos: MAPA, 2019)

El precio del aceite es un factor a tener en cuenta, ya que sus cambios van a generar más o menos riqueza a los productores. En los últimos años ha oscilado un poco, correspondiendo el precio máximo a la campaña 2014/2015. En la Figura 2.13 se puede observar como los precios actuales del AOVE y aceite de oliva virgen (AOV) están por debajo de la media de los últimos años. Estos precios varían en función de la oferta y la demanda del mercado nacional e internacional.

Según el COI (2015), el coste medio de obtención de un kilo de aceite depende principalmente del sistema de cultivo. Esto es debido a que en unos sistemas la recolección está más automatizada que en otros. Así, el sistema tradicional tiene mayores costes que el sistema superintensivo. El coste medio en el sistema tradicional es de 3,25 €/kg, mientras que para el sistema superintensivo es de 2,05 €/kg. Por lo tanto, el precio del aceite proveniente de cultivos tradicionales debe ser más alto para que el productor obtenga los mismos beneficios que un productor de cultivo superintensivo.

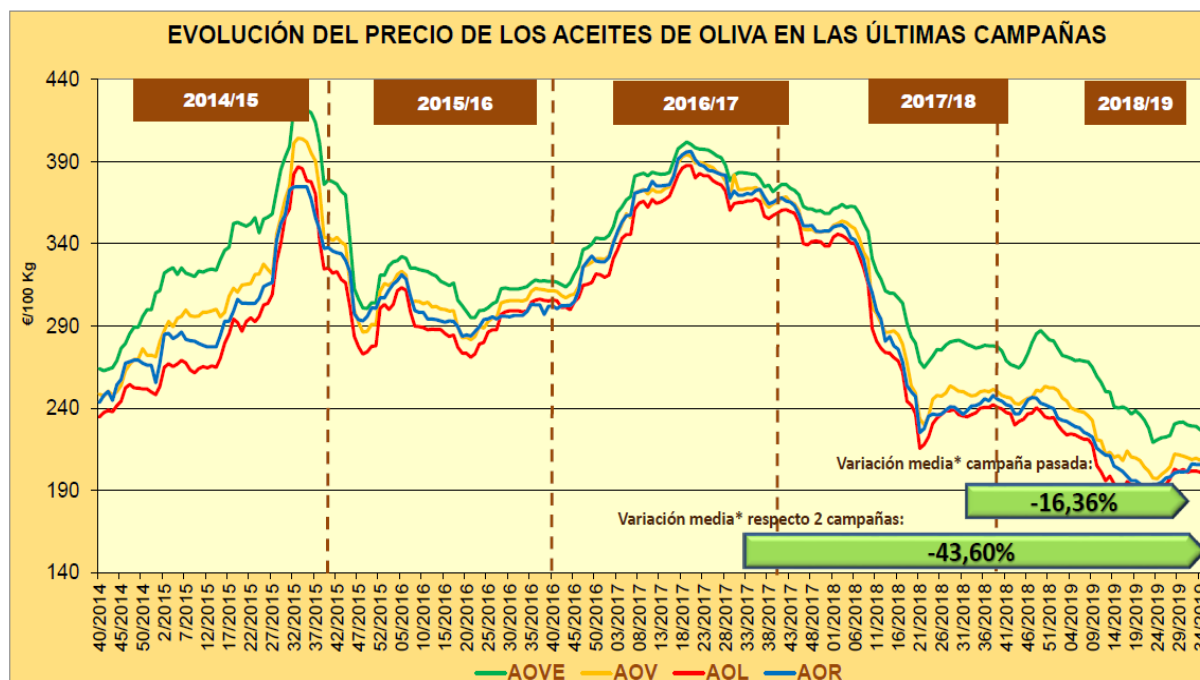


Figura 2.13. Evolución del precio de aceite de oliva (Fuente: MAPA, 2019)

2.1.5 Futuro de la olivicultura

En la actualidad, algunas palabras como criptomoneda, *blockchain*, dron, sensor, inteligencia artificial, *Machine Learning*, Metodología de Superficies de Respuesta, biorrefinería, entre otras, se relacionan con el cultivo del olivo y el aceite de oliva. Todas estas palabras son tendencia en general, pero también a nivel de la olivicultura actual, y en un futuro no muy lejano estarán instauradas dentro del mundo del olivar.

El avance de la tecnología ayudará en el manejo de los cultivos, que es una realidad hoy en día. En el cultivo del olivo se introducirán una serie de sensores que serán capaces de analizar o caracterizar el suelo y el olivo. Así se podrá establecer un plan de riego, abonado, control de plagas o tiempo de recolección, y todo esto en tiempo real. Se podrán adaptar los cultivos a un marco de plantación determinado e incluso cambiar la variedad de los olivos que se adapte mejor a esa explotación. De igual forma, habrá una fumigación inteligente, analizando imágenes de malas hierbas que se deseen eliminar, se identifican y se fumigan sólo el lugar elegido, disminuyendo el uso de la fumigación, y por consecuencia, se traduce en ahorro para el agricultor y menos contaminación para el medio ambiente.

La introducción de sensores avanzados y no invasivos en el proceso de elaboración de AOVE permitirán conocer qué ocurre en cada punto del proceso, en términos de calidad, cantidad y valor nutricional. Estos sensores junto con las tecnologías de control automático supondrán un avance científico para la producción de AOVE (Beltrán, Martínez, Aguilera, Gámez y Gómez, 2016). Además, se están desarrollando sistemas en línea para estimar la acidez, la humedad, los peróxidos e impurezas en muestras de aceite de oliva. Asimismo, existe una metodología no invasiva para estimar el contenido de fenoles en AOVE basado en la regresión multilínea por pasos, que analiza la relación entre el contenido de polifenoles en muestras de aceite de oliva y su respuesta espectral en los espectros del infrarrojo cercano, dentro del proceso de producción de aceite de oliva (Martínez, Cano, Gámez y Gómez, 2018).

Una tendencia actual es mantener el equilibrio entre productividad y sostenibilidad, ambas serán clave en el futuro. Por ejemplo, el proyecto de *Olivares Vivos*, coordinado con *SEO/BirdLife*, promueve y ejerce la recuperación de la biodiversidad en el olivar. La tecnología permitirá al agricultor controlar y reducir la gran cantidad de recursos que necesita una explotación agrícola, para conseguir los niveles requeridos por el mercado de huella hídrica y de carbono. Todo esto enfocado a disminuir los efectos del cambio climático (Olivares Vivos, 2019). El análisis de ciclo de vida es una herramienta de diseño que investiga y evalúa los impactos ambientales de un producto. Para la producción de un litro de AOVE, el olivo retira 1,6 kg de CO₂-equivalente (Espadas-Aldana, Vialle, Belaud, Vaca-García y Sablayrolles, 2019). De aquí la gran importancia que tiene el olivar sobre el medio ambiente.

El *blockchain* va a garantizar la trazabilidad desde el inicio hasta el consumidor. Además, al consumidor le garantizará que todos los datos incluidos en la etiqueta, referentes al aceite de oliva que está comprando, sean reales. Con este tipo de medida se espera conseguir una disminución de los aceites de oliva fraudulentos (El País, 2019). Gracias al *blockchain* ha surgido *Olivacoin*, una criptomoneda creada para la compraventa de aceite de oliva. Esta permitirá una mayor agilidad, rentabilidad, liquidez y desintermediación (Mercacei, 2018).

El uso de drones en el cultivo del olivar es una realidad. Existen algunos proyectos, como por ejemplo “Agricultura de precisión en el olivar usando sistemas aéreos no tripulados”, de la Fundación Caja Rural de Jaén y *Olivarum*, que desarrollan sistemas que utilizan la tecnología para la toma de datos en las explotaciones olivareras (Olivarum, 2018). Otro proyecto en desarrollo es el llamado *Droneolive*. Utilizando técnicas de teledetección, con drones dotados de sensores de fluorescencia y de espectroscopia de infrarrojo cercano, se puede conocer el estado del olivar. Esta tecnología está permitiendo monitorizar en tiempo real la cantidad de agua, el estado frente a enfermedades y la cantidad de nutrientes que hay en los cultivos, parámetros clave del olivar. Así, el agricultor puede conocer al instante el estado del olivar. Al tener referencias espaciales, se pueden llevar a cabo las medidas oportunas para corregir cualquier anomalía en los olivos con necesidades de agua o de nutrientes, y mejorar el aprovechamiento de los recursos existentes (Droneolive, 2018).

El *Machine Learning* aplicado a la olivicultura es otra tendencia que está en fase de desarrollo. Esta técnica se basa en el uso de *Big Data* y la inteligencia artificial. Utilizando algoritmos de aprendizaje automático que aprenden sobre las fluctuaciones de los precios pasados que, junto con los datos meteorológicos y de producción, son capaces de hacer una estimación cercana a la realidad. Esto sirve para crear modelos de predicción, y proporcionar información sobre la fluctuación del precio del aceite de oliva a corto plazo, y así planificar la estrategia de ventas. También puede ayudar a identificar las condiciones de distribución y almacenamiento adecuadas para el AOVE. Aroca-Santos, Lastra-Mejías, Cancilla y Torrecilla (2018) utilizaron una red neuronal artificial, un algoritmo basado en el aprendizaje automático. Como resultado, el algoritmo inteligente aprendió cómo estimar las condiciones de temperatura y la duración de la exposición a la que se había sometido una muestra de aceite de oliva, empleando únicamente datos de los análisis de datos de absorción de luz. Se ha desarrollado un modelo predictivo que utiliza inteligencia artificial para ayudar a los agricultores en el manejo de plagas y, en última instancia, mejorar la producción y reducir el uso de pesticidas. Mediante una combinación de los resultados obtenidos de análisis de AOVE mediante nariz electrónica (*e-nose*) y de algoritmos de aprendizaje automático, se puede llevar a

cabo una clasificación de los aceites de oliva para el control de calidad de los mismos (Ordukaya y Karlik, 2017).

La Metodología de Superficies de Respuesta (MSR) ha sido utilizada recientemente en las investigaciones sobre el aceite de oliva por varios investigadores (de Torres, Espínola, Moya, Alcalá, Vidal y Castro, 2018; Vidal, Alcalá, Ocaña, De Torres, Espínola y Moya, 2018; Cevik, Aydin, Sermet, Ozkan y Karacabey, 2017; Bejaoui, Beltrán, Aguilera y Jiménez, 2016; Ben Brahim, Marrakchi, Gargouri y Bouaziz, 2015). Esta metodología ayuda eficazmente a los investigadores a modelar y analizar problemas, planificar los experimentos, ahorrando reactivos, material y tiempo. Permite analizar la influencia que tienen diversas variables sobre una respuesta, así como la interacción entre varias variables. También permite obtener modelos matemáticos que predicen los valores de los factores estudiados para obtener el valor óptimo de la respuesta. Por todo esto, esta metodología es importante y muy útil para poder estudiar y analizar la multitud de variables que intervienen en el cultivo y en el proceso de elaboración del AOVE.

La biorrefinería es otro concepto que se está desarrollando en olivicultura, con el objetivo de aprovechar la biomasa, los residuos agrícolas y agroindustriales mediante un modelo de biorrefinería sostenible con el medio ambiente (Romero-García et al., 2016). Actualmente, las biorrefinerías están en fase de estudio y desarrollo, pero no existe ninguna a nivel industrial que englobe un aprovechamiento total de los residuos del olivar. Lo ideal sería coproducir aceite de oliva, bioproductos de alto valor añadido y biocombustibles que permitan mejorar los beneficios económicos de las almazaras, tener un mayor aprovechamiento de todos los recursos y generar menos residuos contaminantes para el medio ambiente.

El oleoturismo es un concepto que combina varios turismos genéricos, entre ellos el turismo rural y el turismo cultural, vinculados con otros turismos específicos, como el industrial, gastronómico, el agroturismo y el turismo de salud. Aunque este tipo de turismo está muy extendido, en el futuro se prevén muchos cambios. Se crearán ofertas personalizadas para cada tipo de turista, según la demanda más exigente, adaptándose a las necesidades del turista. Se incorporará la realidad

aumentada, se ofertarán experiencias y emociones a un consumidor cada vez más concienciado con el medio ambiente y conectado a las nuevas tecnologías. Esta actividad generará puestos de empleo adicionales, repercutiendo positivamente en las almazaras económica y socialmente.

En el presente, los alimentos nutracéuticos, funcionales, prebióticos o probióticos son tendencia. Debido, en general, a la mala alimentación, estos nuevos alimentos contrarrestan los malos hábitos alimenticios, ya que constituyen una fuente de compuestos beneficiosos para el consumidor. El AOVE está compuesto por diferentes tipos de compuestos que tienen alguna propiedad beneficiosa para la salud. Próximamente, el aceite de oliva podrá ser vendido en las farmacias como un superalimento capaz de mejorar la salud del consumidor (Cárdenas-García, 2018).

2.2 Proceso de elaboración de aceite de oliva virgen. Almazara

El proceso de elaboración y obtención de AOV no ha cambiado significativamente desde hace varios miles de años hasta la actualidad, porque se trata de preparar la pasta de aceituna para extraer el aceite de ésta. Lo que sí ha cambiado en los últimos años ha sido la tecnología y las herramientas utilizadas para tal fin. Desde procesos fundamentalmente manuales, hasta procesos, en su mayoría, automatizados, pasando por procesos intermedios ayudados de la fuerza animal. En el siglo XX, en España se elaboraba aceite de oliva en un proceso discontinuo. Se usaba el molino tradicional de piedra dónde, ayudados por la fuerza animal, se trituraban las aceitunas gracias a molinos de piedras troncocónicas o piedras verticales. Después se prensaba la pasta oleosa colocada en capachos, discos de fibra de esparto apilados formando un cargo. Mediante presión se liberaba la parte líquida compuesta por aceite y agua, y entre los capachos quedaba el residuo sólido, el orujo. De aquí la expresión de aceite de oliva de primera prensada, porque antes se obtenía por presión. Y, por último, se dejaba decantar en unos estanques y al cabo de un tiempo se recogía el aceite de oliva de la parte superior y se desechaba la parte inferior del agua y alpechín. En la actualidad este método

está en desuso, ya que todas las etapas de extracción están automatizadas y se realizan en un proceso continuo por centrifugación (Alcalá-Reyes, 2016).

Según la definición de CEE (1991), el AOV únicamente puede ser obtenido por procedimientos mecánicos o físicos, en condiciones, especialmente térmicas, que no produzcan la alteración del aceite, que van a dar lugar a la separación del aceite de los otros componentes de la aceituna. Así se obtiene el zumo oleoso natural de la aceituna. Al utilizar frutos sanos, con una maduración óptima, y realizando correctamente el proceso de extracción se obtienen aceites vírgenes extra, que son los aceites de mayor calidad y sin ningún tipo de defectos.

La almazara, también llamada fábrica de aceite, es el lugar donde se van a realizar todas las operaciones relacionados con la obtención de aceite de oliva. Consta, al menos, de tres zonas bien diferenciadas: el patio, el cuerpo de fábrica y el almacén. En el patio se efectúa la recepción de la materia prima, clasificación, eliminación de impurezas, control de peso y almacenamiento en grandes tolvas pulmón. En el cuerpo de fábrica se prepara la pasta de aceituna y se realiza la extracción. Y, por último, el almacén o bodega es el lugar donde se almacena el aceite (Aparicio y Harwood, 2003).

Actualmente, el proceso de obtención consta de varias etapas. En la Figura 2.14 se muestra un esquema de cada una de las etapas y del flujo de la materia prima, hasta obtener el producto final, AOVE. Actualmente, todos los procesos se realizan de forma continua, sin que se produzca una interrupción en el trabajo de la almazara. Este sistema de trabajo se denomina sistema continuo de extracción de aceite de oliva.

La recepción de los frutos se realiza en una tolva situada en el patio. A continuación, las aceitunas son transportadas por cintas para su limpieza y, opcionalmente, son lavadas si tienen muchas impurezas como tierra o barro. En la Figura 2.15 se muestran las fotos de una tolva de recepción y de una cinta transportadora con aceitunas.

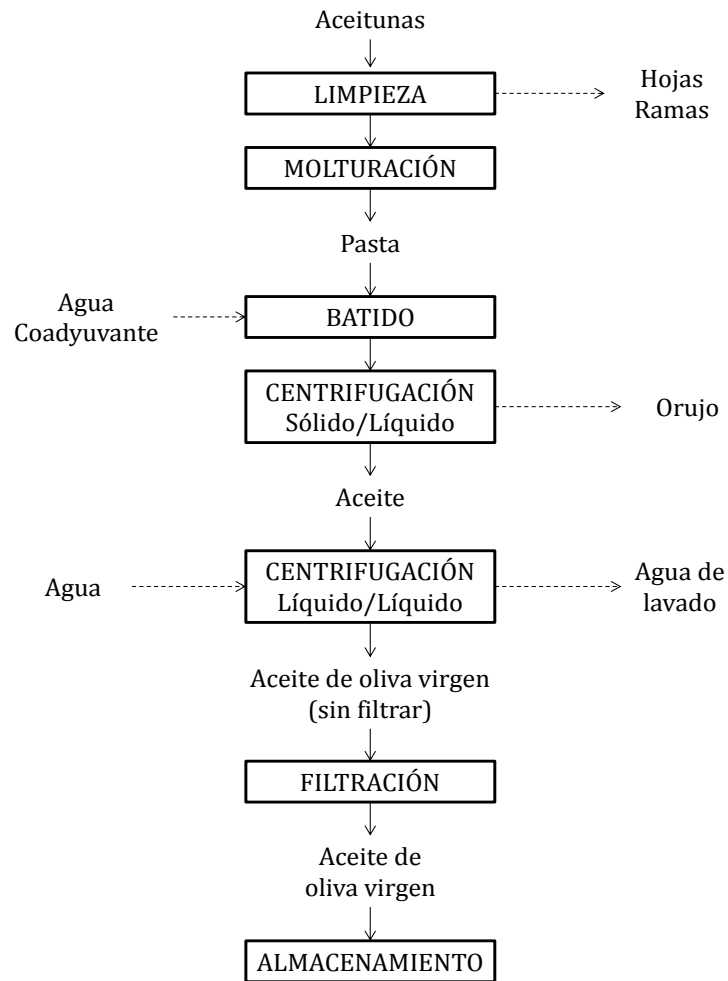


Figura 2.14. Esquema del proceso de elaboración de aceite de oliva virgen



Figura 2.15. a) Tolva de recepción; b) Cinta transportadora

La primera operación a la que son sometidas las aceitunas es la limpieza de hojas, por medio de máquinas aventadoras, que con la fuerza del aire eliminan las hojas, Figura 2.16. Además, algunas almazaras tienen despalilladoras para eliminar palos, ramas o piedras recogidos durante la recolección del fruto. Si los frutos provienen del árbol, no necesitan ningún tratamiento adicional.

Si los frutos provienen del suelo y tienen mucha suciedad, deben de ser lavados con agua hasta eliminar todas las impurezas. La aceituna limpia, y a veces lavada, se hace pasar por pesadoras automáticas y de aquí a las tolvas de alimentación del cuerpo de fábrica.



Figura 2.16. Limpieza de hojas de las aceitunas

Las aceitunas pasan al cuerpo de fábrica para ser sometidas a una serie de operaciones: molidura, batido y separación de las fases. La Figura 2.17 muestra un diagrama esquemático de una línea de extracción de aceite.

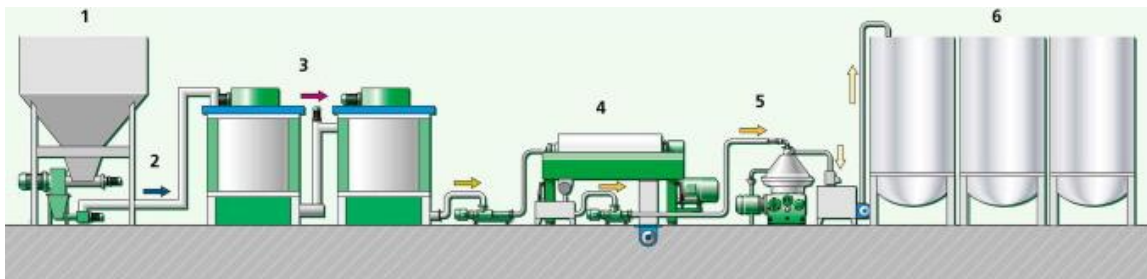


Figura 2.17. Diagrama del cuerpo de fábrica: 1, tolva pulmón; 2, molino de martillos; 3, termobateras; 4, decánter o centrífuga horizontal; 5, centrífuga vertical; y 6, depósitos de almacenamiento. (Fuente: Moya et al., 2010)

Existen multitud de variables de proceso, como puede ser el tiempo de almacenamiento de los frutos, tamaño de la criba del molino, adición de agua o coadyuvantes, temperatura de batido, tiempo de batido, caudal de alimentación de masa al decánter, revoluciones de la centrífuga vertical, entre otros. Estos parámetros del proceso de extracción de AOVE pueden modificarse según se deseen obtener aceites enriquecidos en fenoles o en volátiles (Frankel, Bakhouché, Lozano-Sánchez, Segura-Carretero y Fernández-Gutiérrez, 2013).

2.2.1 Molturación

Dentro de la aceituna se produce el almacenamiento del aceite en las vacuolas de las células parenquimáticas (Barranco et al., 2017). El aceite se encuentra en el mesocarpio de las aceitunas. Los molinos que muelen íntegramente los frutos se utilizan para romper la estructura celular y así disponer de este aceite. Actualmente, se utilizan, mayoritariamente, los molinos metálicos de martillos y de acero inoxidable. La pasta obtenida está formada por sólidos (huesos y pulpa), y líquidos (aceite y agua). Durante la molturación, y el posterior batido, las gotas de aceite se ponen en contacto con componentes no glicéridos, lo que origina que se produzcan transferencias de compuestos, como pigmentos, ceras o alcoholes alifáticos, entre las diferentes fases. En esta etapa se liberan enzimas y se activan dando lugar a reacciones enzimáticas en el batido. La molturación debe ser uniforme, para que la pasta quede homogénea y así conseguir una máxima eficacia en el batido y una mayor extracción del aceite.

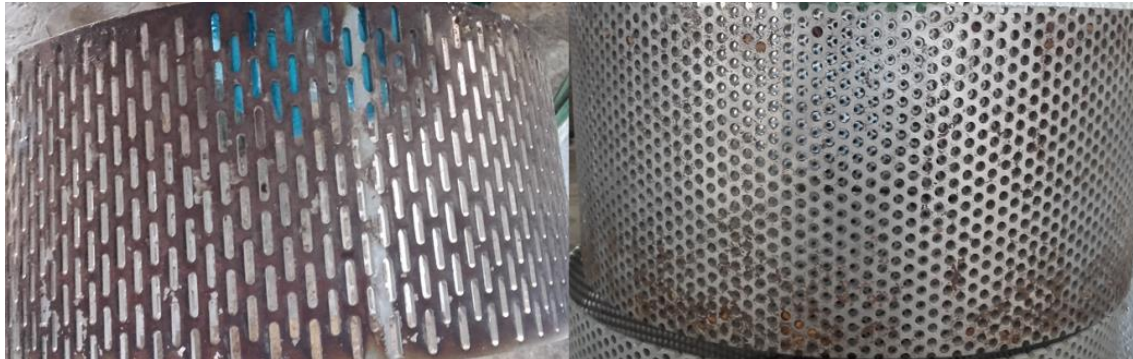
El grado de molienda es un factor importante. Existen diferentes grados, y de estos va a depender las transferencias de materia que tengan lugar entre ambas fases. En los molinos de martillos, como el de la Figura 2.18, se puede regular el diámetro de los orificios de la criba por donde va a pasar la pasta.



Figura 2.18. Molino de martillos

Existen diferentes tipos de cribas para el molino de martillos y diferentes tamaños. En la Figura 2.19 se muestran dos tipos de criba, una con los orificios con forma ovalada (izquierda) y otra con forma circular (derecha). A igual diámetro de orificio, la molturación usando la criba con orificios ovalados va a originar menor

rotura de la estructura de la aceituna que usando la criba con los orificios circulares. Esto es debido a que los orificios ovalados tienen una mayor superficie y la pasta va a pasar con mayor facilidad y más rápidamente.



a) ovalada

b) circular

Figura 2.19. Cribas de molino: a) Ovalada; b) Circular.

El tipo y el diámetro de los orificios de la criba van a influir en el grado de molienda. Un diámetro pequeño produce pastas muy finas, va a haber mucha emulsión entre las dos fases y se va a producir una extracción poco efectiva. Al contrario, un diámetro muy grande de la criba va a producir una pasta muy gruesa, con poca rotura de los tejidos y la extracción del aceite va a tener un rendimiento bajo. Por lo tanto, hay que elegir el tamaño de criba adecuado para obtener una pasta en condiciones óptimas para extraer la máxima cantidad de aceite posible (Civantos López-Villalta, Contreras Carazo y Grana Gil, 2008).

2.2.2 Batido

Para favorecer el proceso de separación de aceites de las pastas de aceituna es necesario que las gotas de aceite se unan formando la fase oleosa. Estas gotas se encuentran dispersas o emulsionadas. A la acción de juntar las gotas se llama coalescencia y tiene lugar durante el batido de las pastas en la batidora o termobatidora, Figura 2.20. En la molienda se forman emulsiones que son rotas durante el batido gracias a la coalescencia progresiva de las gotitas, del orden de 200 μm , hasta que la mayor parte del volumen de aceite forma la fase oleosa (Kalogianni, Georgiou y Exarhopoulos, 2019).



Figura 2.20. Termobatadoras: a) Horizontal; b) Vertical

La coalescencia de las gotas de aceite de oliva durante el batido es un fenómeno crucial. El aumento de temperatura disminuye la viscosidad de la pasta. No obstante, para no aumentar la temperatura durante el batido se puede añadir agua a la pasta para favorecer una coalescencia más rápida. Esta es atribuida, principalmente, a la disminución de la viscosidad de la pasta, facilitando la mezcla y el contacto entre las gotitas de aceite (Kalogianni et al., 2019). Para romper las emulsiones y favorecer la coalescencia de las gotas de aceite, sin tener que incrementar tiempos y temperaturas de batido, se suelen emplear los denominados coadyuvantes tecnológicos, que basan su acción en su carácter lipofílico o hidrofílico.

La termobatadora tiene un recipiente con forma cilíndrica o semicilíndrica. Puede tener una configuración vertical u horizontal. En su interior existe un eje dotado de paletas para batir la pasta. Dispone además de una cámara envolvente de calefacción en el exterior para controlar la temperatura de batido. Actualmente, las termobatadoras suelen tener gran capacidad para procesar grandes cantidades de pasta en poco tiempo. Mediante el batido, la masa de aceituna triturada sufre cambios debido al movimiento de las paletas, la temperatura y el tiempo de permanencia dentro de la termobatadora. La Figura 2.21 muestra una imagen del interior de una termobatadora con pasta de aceituna y aceite de oliva sobrenadando.



Figura 2.21. Pasta de aceitunas batiéndose en la termobatidora

En esta etapa se pueden controlar varios factores que van a influir en la obtención del aceite de oliva. El tiempo es muy importante, va a influir en la composición del aceite, por lo tanto, es un factor que hay que controlar exhaustivamente. Un tiempo de batido elevado va a favorecer la coalescencia de las gotas de aceite, aumentando la eficacia de extracción. Además, se van a formar compuestos volátiles deseados. Por el contrario, a mayor tiempo de batido, las reacciones de oxidación, que no son deseadas, van a ser mayores debido a la interacción que existe entre el aceite y el oxígeno del aire. Por estas razones, el tiempo de batido debe ser optimizado para obtener un aceite con una determinada composición y una eficacia de extracción buena.

Otro factor a tener en cuenta es la temperatura de batido. Esta debe controlarse muy bien porque va a influir enormemente en el proceso. Al elevar la temperatura hasta 35-40 °C, se produce una mayor separación del aceite, y un aumento en el contenido de compuestos fenólicos. Pero, a temperaturas más elevadas se favorecen las reacciones de hidrólisis y oxidación, lo que conlleva un aumento de la acidez y una disminución de la estabilidad del aceite de oliva y de los compuestos volátiles responsables del aroma. Con la temperatura aumentan los procesos oxidativos, por lo que aumenta el índice de peróxidos (Clodoveo, 2012). La temperatura de batido debe ser optimizada de igual forma que el tiempo de batido.

El último factor sería la velocidad de las paletas. Si la velocidad es elevada pueden producirse emulsiones entre ambas fases y la separación va a ser menor. La

velocidad media de las paletas de la batidora oscila entre 15 y 20 r.p.m. (Civantos López-Villalta et al., 2008).

Durante el batido se va a producir transferencia de compuestos entre las distintas fases, ya que van a estar en múltiples contactos. Estas transferencias van a influir enormemente en la calidad del aceite. En el batido ocurren bioprocesos complejos relevantes para la calidad y la composición del producto final, provocando cambios bioquímicos y favoreciendo la acción de las enzimas (Gómez-Rico, Inarejos-García, Salvador y Fregapane, 2009). Durante este proceso se liberan compuestos fenólicos que mediante hidrólisis, por acción de la glucosidasa y la estearasa, se va a producir fenoles simples como el tirosol y el hidroxitirosol o algunos compuestos derivados de ambos. Los compuestos volátiles del aceite de oliva provienen, principalmente, de la degradación de los ácidos grasos linolénico y linoleico a través de la ruta lipoxigenasa (LOX). En general, a mayor tiempo de batido, mayor es la cantidad de algunos compuestos volátiles (Aparicio et al., 2003).

La termobatidora debe limpiarse periódicamente, para así evitar que queden restos de pasta oxidados y puedan ser transferidos al siguiente ciclo de batido. Un efectivo batido de la pasta de aceituna es crucial para producir AOVE de una calidad excepcional. Es importante extraer la cantidad óptima de aceite, con las cantidades correctas de antioxidantes y el mejor sabor y olor posible; se recomienda una temperatura baja (< 30 °C) y un tiempo entre 30 y 45 min para obtener una buena calidad de aceite de oliva sin comprometer los rendimientos (Clodoveo, 2012).

Recientemente, Kalogianni et al. (2019) han estudiado el efecto del tiempo de batido y de la dilución con agua de la pasta de aceituna sobre el tamaño de las gotas de aceite a 26 ± 2 °C. Los resultados muestran una coalescencia progresiva de las gotas de aceite con el tiempo, y un claro efecto de la dilución de la pasta con agua. El batido produjo una coalescencia progresiva de las gotitas hasta que, después de 40 min, la mayor parte del volumen de aceite consistió en gotitas del orden de 200 μm , mientras que las gotitas de < 20 μm prácticamente desaparecieron (< 2 %) de la pasta después de 30 – 35 min de batido. Diluir la pasta con agua (al 18 % v/v) en la batidora produjo una coalescencia más rápida.

El resultado se atribuyó principalmente a la disminución de la viscosidad de la pasta pseudoplástica, que facilitó la mezcla dentro de la batidora y, por consiguiente, el contacto entre las gotitas. Con el fin de investigar el efecto de la etapa de batido en la separación del aceite de oliva se examinó la distribución del tamaño de gota en el orujo después de la separación en un decánter de dos fases. Los tamaños de las gotitas en el orujo provenientes de la pasta diluida fueron más pequeños. Este último se atribuyó, por una parte, a una mayor coalescencia en la etapa de batido, y, en una segunda parte, a una separación más fácil en el decánter debido a la disminución de la viscosidad de las fases continuas, permitiendo un movimiento más rápido de las gotas del mismo tamaño.

a) *Coadyuvantes tecnológicos*

Durante el proceso de extracción de aceite de oliva, hasta un 20 % del aceite puede permanecer dentro de las células o en el sistema coloidal de la pasta de aceituna, formando microgeles, y parte se enlaza en una emulsión con el agua vegetal. La dificultad de liberar este aceite radica, principalmente, en el hecho de que las gotitas de aceite dispersado o emulsionado están rodeadas por una membrana de lipoproteínas, fosfolípidos y proteínas, que las mantienen en ese estado. Cuando este fenómeno es más pronunciado, las pastas obtenidas se llaman "pastas difíciles" y generalmente necesitan el uso de un coadyuvante, que podría agregarse en la etapa de batido, para romper las emulsiones, lo que permite extraer mayor cantidad de aceite (Clodoveo, 2012). Según el Reglamento de la Unión Europea (UE) (CEE, 2008) "un coadyuvante tecnológico es toda sustancia que: no se consume como alimento en sí misma; se utilice intencionalmente en la transformación de materias primas, alimentos o sus ingredientes para cumplir un determinado propósito tecnológico durante el tratamiento o la transformación; y que pueda dar lugar a la presencia involuntaria, pero técnicamente inevitable, en el producto final de residuos de la propia sustancia o de sus derivados, a condición de que no presenten ningún riesgo para la salud y no tengan ningún efecto tecnológico en el producto final".

El uso de los coadyuvantes es para mejorar el rendimiento de extracción. La UE prohíbe el uso de coadyuvantes tecnológico de acción química o bioquímica (CEE,

2013b), dejando la posibilidad de utilizar en el proceso de elaboración de aceite de oliva virgen los coadyuvantes tecnológicos de acción física. De acuerdo con la legislación española (R.D. 640/2015), sólo se puede utilizar silicato de magnesio hidratado (talco natural) y arcillas caoliníticas.

Recientes estudios que utilizan carbonato de calcio (CaCO_3) como coadyuvante (Moya, Alcalá, Ocaña, Vidal y Espínola, 2018; Squeo, Silletti, Summo, Paradiso, Pasqualone y Caponio, 2016; Sadkaoui, Jiménez, Pacheco y Beltrán, 2016; Espínola, Moya, de Torres y Castro, 2015; Ben Brahim et al., 2015) han demostrado que tiene una acción muy buena en la extracción, siendo su acción exclusivamente física, aunque no ha sido autorizado como coadyuvante en el proceso de extracción de AOVE, más por motivos políticos que científicos. Según el estudio de Tamborrino et al. (2017) el uso de CaCO_3 como coadyuvante tecnológico puede llevar a una reducción del tiempo de batido. Por lo tanto, el uso de este coadyuvante tiene como ventajas el aumentar la capacidad de trabajo de la almazara y de reducir la energía total empleada en el proceso.

El coadyuvante se puede añadir directamente a la batidora o mediante un dosificador. Este consiste en una pequeña tolva, dónde se deposita el coadyuvante, y un tornillo sinfín que se mueve a una velocidad determinada, el cuál es el encargado de transportarlo desde el depósito hasta la termobatidora.

El talco está autorizado como aditivo alimentario y coadyuvante. Su código es E553b, y es un mineral prácticamente insoluble en agua, con baja reactividad química, aunque presenta afinidad por determinados compuestos orgánicos. Su estructura en láminas y sus características hacen que sea organofílico o lipofílico e inerte, es decir, muestra una elevada capacidad de adsorber aceite en su estructura. Son estas características las que le hacen de gran utilidad como coadyuvante tecnológico en la extracción del AOVE. Su mecanismo de acción sería el de adsorber gotitas de aceite en su superficie para dar lugar a gotas de mayor tamaño aumentando la cantidad de aceite libre, favoreciendo en definitiva el fenómeno de coalescencia (Aguilera, Beltrán, Sánchez, Uceda y Jiménez, 2010). Los resultados obtenidos por Caponio, Squeo, Monteleone, Paradiso, Pasqualone y Summo (2015) evidenciaron la efectividad del talco, agregado a la pasta de

aceituna, para aumentar el rendimiento del aceite. Además, el uso de talco no tiene ningún efecto evidente en la calidad del aceite, tampoco afecta significativamente a los compuestos volátiles ni a los parámetros de calidad.

Las arcillas caoliníticas son silicatos de aluminio. Su código como aditivo alimentario era E559, ya que desde el 1 de febrero de 2014 no están autorizadas como aditivo debido a su contenido en aluminio (CEE, 2013a). Están compuestas por caolinita, bentonita, illita y cuarzo. Existen pocos estudios de investigación sobre las arcillas caoliníticas usadas como coadyuvante en el proceso de extracción. Nciri et al. (2009) han evaluado el efecto que tiene la arcilla sobre la emulsión producida entre el agua y el aceite de oliva. Los cambios en el contenido de partículas de arcilla y surfactante afectan principalmente a las propiedades físico-químicas de esta emulsión. Las interacciones de arcilla-surfactante-aceite tienen una fuerte influencia en la estabilidad de la emulsión.

2.2.3 Centrifugación sólido-líquido

La tercera etapa del proceso es la centrifugación. Se utiliza la fuerza centrífuga para realizar la separación de ambas fases, líquida y sólida. La pasta de aceituna contiene sólidos, agua y aceite. Estas tres fases pueden separarse por medio de la centrifugación debido a su diferente densidad. La fuerza centrífuga, F_c , es el producto de la masa (m) por la aceleración centrífuga. La aceleración se calcula como el producto del radio de giro (r) por el cuadrado de la velocidad angular (w), Ecuación 2.2.

$$F_c = m \cdot r \cdot w^2 \quad [2.2]$$

Expresando la masa como el producto del volumen por la densidad, se puede deducir que la fuerza a la que estarán sometidas las distintas fases va a estar relacionada directamente con la densidad. Por lo tanto, la fase sólida, con mayor densidad, estará más lejos del eje de la centrífuga, como se puede observar en la Figura 2.22.

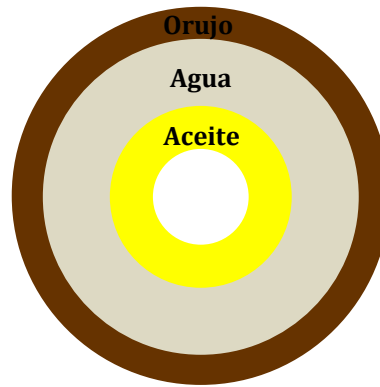


Figura 2.22. Representación de las tres fases durante la centrifugación

La fase del orujo tiene mayor densidad, alrededor de $1,20 \text{ g/cm}^3$, aunque va a tener humedad ya que está en contacto con el agua. El agua va a estar en la fase intermedia, con una densidad aproximadamente de 1 g/cm^3 . El aceite va a ocupar la fase más interna, con una densidad de $0,916 \text{ g/cm}^3$ (Cárdenas et al., 2013). Por medio de este fundamento se pueden separar la fase sólida y las líquidas. La primera centrifugación se va a llevar a cabo en la centrífuga horizontal, también llamado decánter.

La pasta procedente de la termobatidora, con la ayuda de una bomba, se introduce en el decánter, Figura 2.23. Aquí se puede controlar el caudal que entra en la centrífuga horizontal. En ocasiones, se puede adicionar agua para fluidificar la pasta y favorecer el transporte de la pasta de aceituna a través de las tuberías.

El decánter se compone de un bol con forma troncocónica cilíndrica. En su interior existe un tornillo sinfín helicoidal que gira en la misma dirección que el rotor, pero con menos revoluciones. Este hecho produce una velocidad diferencial que se encarga del transporte de la fase sólida en dirección contraria a la de salida de la fase líquida. Por lo tanto, se produce la separación de sólidos y líquidos (Cárdenas et al., 2013). Es aquí donde se produce la separación del aceite. Cambiando las condiciones de trabajo del decánter se pueden obtener mejores aceites con mayor calidad, con menos residuos, pero también se puede ganar o perder en el rendimiento de extracción.



Figura 2.23. Centrífuga horizontal o decánter

a) *Sistema de dos y tres fases*

Dependiendo de las corrientes de salida en la centrifugación horizontal se puede diferenciar dos tipos de centrífuga: de tres fases o salidas (salida de aceite, alpechín y orujo), Figura 2.24; y de dos fases o salidas (salida de aceite y alpeorujo), Figura 2.25.

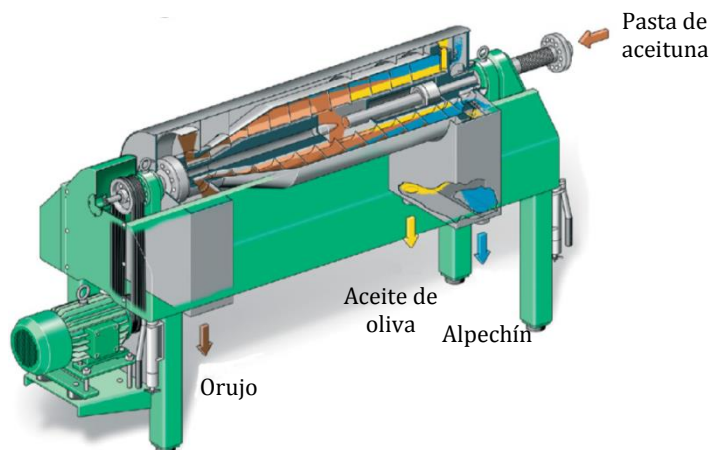


Figura 2.24. Representación gráfica del interior y de las salidas de un decánter de tres fases (Fuente: Gea Westfalia S.A.)

El primer sistema introducido en el proceso fue el sistema continuo de tres fases. Este sistema fue introducido en España en la década de los setenta. En la centrífuga horizontal se mezcla la pasta batida con agua, para mejorar la separación entre las fracciones líquidas y sólida. Existe una separación de forma continua de las tres fracciones: la parte sólida u orujo, el aceite, y el agua añadida y la de vegetación. Este sistema produce, aproximadamente, 1,3 litros de alpechín por kilogramo de aceituna procesada. Debido al gran problema medioambiental que supone el

alpechín, a principios del 1990 se comenzaron a desarrollar sistemas que no necesitaban la adición de agua al decánter. Este nuevo decánter sólo posee dos salidas, aceite y sólidos con el agua de vegetación (alpeorujo), Figura 2.25.

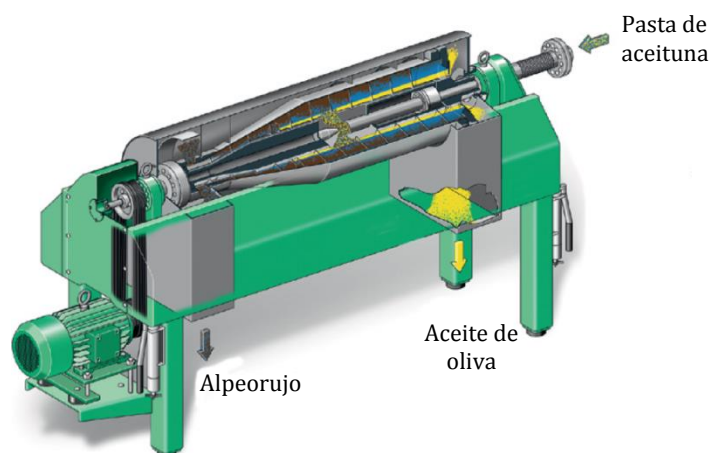


Figura 2.25. Representación gráfica del interior y de las salidas de un decánter de dos fases (Fuente: Gea Westfalia S.A.)

Desde que se introdujo el sistema de dos fases hasta la actualidad ha sido muy extendido su uso, hasta tal punto que en España la gran mayoría de almazaras utiliza este sistema. Se debe considerar que el decánter de dos fases requiere un valor mínimo de humedad en la pasta de aceitunas (aproximadamente el 50 %) para facilitar el proceso de separación (Alba, Martínez, Moyano e Hidalgo, 2009; Di Giovacchino, Solinas y Miccoli, 1994). Si la pasta de aceituna está demasiado seca antes de ser introducida en el decanter, será necesario incorporar cierta cantidad de agua hasta llegar al nivel de humedad requerido para el buen funcionamiento del decánter (Alcalá-Reyes, 2016). Durante la centrifugación de la pasta, se separa el alpeorujo del aceite de oliva, saliendo ambas por sus respectivas salidas del decanter.

2.2.4 Centrifugación líquido-líquido

El AOVE procedente de la salida del decánter tiene que ser sometido a un proceso de limpieza, ya que contiene partículas sólidas y agua en suspensión. Esta operación se inicia con los tamices vibratorios, como el de la Figura 2.26, para eliminar los restos de sólidos de mayor tamaño. Generalmente, estos tamices se encuentran en la salida del aceite de la centrífuga horizontal.



Figura 2.26. Tamiz vibratorio

Posteriormente, el AOVE se introduce en la centrífuga vertical, como el de la Figura 2.27, para realizar una centrifugación líquido-líquido. Las fases líquidas alcanzan una velocidad de rotación de 6.500 r.p.m., aproximadamente.

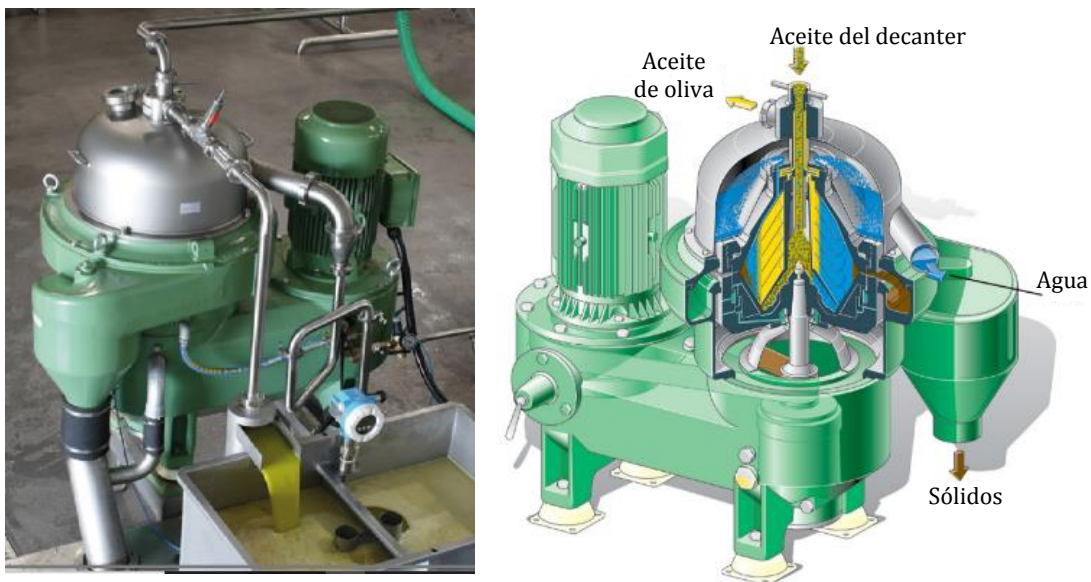


Figura 2.27. Centrífuga vertical

La centrífuga vertical está compuesta de un tambor cónico. En su interior se colocan unos discos cónicos. La fase líquida se introduce por la parte superior. Las partículas sólidas se desplazan hacia el exterior por la fuerza centrífuga, quedando pegadas a las paredes. La fase menos densa, el aceite, sube a través de los discos hasta llegar a la parte superior de la centrífuga. Existen algunas centrífugas verticales que tienen descarga de sólidos automática y no hace falta parar la centrífuga vertical para eliminar estos sólidos, y así el proceso es continuo.

En la centrífuga vertical se introduce el aceite procedente del decánter. Además en esta etapa se introduce un caudal de agua que puede variar el porcentaje y temperatura según las condiciones de trabajo y las características del AOVE. Con esta operación se obtiene un AOVE con menos impurezas. También se obtiene una corriente del agua de lavado que contiene todas las impurezas retiradas del AOVE.

La centrifugación vertical representa una fuente importante de reacciones oxidativas debido al contacto entre el aceite y el aire, sin embargo, esta etapa tiene una gran eficacia para clarificar el aceite (Altieri, Genovese, Tauriello y Di Renzo, 2015). Actualmente, se está desarrollando un nuevo sistema de centrifugación sin adición de agua que permite reducir el impacto de esta sobre la calidad del aceite, conservando compuestos antioxidantes y manteniendo las características organolépticas, y reducir las emisiones de aguas de lavado.

El estudio de varios sistemas de clarificación de los aceites llevado a cabo por parte de Gila, Beltrán, Bejaoui, Aguilera y Jiménez (2017) les llevó a la conclusión de que la centrifugación vertical tiene una mayor eficiencia de clarificación que los demás sistemas y, además, se observó una mejor puntuación sensorial usando la centrífuga vertical. Por el contrario, la etapa de la centrifugación vertical tiene un mayor efecto de oxigenación comparado con las otras etapas de extracción (Parenti, Spugnoli, Masella y Calamai, 2007). Según el trabajo de Guerrini, Pantani y Parenti (2017) la centrifugación vertical del AOVE oxida los fenoles y, en consecuencia, reduce la proporción de formas oxidadas y no oxidadas de secoiridoides. Los fenoles se eliminan en función del coeficiente de partición aceite/agua. Los antioxidantes del aceite de oliva son de naturaleza anfipática, siendo más solubles en el agua que en la fase oleosa. Por lo tanto, una gran cantidad de antioxidantes se pierde con el agua durante este proceso (Rodis, Karathanos y Mantzavinou, 2002). Según Alcalá et al. (2017) a mayor cantidad de agua utilizada en la centrífuga vertical mayor es la reducción del contenido en ésteres etílicos y metílicos en los aceites, en cambio, la velocidad de rotación no influye significativamente en el contenido de estos. La centrífuga vertical no altera apreciablemente los parámetros de calidad de los aceites. La velocidad de giro incrementa ligeramente el K_{270} , pero este no se altera por la cantidad de agua

añadida. El contenido en fenoles de los aceites se reduce un 27% solo por la acción de giro, pero no por la cantidad de agua.

La etapa de centrifugación vertical puede ser sustituida por una etapa de decantación, lo que permitiría reducir el consumo de agua y energía térmica, el consumo eléctrico y el mantenimiento de la máquina y se reduciría el volumen de aguas de lavado. Pero esta etapa es más lenta en la eliminación de impurezas y el tiempo de contacto de estas con el aceite es mayor. Cualquier tiempo adicional que permanezcan los aceites en contacto con la materia orgánica acarrearía irremediablemente el deterioro de estos. Por tanto, el posible beneficio de este sistema no es tal si con ello se reduce la calidad de los aceites, además que obliga a la limpieza periódica de los decantadores para no acentuar el deterioro del aceite.

2.2.5 Decantación

El AOVE obtenido en el proceso anterior tiene un aspecto turbio. Esta turbidez es debida a su composición y a la humedad. Este zumo oleoso es denominado aceite de oliva virgen recién producido o, llamado comúnmente, aceite de oliva en rama. La materia dispersa en el aceite de oliva fresco o recién producido se mantiene en forma coloidal o en dispersión. Esta materia se compone de cantidades variables de microgotas de agua de vegetación y partículas sólidas dispersas del propio fruto. Por consiguiente, tienen una apariencia turbia y opalescente.

La popularidad de este producto está creciendo entre algunos consumidores y chefs, quienes consideran que el aspecto opalescente señala una mayor frescura y calidad. Aunque se considera que el AOVE fresco es un producto perecedero que debe consumirse rápidamente para que no se estropee debido a las reacciones de fermentación, hidrólisis y oxidación que se producen entre la materia en dispersión y el aceite (Cayuela-Sánchez y Caballero-Guerrero, 2019). De hecho, para que el aceite tenga una vida más larga, se ejecutan las etapas de decantación y filtración para así eliminar esta materia y evitar el deterioro del AOVE.

En el proceso de decantación las impurezas y la humedad descienden debido a la fuerza de la gravedad. Después de unas pocas semanas decantando, la dispersión y

la opalescencia desaparecen. Los decantadores metálicos de fondo cónico, como los de la Figura 2.28, se han diseñado para esta operación. El tiempo y la gravedad son los responsables de la eliminación de impurezas. Los depósitos deben estar limpios, ser aptos para almacenar alimentos y estar en condiciones adecuadas para protegerlos de la luz solar y del aire, y de los cambios bruscos de temperatura.



Figura 2.28. Decantadores de fondo cónico

Los decantadores o depósitos prebodega suelen estar situados dentro del cuerpo de fábrica, para evitar que sufran las inclemencias del tiempo, y su temperatura se mantenga estable. Se realizan purgas periódicas con el fin de eliminar los residuos que van decantando en el fondo del depósito y reducir el contacto de estos residuos con el AOVE. En esta etapa, el aceite de cada depósito constituye un lote definido y homogéneo.

2.2.6 Filtración

La filtración es una de las últimas etapas del proceso. Esta es de gran importancia para la obtención del producto final. En la filtración el AOVE pasa a través de materiales porosos, como, por ejemplo, tierra filtrante de diatomeas, o por tejidos, como lonas de material textil, fibras, papel o celulosas. Aquí quedan retenidas las impurezas que se desean eliminar. La filtración permite una adecuada presentación del aceite de oliva, previa al envasado (Bubola y Koprivnjak, 2015).

Según Brkić Bubola, Koprivnjak y Sladonja (2012) la filtración no influye en la puntuación sensorial del AOVE aunque causa algunos cambios leves en el perfil sensorial. Los investigadores Bottino, Capannelli, Mattei, Rovellini y Zunin (2008) usaron la microfiltración y la ultrafiltración con diferentes membranas comerciales aplicándola a la filtración del AOVE para eliminar algunos compuestos que son responsables del sabor desagradable del aceite sin alterar la composición del aceite.

La mayor concentración de la fracción polar (agua y sustancias solubilizadas) en el aceite de oliva sin filtrar puede aumentar la alteración del AOVE, afectando principalmente a la acidez libre, a los atributos sensoriales y a la formación de fenoles simples, por hidrólisis de sus derivados secoiridoides. Por esto, el AOVE sin filtrar puede disminuir su categoría de virgen extra a virgen con suma facilidad. La filtración ayuda a prolongar la vida útil de los aceites de oliva de alta calidad, sobre todo los menos estables, como los de la variedad Arbequina (Fregapane, Lavelli, León, Kapuralin y Salvador, 2006).

Según Lozano-Sánchez, Cerretani, Bendini, Segura-Carretero y Fernández-Gutiérrez (2010), durante la operación de filtrado se producen cambios cuantitativos y cualitativos, especialmente en componentes minoritarios, que son de gran valor para establecer la calidad del AOVE. El procedimiento de filtración, como paso final, es especialmente importante para la calidad del AOVE y la aceptación del consumidor. El comportamiento del contenido de polifenoles y agua en el proceso de filtración podría explicar la estabilidad oxidativa más baja del AOVE filtrado. Además, los resultados del análisis sensorial obtenidos por Lozano-Sánchez, Cerretani, Bendini, Gallina-Toschi, Segura-Carretero y Fernández-Gutiérrez (2012) confirmaron que la utilización de gases inertes usados como atmósfera protectora no afectaba a los atributos sensoriales del AOVE en la filtración.

2.2.7 Almacenamiento

Durante el almacenamiento, con una mala conservación, el aceite de oliva puede sufrir procesos de degradación que conduce a un nivel de calidad inferior. Con

aceites filtrados, sin agua ni materia orgánica en suspensión y en depósitos de material inerte, el principal problema que pueden sufrir los aceites es el de la oxidación y su posterior enranciamiento. La estabilidad oxidativa es uno de los parámetros más importantes para mantener la calidad del aceite de oliva, que afecta su aceptabilidad y valor de mercado. Son muchos los trabajos científicos que se han dedicado a evaluar las condiciones de almacenamiento del AOVE y cómo influyen en su composición (Vidal, Alcalá, de Torres, Moya y Espínola, 2019a; Sanaeifar, Jafari y Golmakani, 2018; Sanmartin et al., 2018; Brkic Bubola, Lukic, Mofardin, Butumovic y Koprivnjak, 2017; Hachicha Hbaieb, Kotti, Gargouri, Msallem y Vichi, 2016; Rodrigues, Dias, Veloso, Pereira y Peres, 2016; Lozano-Sánchez, Bendini, Quirantes-Piné, Cerretani, Segura-Carretero y Fernández-Gutiérrez, 2013).

Los procesos de oxidación involucran a los dobles enlaces de los ácidos grasos de los triglicéridos y favorecen la formación de radicales libres y la generación de sabores desagradables. Además, la presencia de compuestos oxidantes provoca la pérdida de antioxidantes y reduce las propiedades sensoriales y las propiedades beneficiosas para la salud humana, disminuyendo la categoría, el valor del producto y su aceptabilidad por parte del consumidor. Por lo tanto, se establecen algunas recomendaciones para el correcto almacenamiento de los aceites de oliva, limitar la exposición del producto a factores negativos como la luz, la alta temperatura, la presencia de oxígeno y de otros activadores, por ejemplo, clorofilas y metales de transición, y retardar el proceso de oxidación, con una incidencia positiva en la conservación adecuada a lo largo de la cadena de suministro o la vida útil del aceite. El COI recomienda una serie de pautas a seguir para garantizar que el aceite de oliva no pierda sus cualidades durante el almacenamiento en la “Guía de las mejores prácticas para el almacenamiento de aceites de oliva y aceites de orujo para el consumo humano” (COI, 2018).

Para el almacenamiento del aceite antes del embotellado se recomienda que la temperatura de la sala se mantenga entre 13 y 25 °C. Además, almacenar el aceite de oliva en tanques de acero inoxidable, saturando el espacio de cabeza con gases inertes (por ejemplo, nitrógeno o argón bajo una atmósfera controlada). Con esto

existe una mayor garantía de reducir la exposición del aceite al oxígeno del aire, evitando la oxidación de los lípidos con el oxígeno (COI, 2018).

Asimismo, los depósitos deben estar completamente limpios y sin presencia de algún agente extraño, como por ejemplo sedimentos. Se recomienda que se reduzca el tiempo de transporte del aceite a granel tanto como sea posible y evitar el calentamiento, exposición a la luz o al oxígeno del aire durante las operaciones de carga y descarga.

Algunas recomendaciones para el embotellado y embalaje incluyen mantener las salas de almacenamiento y de envasado con baja intensidad de luz y a temperaturas entre 13 y 25 °C. Se deben usar envases adecuados que protejan los aceites de la luz, por ejemplo, botellas de vidrio oscuro, latas, o fundas para proteger completamente las botellas de vidrio transparente de la luz, entre otras medidas. Mantener el espacio de cabeza del envase con gases inertes para evitar la oxidación. Es obligatorio establecer una fecha de caducidad apropiada, que es la fecha hasta la cual el producto conserva sus propiedades específicas, cuando se almacena y embotella adecuadamente. Por ejemplo, para el AOVE de la variedad Picual, se limita a 18 meses y en otros aceites menos estables, como el obtenido de la variedad Arbequina, se reduce a 3, 6 o 9 meses. La “fecha de consumir preferentemente antes de” debe indicarse de acuerdo con las legislaciones del país dónde se realice la venta (COI, 2018).

Algunas investigaciones ponen de manifiesto la importancia de las reacciones que sufren algunos compuestos dando compuestos no deseados en los aceites de oliva. Por ejemplo, el etanol es un sustrato para la síntesis química de los ésteres etílicos de ácidos grasos durante el almacenamiento de AOVE, cuyo contenido está oficialmente regulado. El contenido en ésteres etílicos puede controlarse fácilmente reduciendo al máximo, y en el menor tiempo posible desde la obtención de los aceites, el contenido en materia orgánica, fuente de etanol por fermentación, y de agua, que favorece la hidrólisis de los triglicéridos (Alcalá et al., 2017). El impacto que podría tener el contenido de etanol en la comercialización del aceite de oliva es elevado (García-Vico, Belaj, León, de la Rosa, Sanz y Pérez, 2018). La luz actúa como un catalizador provocando decoloración, formación de compuestos de

oxidación secundaria, alteración de sus propiedades organolépticas y pérdida de su contenido en vitamina E y fenoles. Por este motivo, el AOVE debe almacenarse en recipientes de vidrio oscuro, en condiciones de luminosidad limitada, para la conservación óptima de su calidad y su composición (de la Torre-Robles, Monteagudo, Mariscal-Arcas, Lorenzo-Tovar, Olea-Serrano y Rivas, 2019). La vida útil del AOVE está fuertemente influenciada por la composición inicial de éste, y en particular, por los niveles de sustancias antioxidantes y la composición de ácidos grasos (Di Serio, Giansante, Di Loreto y Di Giacinto, 2018).

Los compuestos fenólicos de la familia de secoiridoides generalmente se descomponen y se pierden en el transcurso del almacenamiento. La concentración de oleocantal en el AOVE disminuye durante el almacenamiento. La disminución de secoiridoides conlleva el aumento simultáneo de alcoholes fenólicos, como el hidroxitirosol, durante el almacenamiento. Los alcoholes fenólicos se forman por la degradación del ligustrósido y la oleuropeína y sus derivados, los secoiridoides (Cicerale, Conlan, Barnett y Keast, 2013).

2.3 Proceso de elaboración de aceite de oliva virgen. Laboratorio

Para la elaboración de aceite de oliva virgen en el laboratorio se utiliza normalmente una planta en discontinuo con una capacidad pequeña de procesado de aceitunas. El sistema denominado analizador de rendimientos Abencor (Martínez, Muñoz, Alba y Lanzón, 1975) es el más utilizado a escala de laboratorio para obtener aceites de oliva. Este sistema reproduce el proceso de una almazara industrial, pero a diferencia de esta, el proceso es discontinuo. El sistema Abencor lo componen el molino de martillos, la termobatidora y la centrífuga.

Las aceitunas son trituradas en el molino de martillos. La variable que se puede controlar en esta etapa es el diámetro del orificio de la criba. La Figura 2.29 contiene 3 imágenes del molino de martillos.

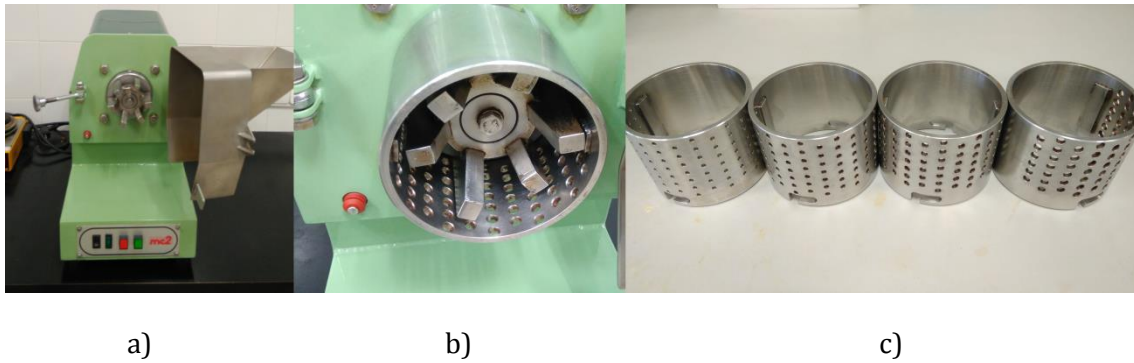


Figura 2.29. Molino de martillos del sistema Abencor: a) vista general del molino; b) vista detallada del molino, la criba y los martillos; c) cribas del molino con diferentes tamaños de orificio

La pasta molida se coloca en un cazo, como el de la Figura 2.30. Las paletas de agitación de la termobatidora se introducen en el cazo hasta el fondo para agitar la pasta de aceituna. Este cazo tiene una capacidad de 1 kg de pasta aproximadamente. Para que las paletas de agitación realicen un batido efectivo, la cantidad de pasta de aceituna debe estar comprendida entre 0,5 y 1 kg.



Figura 2.30. Detalle del cazo y las paletas de la termobatidora

La Figura 2.31 contiene una imagen de la termobatidora. Esta se compone de un baño de agua, un termostato para poder controlar la temperatura y las paletas de agitación. Además de la temperatura, se puede controlar el tiempo de batido en la termobatidora; la adición de agua, para ajustar la humedad, y la adición de coadyuvante, para mejorar la eficacia de extracción del proceso.



Figura 2.31. Termobatidora del sistema Abencor

Una vez que la pasta de aceituna ha sido batida con unas condiciones determinadas, esta se introduce en la centrífuga, que se muestra en la Figura 2.32. La centrífuga alcanza unas 3500 r.p.m., aproximadamente. En esta etapa se puede controlar el tiempo de permanencia de la pasta dentro de la centrífuga y la adición de agua.



Figura 2.32. Centrífuga del sistema Abencor

Por último, una vez la pasta se ha centrifugado, la parte sólida se adhiere a las paredes de la centrífuga y la parte líquida se desplaza hacia el fondo. En este existe una apertura por donde la fase líquida baja hasta una probeta graduada. La fase líquida recogida se deja decantar para que haya una buena separación entre ambas fases. El aceite de oliva queda en la probeta sobrenadando sobre el agua y algunos restos de la pasta.

2.4 Aceite de oliva

El AOVE es conocido desde la antigüedad, siendo un pilar básico de la dieta mediterránea. El olivo silvestre apareció en el Paleolítico en la cuenca mediterránea, pero es en el Neolítico cuando se empieza a cultivar (Liphshitz, Gophna, Hartman y Biger, 1991). Ya desde entonces, se conocen y se aprovechan sus propiedades beneficiosas. El AOVE es el mosto oleoso procedente de la aceituna, el fruto proveniente del olivo (*Olea europaea* L.) y es extraído únicamente mediante procesos físicos y mecánicos. No se utiliza ningún producto químico o bioquímico en su extracción, por lo que se puede consumir sin ningún tratamiento adicional, es totalmente natural y, si además procede de frutos sanos con una buena calidad tendrá unas características organolépticas excepcionales. El AOVE conserva todo su contenido en ácidos grasos esenciales, vitaminas y otros productos naturales de gran importancia nutricional y funcional.

La definición de aceite de oliva según el Reglamento Europeo CEE (1991) y el COI (2016) es: “Aceite obtenido a partir del fruto del olivo (*Olea europaea* L.) únicamente por procedimientos mecánicos u otros procedimientos físicos, en condiciones, especialmente térmicas, que no ocasionen la alteración del aceite y que no hayan sufrido tratamiento alguno distinto del lavado, la decantación, el centrifugado y la filtración, con exclusión de los aceites obtenidos mediante disolvente o por procedimiento de reesterificación y de cualquier mezcla con aceites de otra naturaleza”.

El aceite de oliva es una grasa líquida a temperatura ambiente, que proviene de una fuente vegetal. Los lípidos son necesarios y son sustento para la vida. Destacan por su función de aporte energético para el organismo. Además, los lípidos ejercen

funciones biológicas de gran importancia, forman parte de las paredes celulares y sirven como estructura para las células, favorecen la absorción de vitaminas liposolubles, están ligados al transporte y son precursores de algunas hormonas, entre otras funciones. En una dieta equilibrada se recomienda tener una ingesta diaria de lípidos que no debe superar el 30 % del total de la energía de la dieta. Se recomienda no tomar más de 7-8 % de ácidos grasos saturados, entre 15-20 % de ácidos grasos monoinsaturados, y alrededor de 5 % de ácidos grasos poliinsaturados, incorporando alrededor de un 2 % de ácidos grasos esenciales como ácido linoleico y linolénico, ambos presentes en el aceite de oliva (OMS, 2018). El aceite de oliva tiene la proporción justa en ácidos grasos para cumplir con los porcentajes exactos de la ingesta diaria de grasas. Otra ventaja de consumir aceite de oliva, es que debido a su procedencia vegetal, posee esteroides pero no colesterol.

2.4.1 Clasificación de los aceites de oliva

La clasificación según el Reglamento (CEE, 2016), siendo la modificación más reciente de los anteriores reglamentos que existen con el título “relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis”, establece 8 categorías de aceite de oliva, clasificadas según sus características de calidad y pureza. En la Tabla 2.3 están recogidas todas las categorías según sus características de calidad. Esta clasificación categoriza a los aceites de oliva según el cumplimiento de unos límites de los parámetros de calidad establecidos para cada categoría.

Cabe destacar que el AOVE y AOV son aptos para el consumo humano tal y como se producen; el quinto y el octavo son aceites refinados encabezados con aceite virgen y, junto con los dos vírgenes anteriores, también son comestibles. Los dos crudos, el tercero y el sexto, son aceites que es necesario refinar y el cuarto y el séptimo son los correspondientes refinados. El incumplimiento de cualquier límite cambia la categoría del aceite de oliva a otra inferior, hasta quedar en una categoría donde esté dentro de todos los límites establecidos.

Tabla 2.3. Categorías de los aceites de oliva según sus características de calidad (CEE, 2016)

Categoría	Acidez (%)	Índice de peróxidos (mEq O ₂ /kg)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	ΔK	Mediana del defecto	Mediana del frutado	Ésteres etílicos de ácidos grasos
Aceite de oliva virgen extra	≤ 0,8	≤ 20	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0	≤ 35
Aceite de oliva virgen	≤ 2,0	≤ 20	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 3,5	Mf > 0	-
Aceite de oliva lampante	> 2,0	-	-	-	-	Md > 3,5	-	-
Aceite de oliva refinado	≤ 0,3	≤ 5	-	≤ 1,25	≤ 0,16	-	-	-
Aceite de oliva compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes	≤ 1,0	≤ 15	-	≤ 1,15	≤ 0,15	-	-	-
Aceite de orujo de oliva crudo	-	-	-	-	-	-	-	-
Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,3	≤ 5	-	≤ 2,00	≤ 0,20	-	-	-
Aceite de orujo de oliva	≤ 1,0	≤ 15	-	≤ 1,70	≤ 0,18	-	-	-

Existen otros criterios de pureza, para confirmar que el aceite de oliva no ha sido mezclado con otro tipo de aceites. Algunos de los parámetros a tener en cuenta para la pureza de los aceites de oliva son el contenido de ácidos grasos (%), total de isómeros transoleicos (%), estigmastadienos (%), diferencia entre ECN42 (HPLC) y ECN42 (cálculo teórico), monopalmitato de 2-glicerilo (%), brasicasterol (%), campesterol (%), estigmasterol (%), β -sitosterol aparente (%), Δ -7-estigmastenol (%), esteroides totales (mg/kg), eritrodil y uvaol (%) y ceras (mg/kg). Estos parámetros de pureza se analizan si se sospecha que el aceite de oliva pueda estar adulterado con mezclas con otros aceites. Para cada parámetro de pureza existen unos límites recogidos en el Reglamento de la UE similares a los recogidos para los parámetros de calidad.

2.4.2 Parámetros de calidad

Los parámetros de calidad se determinan para clasificar el aceite de oliva según los resultados obtenidos. Acidez, índice de peróxidos, K_{232} , K_{270} , ΔK , mediana del defecto, mediana del frutado y ésteres etílicos de ácidos grasos son los parámetros que se tienen en cuenta para su clasificación y tienen unos límites para cada tipo, según el Reglamento (CEE, 2016), detallados en la Tabla 2.3.

a) Acidez

La acidez cuantifica la cantidad de ácidos grasos libres, expresada en porcentaje de ácido oleico, presentes en el aceite de oliva. Los triglicéridos son neutros, es decir, tienen 0 % de acidez libre. La presencia de ácidos grasos libres indica un posible mal estado de los frutos o una mala conservación. Por encima de ciertos límites, es un parámetro negativo para su empleo en la alimentación. Un aceite de alta calidad tiene una acidez muy baja, en torno a 0,1-0,2 % de acidez. Esto indica un perfecto estado y una manipulación correcta de los frutos. Aunque según la normativa de la UE, el AOVE puede llegar a 0,8 %. El límite para el consumo humano es hasta 2 % de acidez.

b) *Índice de peróxidos*

Este parámetro determina el estado de oxidación primaria de un aceite de oliva. Las grasas, al oxidarse por el contacto con el oxígeno, forman los peróxidos, considerados productos de la oxidación primaria. También puede indicar el deterioro sufrido por ciertos componentes como la vitamina E. Su resultado se expresa en miliequivalentes de oxígeno por kilogramo de aceite. Su límite máximo para el consumo como AOVE y AOV es de 20 mEq O₂/kg de aceite de oliva.

c) *Absorbancia en el ultravioleta*

Esta determinación se fundamenta en la medida espectrofotométrica de la absorbancia en el rango del ultravioleta (UV) del coeficiente de extinción a las longitudes de onda de 232 y 270 nm.

El K₂₃₂ indica la oxidación primaria del aceite de oliva, similar al índice de peróxidos. Se determina la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de 232 nm.

El K₂₇₀ detecta un estado oxidativo secundario, más avanzado. Para obtener el valor de K₂₇₀ se mide la absorbancia a la longitud de onda de 270 nm. Los compuestos de la oxidación primaria se modifican obteniéndose α -dicetonas o cetonas α -insaturadas que absorben luz a la longitud de onda de 270 nm. Generalmente, para los aceites obtenidos de frutos sanos y por procesos físicos, su valor suele ser inferior a los límites establecidos. Valores elevados de K₂₇₀ están relacionados con la oxidación y la refinación de los aceites.

El Delta K (ΔK) expresa la variación del coeficiente de extinción a la longitud de onda de 270 nm. Este parámetro se calcula restando a K₂₇₀ la semisuma de K₂₇₄ y K₂₆₆. Es un parámetro incluido en los criterios de calidad, pero se utiliza como criterio de pureza, para detectar mezclas con aceites refinados. Para el AOVE y AOV su valor va a ser cero o muy próximo.

d) *Ésteres etílicos de ácidos grasos*

Los ésteres etílicos de los ácidos grasos se analizan siguiendo el método propuesto en el Reglamento CEE (2011). En este reglamento se añadió un nuevo parámetro de calidad para los AOVE, el contenido de ésteres etílicos de ácidos grasos, que sus siglas en inglés son FAAE. Estos son una familia de lípidos neutros naturales presentes en los aceites de oliva y formados por esterificación de ácidos grasos libres con alcoholes de bajo peso molecular, como el etanol, que se obtiene por fermentación de la materia orgánica acumulada en los equipos o en suspensión en los aceites. La mala calidad de las aceitunas y las prácticas inadecuadas durante el proceso de extracción del aceite de oliva causan su formación (Jiménez y Carpio, 2002).

e) *Análisis sensorial: mediana del frutado y del defecto*

La mediana del atributo frutado debe tener un valor positivo para el AOVE y AOV. La mediana de los defectos debe ser nula para el AOVE. Por el contrario, para el AOV la mediana del defecto debe ser inferior o igual a 3,5 puntos.

El análisis sensorial se usa para evaluar los caracteres organolépticos de un alimento, en este caso particular, el aceite de oliva. El análisis químico no puede predecir de forma absoluta la calidad, debido a que existen multitud de compuestos dentro del aceite de oliva. Además, estos tienen interacciones complejas y desconocidas (Jiménez et al., 2002). El AOVE es el único alimento que necesita la evaluación sensorial para definir sus categorías de calidad. Este análisis sensorial debe estar realizado por un panel de expertos catadores, siendo el único método oficial reconocido por la normativa UE y el COI. El Reglamento CEE (2013c) y el COI (2005) describen como realizar el análisis sensorial, el vocabulario a utilizar, la técnica y como deben ser las instalaciones. El panel de cata debe estar constituido por un conjunto de 8 a 12 personas. Los catadores deben estar entrenados para identificar y medir la intensidad de las diferentes sensaciones positivas y negativas percibidas. Existe una hoja estándar para anotar la puntuación sobre las sensaciones percibidas por el catador (Conte et al., 2019).

Se entiende por flavor el conjunto complejo de las propiedades olfatogustativas, combinación de olor y sabor, perceptibles durante la cata, y que puede ser influido por propiedades táctiles, cinestésicas, térmicas o álgicas (COI, 2007). La evaluación organoléptica es tanto cualitativa como cuantitativa, ya que su aplicación resulta en la clasificación de muestras en función del atributo y su intensidad. En consecuencia, los catadores deben ser supervisados para una correcta clasificación y para un correcto reconocimiento de las intensidades de los atributos percibidos. Se recomienda una cantidad máxima de cuatro muestras por cada sesión para el panel de cata. Además, se determina un máximo de tres sesiones por día.

Un AOVE obtenido de aceitunas solo por procesos físico-mecánicos tiene un perfil sensorial fuertemente vinculado a la calidad de la materia prima (Conte et al., 2019). De hecho, cualquier daño a las aceitunas y la subsiguiente actividad de microorganismos y enzimas, pueden desencadenar la hidrólisis y la oxidación de los ácidos grasos, la fermentación de azúcares y la degradación de aminoácidos, produciendo moléculas no deseadas que afectan el perfil de composición del AOVE, principalmente a los compuestos fenólicos y volátiles (Cayuela, Gómez-Coca, Moreda y Pérez-Camino, 2015; Angerosa, Servili, Selvaggini, Taticchi, Esposto y Montedoro, 2004).

En el AOVE solo se pueden detectar atributos sensoriales positivos. Si se detectan atributos negativos, el aceite pasa a la categoría de AOV. Los atributos positivos descritos por (CEE, 2013c) son los siguientes: frutado, amargo y picante. Estos atributos están asociados a AOVes procedentes de aceitunas sanas y en un estado de madurez óptimo.

Los atributos negativos o defectos también están asociados con la oxidación química y con la actividad de enzimas exógenas provocada por el ataque de mohos y bacterias (Angerosa, 2002; Kalua, Allen, Bedgood Jr, Bishop, Prenzler y Robards, 2007). Utilizando aceitunas de baja calidad, los aceites de oliva contienen altas concentraciones de octano, 3-metilbutanol, 2-metilpropanol, etanol, ácido acético y acetato de etilo, detectándose defectos como el atrojado y avinado (Morales y Tsimidou, 2003).

Según el Reglamento CEE (2013c) los atributos o defectos negativos son los enumerados a continuación: atrojado-borras, moho-humedad, avinado-avinagrado, ácido-agrio, metálico, rancio, cocido o quemado, heno-madera, basto, lubricante, alpechín, salmuera, esparto, tierra, gusano, pepino y madera húmeda.

2.4.3 Normativa vigente

La legislación que rige las características y comercialización del aceite de oliva está dividida por áreas de influencia. En el caso de España, existe una legislación a nivel estatal, que es paralela a la de nivel europeo. Los reglamentos de la Unión Europea son de obligado cumplimiento dentro del área de la UE y deben ser aplicados sin ningún otro procedimiento por parte de los países miembros. A nivel internacional, el Consejo Oleícola Internacional (COI) o por sus siglas en inglés, International Olive Council (IOC), está a cargo de la elaboración de normas y guías que son aplicadas fuera de la UE por un gran número de países. Similar es el caso de las Normas del *Codex Alimentarius*. Las normas del *Codex Alimentarius* están desarrolladas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y por la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). A diferencia de los Reglamentos de la UE, el uso de estas normas no es estrictamente obligatorio: si un operador de la UE no respeta un reglamento de la UE, puede sufrir una penalización; mientras que el uso de las normas del COI y del *Codex Alimentarius* no es obligatorio. Estos dos últimos estándares se adoptan sobre la base de un consenso, de modo que se debe esperar que cualquiera que lo firme lo respete; sin embargo, el COI y el *Codex* no están en condiciones de aplicar sanciones si un miembro no aplica sus normas. Conte et al. (2019) realiza un análisis muy actual sobre la legislación de la UE respecto al aceite de oliva. Al mismo tiempo, propone soluciones analíticas más eficientes para reducir el tiempo y el consumo de disolventes, destaca las debilidades y propone posibles soluciones para proteger al consumidor y proteger el mercado de aceite de oliva.

a) Legislación en España

La legislación a nivel español referente al aceite de oliva está recogida en el siguiente real decreto:

- Real Decreto 1716/2010, de 17 de diciembre, por el que se modifica el Real Decreto 308/1983, de 25 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles.

La legislación que regula el análisis sensorial de los aceites es la siguiente:

- Real Decreto 227/2008, de 15 de febrero, por el que se establece la normativa básica referente a los paneles de catadores de aceite de oliva virgen.

La legislación que regula los aditivos alimentarios y los coadyuvantes tecnológicos es la siguiente:

- Real Decreto 1466/2009, de 18 de septiembre, por el que se establecen las normas de identidad y pureza de los aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes utilizados en los productos alimenticios.
- Real Decreto 640/2015, de 10 de julio, por el que se aprueba la lista de coadyuvantes tecnológicos autorizados para la elaboración de aceites vegetales comestibles y sus criterios de identidad y pureza, y por el que se modifica el Real Decreto 308/1983, de 25 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles.

Además, existe un real decreto para regular las Denominaciones de Origen e Indicaciones Geográficas Protegidas de los alimentos.

- Real Decreto 267/2017, de 17 de marzo, por el que se desarrolla la Ley 6/2015, de 12 de mayo, de Denominaciones de Origen e Indicaciones Geográficas Protegidas de ámbito territorial supraautonómico, y por el que se desarrolla la Ley 12/2013, de 2 de agosto, de medidas para mejorar el funcionamiento de la cadena alimentaria.

Por último, se recoge la legislación referente a comercialización de los aceites de oliva:

- Real Decreto 895/2013, de 15 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 1431/2003, de 21 de noviembre, por el que se establecen determinadas medidas de comercialización en el sector de los aceites de oliva y del aceite de orujo de oliva.
- Orden AAA/1749/2014, de 18 de septiembre, por la que se extiende el acuerdo de la Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español al conjunto del sector y se fija la aportación económica obligatoria para realizar actividades de promoción del aceite de oliva, mejorar la información y conocimiento sobre las producciones y los mercados y realizar programas de investigación y desarrollo, innovación tecnológica y estudios, durante las campañas 2014/2015 a 2018/2019.
- Real Decreto 861/2018, de 13 de julio, por el que se establece la normativa básica en materia de declaraciones obligatorias de los sectores del aceite de oliva y las aceitunas de mesa y por el que se modifica el Real Decreto 772/2017, de 28 de julio, por el que se regula el potencial de producción vitícola.

b) Legislación a nivel europeo

A nivel europeo, la legislación viene dada por reglamentos. Estos se van actualizando a lo largo del tiempo. El reglamento más importante relativo a los aceites de oliva es el siguiente:

- Reglamento (CEE) n.º 2568/1991 de la Comisión, de 11 de julio de 1991, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

Y su última actualización:

- Reglamento (UE) 2095/2016 de la Comisión, de 26 de septiembre de 2016, que modifica el Reglamento (CEE) n.º 2568/91, relativo a las características de

los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

La legislación relativa a los aditivos y los coadyuvantes que se pueden usar en el proceso de elaboración del aceite de oliva son los siguientes:

- Reglamento (UE) 1333/2008 del parlamento europeo y del consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios.
- Reglamento (UE) 1308/2013 del parlamento europeo y del consejo, de 17 de diciembre de 2013, por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios y por el que se derogan los Reglamentos (CEE) nº 922/72, (CEE) nº 234/79, (CE) nº 1037/2001 y (CE) nº 1234/2007.

La legislación europea establece algunas declaraciones de propiedades saludables. En el caso del aceite de oliva, sólo se puede declarar una propiedad saludable atribuida a los compuestos fenólicos presentes en su composición.

- Reglamento (UE) 432/2012 del parlamento europeo y del consejo, de 16 de mayo de 2012, por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños.

La legislación europea también regula las normas de comercialización relativas al aceite de oliva, por medio del siguiente reglamento:

- Reglamento (UE) 1096/2018 de la Comisión, de 22 de mayo de 2018, que modifica el Reglamento de Ejecución (UE) nº 29/2012 sobre las normas de comercialización del aceite de oliva.

c) Legislación a nivel internacional

La norma aplicable a aceites de oliva y aceites de orujo por parte del COI es la siguiente, en inglés: *Trade standard applying to olive oils and olive pomace*. COI/T.15/NC No 3/Rev. 12, June 2018.

Para el análisis sensorial existen varias normas del COI:

- COI/T.20/Doc. nº 4 “Análisis sensorial: vocabulario general básico”.
- COI/T.20/Doc. nº 13 “Metodología general para la valoración organoléptica del aceite de oliva virgen”.
- COI/T.20/Doc. nº 14 “Guía para la selección, el entrenamiento y el control de los catadores cualificados de aceite de oliva virgen”.
- COI/T.20/Doc. nº 15 “Valoración organoléptica del aceite de oliva virgen”.

La norma del *Codex Alimentarius* para aceite de oliva es CODEX STAN 33–1981, revisada en 2017, “Norma para los aceites de oliva y aceites de orujo”. La norma del *Codex* tiene una estructura única: algunas características esenciales de pureza y calidad se fijan como obligatorias, mientras que, para un número de características adicionales, la adopción por parte de un miembro es voluntaria. Esta norma es similar a la norma del COI anteriormente citada.

2.4.4 Composición del aceite de oliva

Existe una base de datos, *OliveNet*, que contiene un catálogo completo de 752 compuestos identificados a partir de matrices del olivo, incluyendo la aceituna, la hoja y el AOVE, así como en las aguas residuales y orujo acumulados durante la producción (Bonvino et al., 2018). Fundamentalmente, el AOVE se compone de dos grupos de compuestos. Comúnmente, son nombrados en función de su abundancia en el aceite. Se le denomina compuestos mayoritarios porque están en una proporción de aproximadamente entre 97-99 %. También se les denominan saponificables, debido a que reaccionan con hidróxido sódico para generar las correspondientes sales de ácidos grasos o jabones. Los compuestos mayoritarios se componen principalmente por los triglicéridos, aunque también existe una pequeña porción formada por ácidos grasos libres, monoglicéridos y diglicéridos.

Los compuestos minoritarios están en una proporción entre 1-3 %. Engloban el resto de compuestos, siendo un grupo muy heterogéneo. Se denominan insaponificables porque no se pueden saponificar. La Figura 2.33 recoge los grupos y los porcentajes medios de cada uno dentro de la composición global.

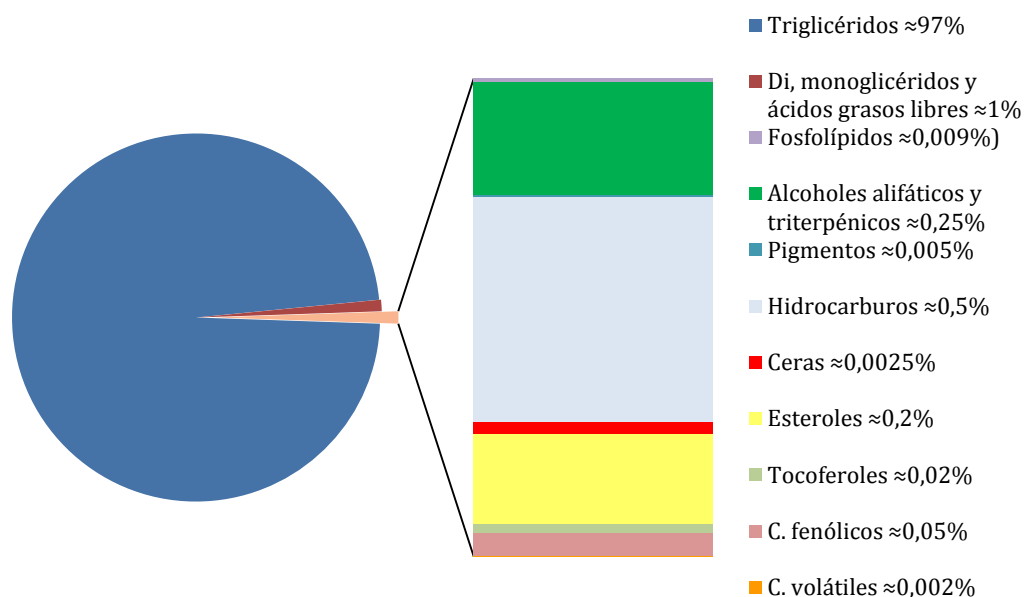


Figura 2.33. Grupos de compuestos del aceite de oliva

Los triglicéridos son ésteres de la glicerina y los ácidos grasos. En la Figura 2.34 se representa la reacción de esterificación entre una molécula de glicerina y tres ácidos grasos diferentes. R_1 , R_2 y R_3 son las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos. En esta reacción se liberan tres moléculas de agua. La reacción es reversible, es decir, el triglicérido puede pasar a diglicérido o monoglicérido o a su estado original, dejando los ácidos grasos libres en el aceite de oliva.

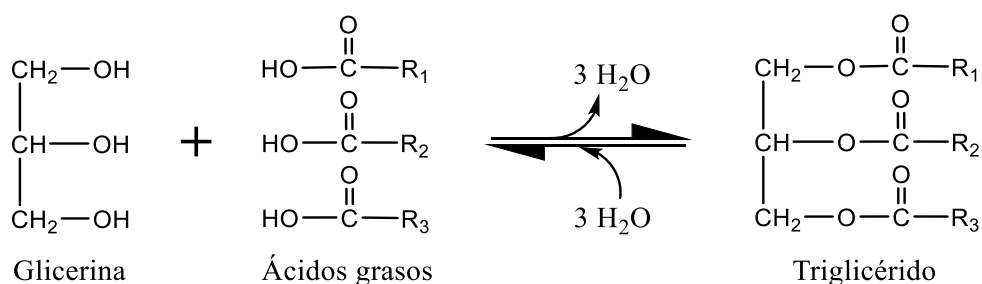


Figura 2.34. Formación de un triglicérido mediante esterificación

Los compuestos minoritarios del aceite de oliva forman un grupo heterogéneo, insaponificable, que constituyen una parte muy pequeña, en torno a 1-3 %, de la composición del AOVE. Estos son ceras, esteroides, tocoferoles, hidrocarburos, alcoholes alifáticos, clorofilas, compuestos fenólicos, carotenoides, compuestos volátiles. Entre los hidrocarburos cabe destacar un terpeno, el escualeno, por ser un precursor bioquímico de la biosíntesis de los esteroides. El β -caroteno es un

precursor de la vitamina A. Los esteroides es un grupo amplio de compuestos, destacando el campesterol, estigmasterol, β -sitosterol, avenasterol y estigmastadienol. Estos esteroides son característicos de cada aceite y sirven para detectar mezclas fraudulentas de aceites (de Torres-Sánchez, 2013).

Los tocoferoles confieren estabilidad al aceite de oliva. El compuesto α -tocoferol es el componente mayoritario de este grupo. Estos compuestos están relacionados con la actividad de la vitamina E, siendo esta una vitamina liposoluble.

El color del aceite de oliva puede variar dependiendo de la variedad y del estado de madurez del fruto, desde verde-amarillento hasta amarillo-dorado. Los pigmentos presentes en el aceite van a variar según estos factores. El color verde está relacionado con las clorofilas. Otros pigmentos son los carotenoides, la cantidad de estos pigmentos va a estar condicionada por los procesos de elaboración de aceite de oliva. Las ceras son ésteres de alcoholes grasos con ácidos grasos. El contenido de estas es muy bajo. Por el contrario los aceites de orujo tienen un contenido muy alto en ceras, lo que hace posible poder diferenciar los aceites de oliva vírgenes de los aceites de orujo (Fernández-Valdivia, 2009).

La calidad y composición del AOVE depende de las reacciones físicas, químicas y bioquímicas que ocurren durante el proceso de elaboración. Este proceso modifica principalmente la composición cualitativa y cuantitativa de los compuestos volátiles y fenólicos. Una elección estratégica y un uso apropiado de los diferentes dispositivos que componen la planta de extracción de AOVE y de los parámetros tecnológicos permite enfatizar o inhibir las actividades de las enzimas endógenas presentes en los tejidos de la aceituna. Estas opciones modifican las propiedades nutricionales y sensoriales del producto final. Esto requiere un conocimiento profundo sobre la forma de modular estas actividades enzimáticas. De hecho, las actividades de las enzimas pueden verse influenciadas por la combinación de diferentes dispositivos, seleccionando solo algunas partes de las drupas o regulando varios factores como la temperatura, el tiempo, las cantidades de agua de procesamiento y el oxígeno. Además, todas las demás operaciones del proceso de extracción, como la separación de aceite, la clarificación, la filtración, el almacenamiento y el embotellado pueden comprometer los efectos resultantes de

las mejores condiciones de extracción estratégicamente elegidas (Clodoveo, Hbaieb, Kotti, Mugnozza y Gargouri, 2014).

Algunos estudios recientes, como los de Lukić, Krapac, Horvat, Godena, Kosić y Brkić Bubola (2018), Vidal et al. (2018) y Vidal, Alcalá, de Torres, Moya y Espínola (2018a) se centran en obtener una composición equilibrada entre los diferentes compuestos minoritarios del AOVE.



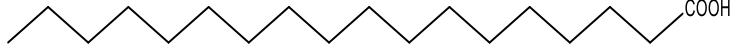
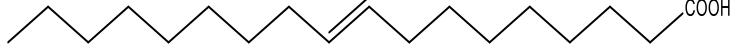
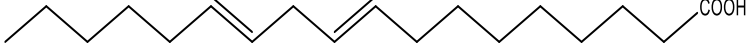
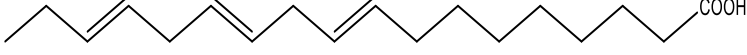

a) *Ácidos grasos*

Los ácidos grasos son ácidos orgánicos y están formados por una cadena lineal hidrocarbonada con un grupo carboxilo en la posición uno de la cadena. Generalmente, los ácidos grasos presentes en el aceite de oliva son de número par de carbonos, contienen entre 16 y 24 átomos de carbono, pudiendo ser saturados e insaturados. Dependiendo de la existencia o no de dobles enlaces en las cadenas, existen diferentes tipos. Los ácidos grasos son saturados (SFA), si la cadena no contiene ningún doble enlace. Por el contrario, los ácidos grasos con algún doble enlace se denominan ácidos grasos insaturados. Estos se dividen según el número de dobles enlaces. Los ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) tienen un doble enlace en la posición 9. Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) tienen varios dobles enlaces en su estructura, contando a partir de la posición 9 y sumando 3 al carbono anterior.

A continuación se indican los nombres de los ácidos grasos presentes en el AOVE, con el número de carbonos de cada compuesto y el número de insaturaciones: ácido palmítico o ácido hexadecanoico (C16:0); ácido palmitoleico o ácido *cis*-9-hexadecenoico (C16:1); ácido margárico o ácido heptadecanoico (C17:0); ácido margaroleico o ácido *cis*-10-heptadecenoico (C17:1); ácido esteárico o ácido octadecanoico (C18:0); ácido oleico o ácido *cis*-9-octadecenoico (C18:1); ácido linoleico o ácido *cis*-9,12-octadecadienoico (C18:2); ácido linolénico ácido *cis*-9,12,15-octadecatrienoico (C18:3); ácido araquídico o ácido eicosanoico (C20:0); ácido *cis*-13-eicosenoico (C20:1); ácido behénico o ácido docosanoico (C22:0); y el ácido lignocérico o ácido tetracosanoico (C24:0). En la Tabla 2.4 se recogen los principales ácidos grasos del aceite de oliva y la representación de sus estructuras.

Los dobles enlaces que presentan los ácidos grasos del aceite crudo siempre tienen una configuración *cis*, lo que hace que ambas ramas del doble enlace se giren en la misma dirección, aunque se representan gráficamente como si fuesen lineales.

Tabla 2.4. Principales ácidos grasos presentes en el aceite de oliva

Compuesto	Representación lineal
Ácido palmítico (C16:0)	
Ácido palmitoleico (C16:1)	
Ácido esteárico (C18:0)	
Ácido oleico (C18:1)	
Ácido linoleico (C18:2)	
Ácido linolénico (C18:3)	
Ácido araquídico (C20:0)	

Los ácidos grasos de las moléculas mono, di y triglicéridos pueden ser liberados por hidrólisis, incrementando la acidez en los aceites. Legalmente, el AOVE no debe tener gran cantidad de ácidos grasos libres, < 0,8 % de acidez, pero lo más normal es que la acidez libre sea inferior a 0,4 % y mayoritariamente inferior al 0,2 %.

Los ácidos grasos se determinan mediante cromatografía de gases (CG) según el Reglamento de la UE (CEE, 1991). Este método se basa en la metilación de los ácidos grasos y su posterior análisis. Se realiza una separación cromatográfica y se cuantifica la señal de los compuestos con la ayuda de un detector, pudiendo ser, por ejemplo, un detector de ionización de llama (FID).

b) *Compuestos volátiles*

Dentro del grupo de compuestos minoritarios cabe destacar el de compuestos volátiles. Se han identificado más de 100 compuestos volátiles en el aceite de oliva (Morales, Aparicio-Ruiz y Aparicio, 2013). Estos compuestos le van a conferir al aceite de oliva su olor y flavor característico. Están relacionados directamente con los atributos sensoriales, jugando un papel importante en el gusto del consumidor,

ya que son fundamentales para la percepción de la calidad del producto por parte de estos, y los definen y diferencian de otros aceites. Estos compuestos no tienen su origen en la aceituna, sino que se forman durante el proceso de elaboración. La mayor parte son formados a través de la acción de enzimas que se liberan durante la molturación de las aceitunas, actuando principalmente durante el batido. La formación de los compuestos volátiles involucra varias rutas. Una de ellas es la ruta de la lipoxigenasa (LOX), en la cual se transforman los ácidos grasos insaturados, linolénico y linoleico, en compuestos de seis y cinco átomos de carbono que contribuyen a los aromas agradables característicos de los aceites vírgenes extra. Existe una amplia variedad de compuestos volátiles responsables del aroma en el aceite de oliva. Los grupos funcionales de estos compuestos son alcohol, aldehído y cetona, algunos de ellos representados con su estructura molecular en la Figura 2.35.

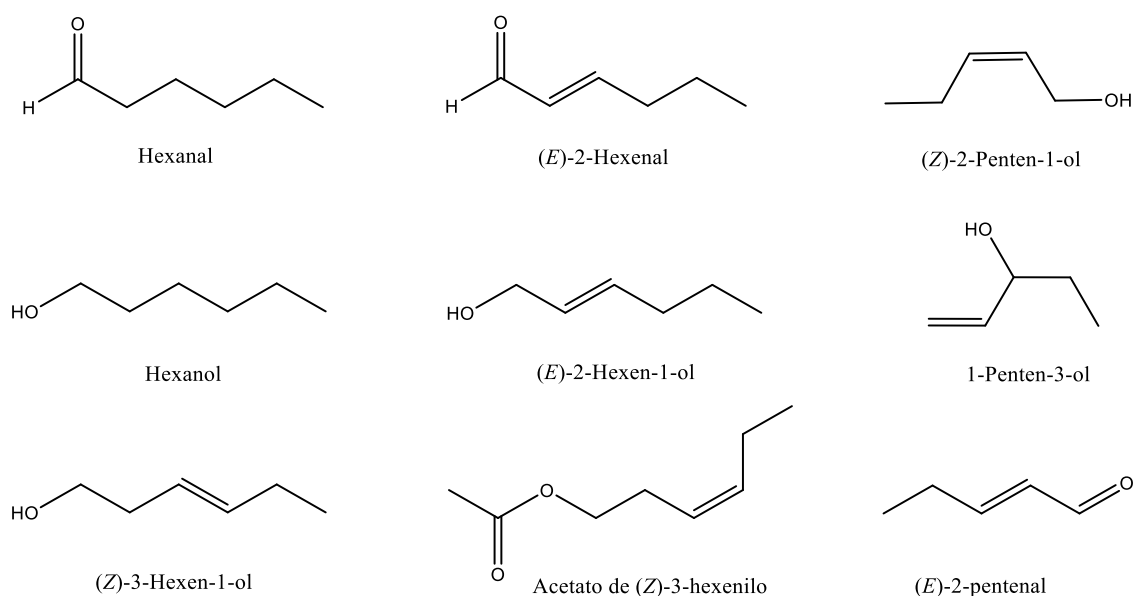


Figura 2.35. Representación molecular de varios compuestos volátiles

Alcoholes como el hexanol, (*Z*)-3-hexenol y (*E*)-2-hexenol; aldehídos como el hexanal, (*Z*)-3-hexenal y (*E*)-2-hexenal; y el éster, acetato de (*Z*)-3-hexenilo, constituyen entre 60 y 80 %, aproximadamente, del total de compuestos volátiles, siendo el (*E*)-2-hexenal el componente mayoritario (Sánchez y Salas, 2003). Influyen muchos factores, desde los agronómicos y climáticos hasta los tecnológicos, en la composición y concentración de estos compuestos (Espínola-Lozano, 2015). No todos los compuestos volátiles contribuyen de la misma forma

al aroma, por lo tanto, una mayor concentración de compuestos volátiles no implica necesariamente una mayor contribución al aroma, ya que pueden tener una concentración inferior al umbral del olor que puede percibir el ser humano. Generalmente, tienen alta volatilidad, ya que tienen una masa molecular baja, y son solubles en aceite (Angerosa, Mostallino, Basti y Vito, 2000).

Los compuestos volátiles presentes en el aceite de oliva son suficientemente volátiles para alcanzar el epitelio olfativo y disolverse en la mucosidad que cubre las células olfativas sensibles. Los atributos sensoriales que percibe el ser humano se pueden relacionar con los compuestos volátiles presentes en el AOVE. Una descripción del papel que tienen algunos de estos compuestos en el aroma del aceite ha sido recogida por varios autores, como (Espínola-Lozano, 2015; Kalua et al., 2007; Angerosa et al., 2004). En la Tabla 2.5 se muestra una recopilación de los compuestos más significativos y su descripción sensorial.

Tabla 2.5. Descripción sensorial de algunos volátiles presentes en el AOVE

Compuesto	Descripción sensorial	Compuesto	Descripción sensorial
Aldehídos		Alcoholes	
Pentanal	Amargo, aceitoso, leñoso	Etanol	Alcohol
(<i>E</i>)-2-Pentenal	Verde, manzana	Pentanol	Frutado
(<i>Z</i>)-2-Pentenal	Verde	(<i>Z</i>)-2-Pentanol	Banana
Hexanal	Verde manzana, herbáceo	1-Penten-3-ol	Tierra húmeda
(<i>Z</i>)-3-Hexenal	Verde	Hexanol	Fruta, banana, césped
(<i>E</i>)-2-Hexenal	Verde manzana, almendra amarga	(<i>E</i>)-2-Hexenol	Césped, hojas
Heptanal	Aceite, grasa, leñoso	(<i>Z</i>)-2-Hexenol	Fruta verde
Octanal	Graso, agudo	(<i>E</i>)-3-Hexenol	Verde
Nonanal	Graso, cera, picante	(<i>Z</i>)-3-Hexenol	Verde, hoja
Ésteres		Cetonas	
Acetato de (<i>Z</i>)-3-hexenilo	Verde	1-Penten-3-ona	Verde

Como consecuencia de un almacenamiento durante un tiempo prolongado de la aceituna y del aceite se produce una disminución de los aldehídos, alcoholes y ésteres, consecuencia negativa para el producto final, ya que va a perder los atributos sensoriales positivos. En cambio, aparecen compuestos carbonílicos,

aldehídos y alcoholes ramificados, con siete o más átomos de carbono, los cuales son atributos sensoriales negativos que caracterizan el mal olor del aceite (Kalua et al., 2007). Existen cuatro vías oxidativas para degradar biológicamente los ácidos grasos que forman los lípidos. No obstante, la ruta de la lipoxigenasa (LOX) es la responsable de la generación de los compuestos volátiles más importante, y por esto es la más relevante para el AOVE (Sánchez y Salas, 2003), en la Figura 2.36 se muestra dicha ruta. El mecanismo se inicia por la introducción de una molécula de oxígeno en un enlace doble de un ácido graso poliinsaturado para generar un hidroperóxido del ácido graso. Este es un punto importante de ramificación de la ruta para poder formar diferentes compuestos.

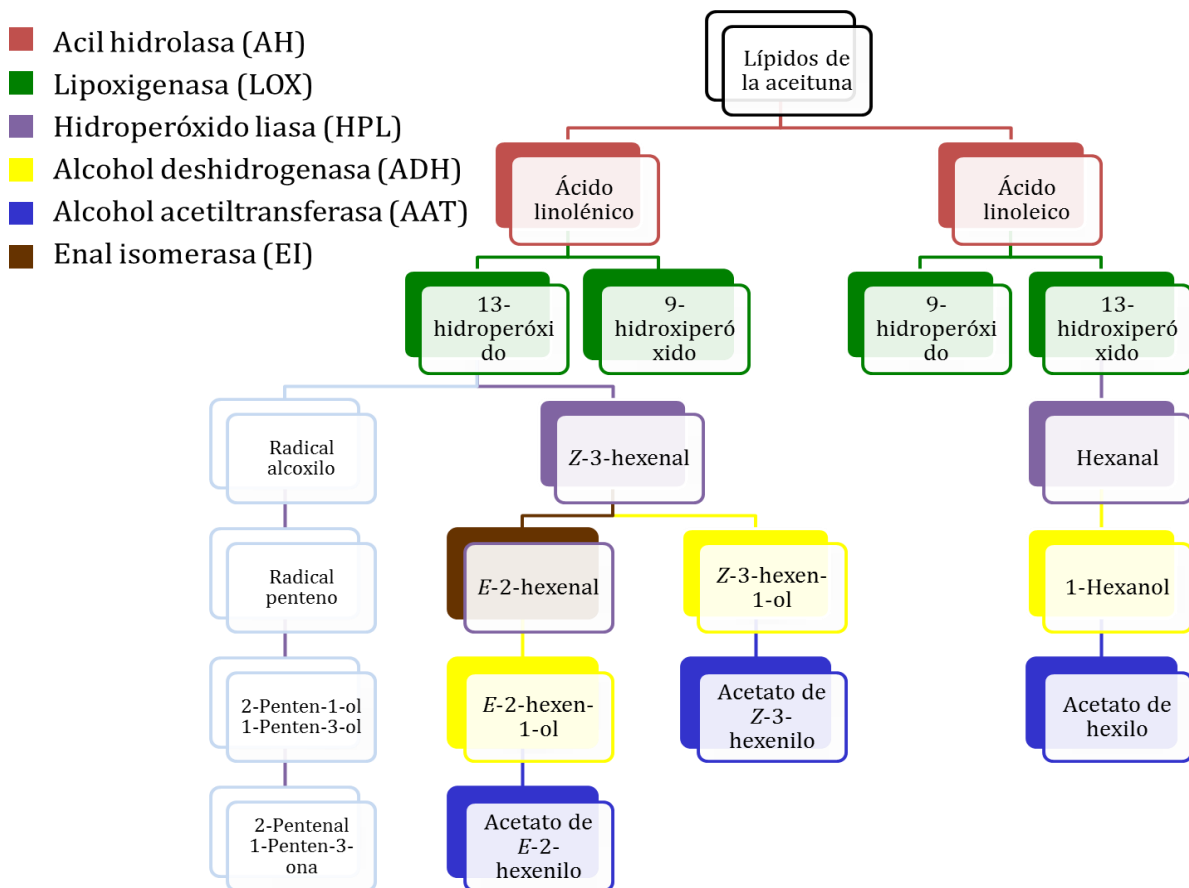


Figura 2.36. Esquema de la ruta de la lipoxigenasa

La enzima lipoxigenasa (LOX) actúa en la ruta utilizando como sustrato los ácidos linoleico y linolénico. Esta enzima está presente en la pulpa de aceituna y cataliza la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados originando los correspondientes 9 y 13-hidroperóxidos, obteniéndose entre un 75-90 % del 13-hidroperóxido. Esto

pone de manifiesto que los compuestos volátiles mayoritarios sean los que tiene 6 átomos de carbono (C6) en el AOVE.

Los 13-hidroperóxidos son catalizados posteriormente por la enzima hidroperóxido liasa (HPL), catalizando la ruptura del enlace que contiene el grupo hidroperóxido, el 13, y el adyacente, el 14. Las enzimas catalizan la formación de aldehídos C6, hexanal y (*Z*)-3-hexenal. Esto pone de manifiesto la gran cantidad de compuestos con seis átomos de carbono e insaturados, y la ausencia de compuestos con nueve átomos de carbono (Salas, Williams, Harwood y Sánchez, 1999).

La inestabilidad de (*Z*)-3-hexenal promueve su evolución hacia el compuesto (*E*)-2-hexenal, debido en parte a la actividad de la enzima enal isomerasa (EI) (Williams, Salas, Sánchez y Harwood, 2000). La enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) es la responsable de la posterior reducción de los aldehídos C6. En la última etapa de la ruta LOX interviene la acción de la enzima alcohol aciltransferasa (AAT), que implica la formación de los correspondientes ésteres volátiles de los alcoholes saturados e insaturados C6. Existen algunas reacciones secundarias en esta ruta. Utilizando como sustrato específico el 13-hidroperóxido del ácido linolénico, se puede generar el radical pentenilo y alcoholes C5, como el 1-penten-3-ol y el (*Z*)-2-pentenol. La presencia de esos volátiles está relacionada con cada variedad y puede explicar las características sensoriales inherentes de cada aceite monovarietal.

El batido se considera una etapa crítica para los compuestos volátiles, ya que durante esta etapa se produce su formación y transferencia a la fase oleosa. El oxígeno y el agua juegan un papel muy importante en los procesos de obtención del AOVE. El oxígeno es fundamental para generar los compuestos volátiles que le dan al aceite el flavor de verde y frutado, procedentes de la ruta LOX. Aunque, hay que tener en cuenta que una oxidación excesiva deteriora el aceite desarrollándose defectos sensoriales como el rancio (Zanoni, 2014).

La actividad de la enzima HPL es importante en la biosíntesis de los compuestos responsables de las notas verdes y frutales; aunque eso no es una reacción aislada y depende de la disponibilidad de sustratos y las reacciones enzimáticas

subsiguientes, que dependen del cultivar. Además, el contenido final de compuestos volátiles en el AOVE se ve influenciado significativamente por la maduración y el procesamiento de la aceituna. Esto es importante para elaborar un AOVE con el mejor perfil de organoléptico, con alta intensidad de notas verdes y notas frutales (Sánchez-Ortiz, Bejaoui, Quintero-Flores, Jiménez y Beltrán, 2018).

La recuperación y bioaccesibilidad de varios compuestos volátiles presentes en AOVE y el efecto de la digestión sobre estos compuestos han sido estudiados. Al final de la etapa de la digestión, se observaron mayores recuperaciones de etanol, 1-penten-3-ol, β -ocimeno y nonanal. Sólo algunos compuestos son bioaccesibles, por ejemplo, 1-penten-3-ol, nonanal, β -ocimeno y etanol mostraron una mayor bioaccesibilidad (Quintero-Flórez, Beltrán y Sánchez-Ortiz, 2017).

La determinación de los compuestos volátiles no está incluida dentro de las determinaciones de calidad o pureza que establece el Reglamento de la UE (CEE, 2016) o el COI. Sin embargo, existen diversas metodologías para su determinación. En general, estos métodos se basan en el análisis de los compuestos volátiles presentes en el aceite de oliva mediante cromatografía de gases (CG). Estos compuestos suelen ser extraídos mediante microextracción en fase sólida (SPME) y son inyectados en el cromatógrafo. Son separados al pasar por la columna y son detectados por el detector, que generalmente, se usa un detector de ionización de llama (FID) o un detector de espectrometría de masas (MS). El trabajo de Romero, García-González, Aparicio-Ruiz y Morales (2015) es una validación del método SPME-GC-MS. Recientemente, Contreras, Arroyo-Manzanares, Arce y Arce (2019) ha analizado la técnica de espacio de cabeza - cromatografía de gases - espectrometría de movilidad iónica (HS-GC-IMS) para el mapeo y la clasificación del aceite de oliva, obteniendo una buena separación de los compuestos volátiles del aceite de oliva. Este tipo de métodos no necesita de un pretratamiento y el tiempo de análisis es corto.

c) Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos merecen una especial atención dentro del grupo de compuestos minoritarios, ya que tienen un gran atractivo por su gran poder

antioxidante y por sus propiedades beneficiosas para la salud. Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios biosintetizados por las plantas a través de la ruta del ácido shikímico. Tienen un anillo fenol (ácido o alcohol fenólico) o varios anillos aromáticos con uno o más grupos hidroxilo (polifenoles) (Borges, López, Pereira, Cabrera–Vique y Seiquer, 2017; Conde, Delrot y Gerós, 2008).

Una gran variedad de compuestos fenólicos están presentes en el AOVE. A pesar de que comprenden una familia menor, encontrada en niveles de mg/kg, son responsables de las características organolépticas y funcionales de los aceites, junto con la mayor estabilidad oxidativa, en comparación con el resto de los aceites vegetales comestibles. Los polifenoles representan uno de los grupos más importantes y omnipresentes del metabolito vegetal y, desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos de alto peso molecular, su presencia en alimentos vegetales es extremadamente variable; son uno de los grupos naturales más importantes derivados de las frutas, el aceite de oliva, el té o el vino. El interés científico en los compuestos fenólicos de los alimentos ha aumentado recientemente, debido a sus posibles implicaciones beneficiosas para la salud humana (Fratoddi, Rapa, Testa, Venditti, Scaramuzza y Vinci, 2018). En la Figura 2.37 se muestran todos los tipos de fenoles relacionados con el aceite de oliva y las aceitunas, recogidos en una base de datos (Bonvino et al., 2018).

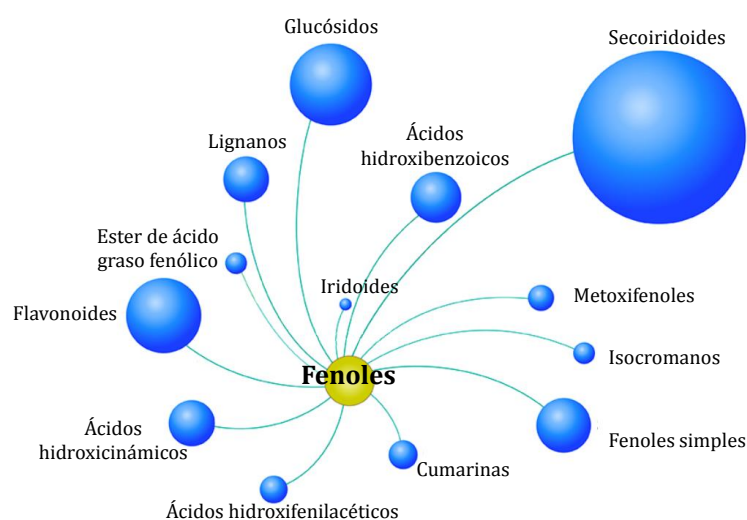


Figura 2.37. Clasificación de los compuestos fenólicos (Bonvino et al., 2018)

Los compuestos fenólicos presentes en *Olea europaea* L. pertenecen a seis familias principales de compuestos: ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, flavonoides (flavonas, flavonoles, y flavanoles), isocromanos, lignanos y secoiridoides y sus derivados. Entre los compuestos fenólicos, los ácidos fenólicos son aquellos con la forma más simple. Son compuestos derivados del ácido benzoico y del ácido cinámico. Por otra parte, la apigenina, la luteolina y sus derivados son los flavonoides más abundantes en el aceite de oliva. Los isocromanos están presentes exclusivamente en el aceite de oliva y en las hojas en bajas concentraciones. Los dos isocromanos principales son 1-fenil-6,7-dihidroxi-isocromano y 1-(3metoxi-4-hidroxi) fenil-6,7-dihidroxi-isocromano (Bianco, Coccioli, Guiso y Marra, 2002). En la Figura 2.38 se pueden observar las estructuras moleculares de algunos de los compuestos fenólicos más representativos.

Dos lignanos principales están presentes en el aceite de oliva, (+)-pinorresinol y (+)-1-acetoxipinorresinol, y el (+)-1-hidroxipinorresinol se encuentra en los huesos de los frutos. Los secoiridoides son raros en especies de plantas y se encuentran principalmente en especies de *Oleaceae*. Son abundantes en *O. europaea*, tanto en las hojas como en los frutos. Los secoiridoides más comunes son oleuropeína, demetiloleuropeína, ligustrósido y sus agliconas. En su estructura molecular, estos componentes fenólicos particulares se caracterizan por contener ácido elenólico en su forma glucosídica o aglicona (Malheiro, Rodrigues y Pereira, 2015). Angelis, Antoniadi, Stathopoulos, Halabalaki y Skaltsounis (2018) aislaron dos ácidos secoiridoides en AOVE, como metabolitos secundarios, el ácido oleocantálico y ácido oleaceínico.

Sus cantidades varían considerablemente según el cultivo del olivo, la etapa de maduración, la región geográfica y las condiciones de extracción, así como las prácticas agrícolas. El hidroxitirosol es un alcohol fenólico presente en gran parte de los aceites de oliva; su contenido es considerablemente más bajo en comparación con los secoiridoides. El tirosol también está presente en cantidades más bajas en comparación con los secoiridoides. Generalmente, los ácidos fenólicos están presentes en cantidades pequeñas en los aceites de oliva (Malheiro et al., 2015). El hidroxitirosol es el principal producto de degradación de la

oleuropeína. Por esto su contenido en hojas de olivo o aceitunas aumenta durante la maduración (Wani et al., 2018).

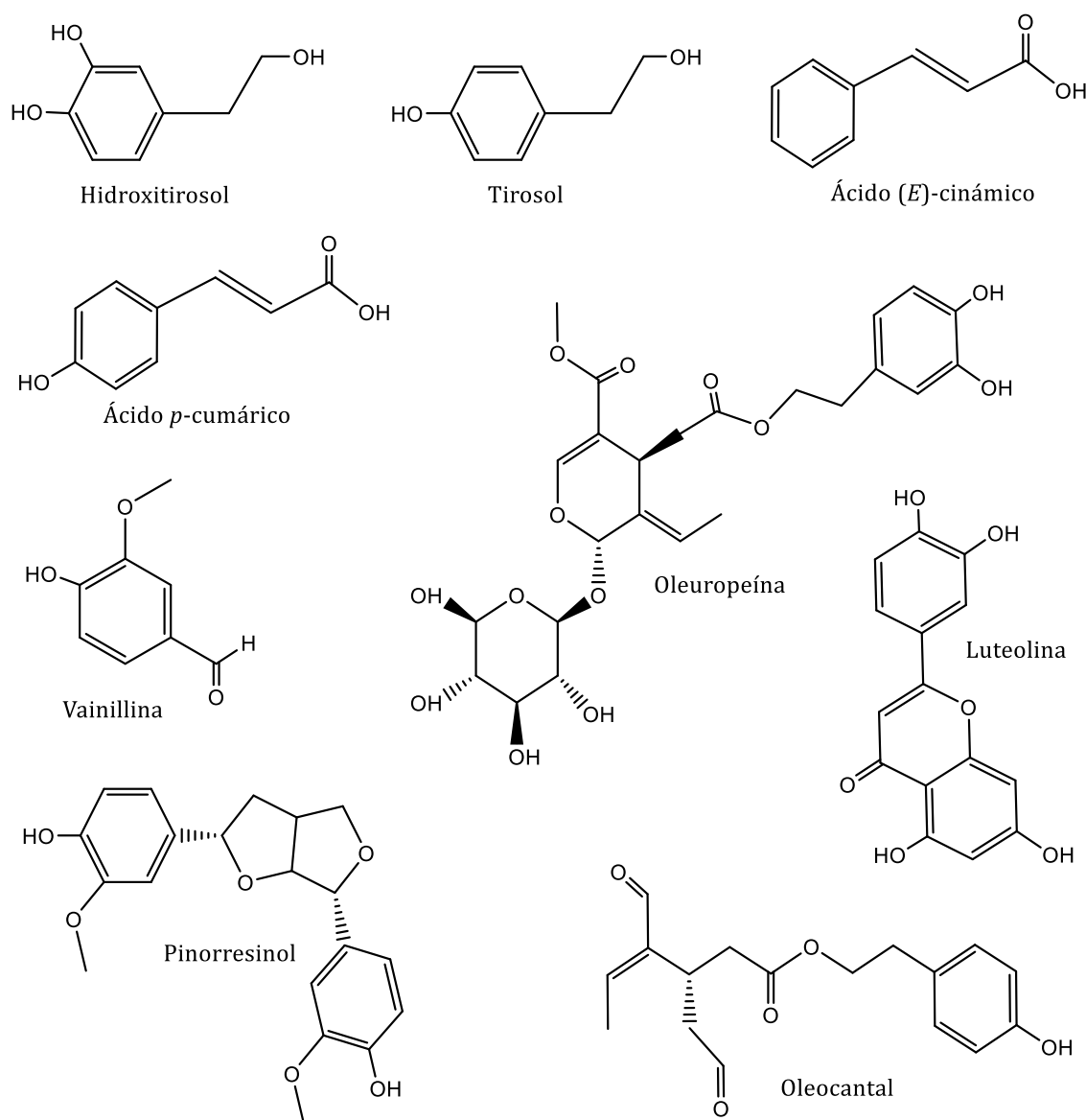


Figura 2.38. Estructura molecular de varios compuestos fenólicos

Durante la extracción del aceite de oliva, los compuestos oleuropeína y ligustrósido se hidrolizan enzimáticamente formando sus agliconas (3,4-DHPEA-EA, p-HPEA-EA). Estas a su vez originan las formas dialdehídicas y/o las decarboxiladas, intermedios que originan las formas decarboxilada-dialdehídica de la aglicona correspondiente (3,4-DHPEA-EDA, p-HPEA-EDA) de oleuropeína y ligustrósido, respectivamente, Figura 2.39. Estas agliconas y sus formas derivadas conforman el grupo de los secoiridoides, mayoritario en los aceites de oliva.

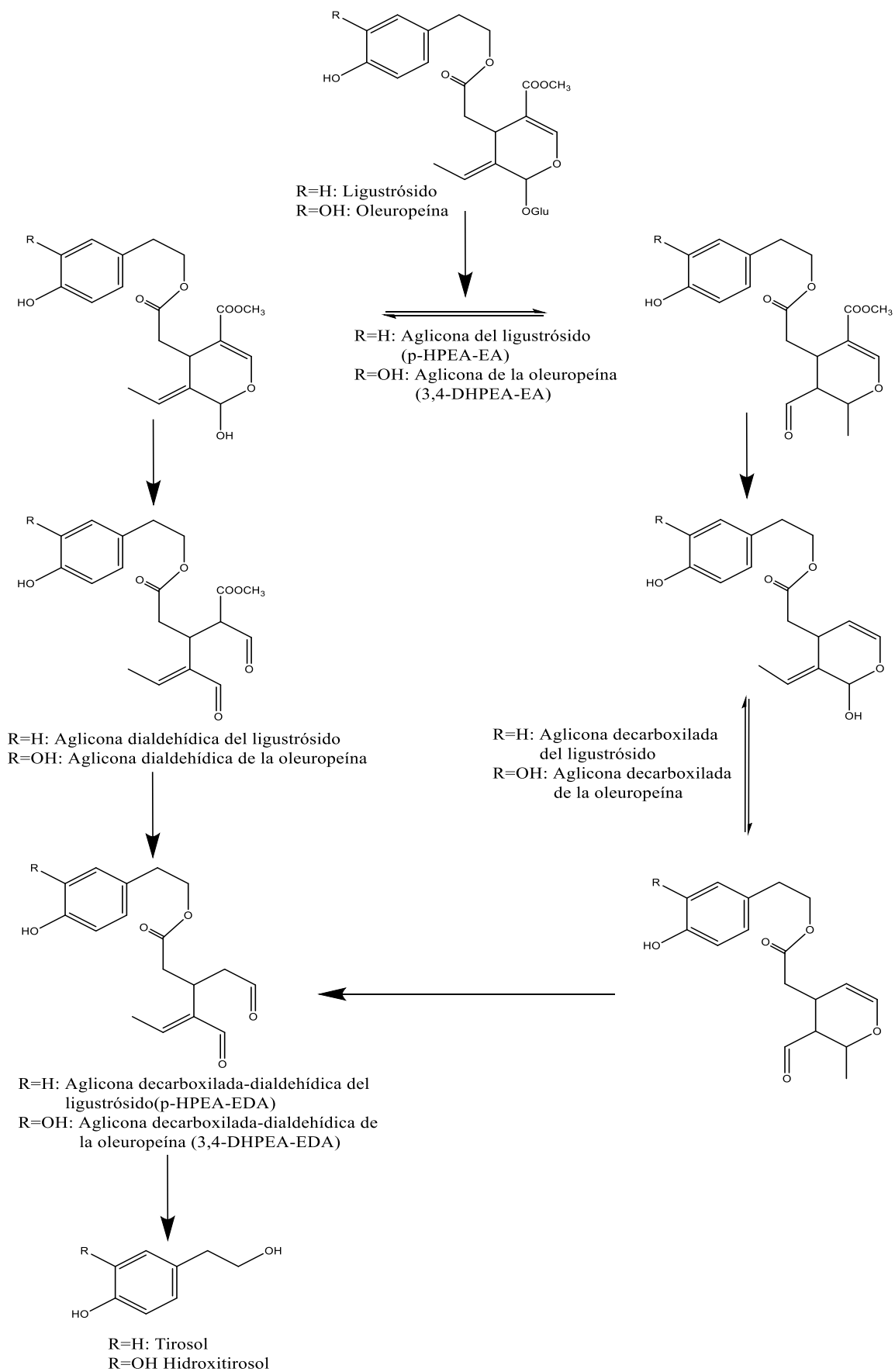


Figura 2.39. Estructura molecular de los secoiridoides

Varios procesos endógenos y factores interfieren en la síntesis de moléculas bioactivas en aceitunas, especialmente compuestos fenólicos, que afectan tanto a la diversidad como a la cantidad. El cultivo del olivo y la etapa de maduración son factores importantes; sin embargo, las prácticas de cultivo (sistema de cultivo, prácticas de riego y fertilización y poda), la incidencia de plagas y enfermedades del olivo y las áreas geográficas donde se cultivan las aceitunas, junto con condiciones edafoclimáticas específicas, influyen en su composición fenólica y por lo tanto, al AOVE obtenido a partir de estas. En general, la interacción de los factores mencionados junto con los factores tecnológicos durante la extracción tiene influencia en la composición fenólica del AOVE. En general, existe un aumento de estos compuestos durante la etapa de maduración, hasta un índice de madurez intermedio, y una disminución hasta la etapa final de madurez. El perfil de compuestos fenólicos puede permitir su uso como marcador varietal (Franco, Galeano-Díaz, Sánchez, De Miguel y Martín-Vertedor, 2014).

La presencia de compuestos fenólicos en los AOVE está relacionada con las características sensoriales de amargo y picante. Estas sensaciones pueden persistir bastante tiempo después de la deglución. Estas características pueden variar dependiendo de la intensidad de cada aceite de oliva, pudiendo ser una sensación negativa para el consumidor (Esti, Contini, Moneta y Sinesio, 2009). Según Abenozza, Raso, Oria y Sánchez-Gimeno (2019) la sensación de amargo excesivo puede ser desagradable para los consumidores. Esta característica sensorial puede ser modulada con el empleo de una mayor o una menor cantidad de agua en la extracción, dependiendo si queremos eliminar más o menos cantidad de compuestos fenólicos, respectivamente.

Se ha demostrado que estos compuestos desempeñan un papel importante en la intensidad y en el momento de la liberación de ciertos compuestos aromáticos durante el consumo de AOVE. Los compuestos fenólicos interactúan con ciertos compuestos volátiles, como hexanal, a través de enlaces reversibles no covalentes. Altos niveles de compuestos fenólicos de AOVE originan una menor liberación de algunos compuestos volátiles en la deglución del aceite de oliva. Probablemente, el complejo formado (fenol/volátil) atrape los compuestos aromáticos y, consecuentemente, reduce su volatilidad durante la evaluación organoléptica. El

efecto de los biofenoles en la liberación de aroma puede influir en la percepción del sabor y la aceptación del consumidor (Genovese, Yang, Linforth, Sacchi y Fisk, 2018).

Existe una gran variabilidad entre los compuestos fenólicos de diferentes AOVEs monovarietales (Miho et al., 2018). El genotipo es el principal factor que contribuye a esta variabilidad, con porcentajes de varianza total entre 83 % y 97 %. En general, los secoiridoides son los fenoles más abundantes de todos los AOVEs de las diferentes variedades. Las diferencias en los perfiles fenólicos permiten la detección de dos vías independientes en el metabolismo de la oleuropeína y la ligustrósido, a través de la participación de enzimas como dimetilesterasas y β -glucosidasas.

La acción y contenido de la enzima β -glucosidasa depende de la variedad de aceituna. Esta enzima ha demostrado mayor selectividad hacia la oleuropeína que a su aglicona (3,4-DHPEA-EA) que es su producto final. Al mismo tiempo, 3,4-DHPEA-EDA (oleaceína) puede formarse por la acción secuencial de la β -glucosidasa y una metilesterasa endógena, que actúa sobre los productos iniciales en la hidrólisis de la oleuropeína. Asimismo, existe una correlación entre el contenido de oleuropeína en los frutos del olivo y la cantidad de derivados de oleuropeína (3,4-DHPEA-EA y derivados) en el AOVE correspondiente, pero no se encontró relación con el contenido de dimetiloleuropeína en el fruto (Romero-Segura, García-Rodríguez, Sánchez-Ortiz, Sanz y Pérez, 2012).

La determinación de los compuestos fenólicos no está incluida en los parámetros de calidad o pureza del Reglamento de la UE (CEE, 2016) o el COI. No obstante, el COI ha desarrollado un método de análisis para estos compuestos, denominado “determinación de los biofenoles de los aceites de oliva mediante HPLC” (COI, 2017). Este método se basa en la identificación y cuantificación de los fenoles individuales presentes en el AOVE mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y un detector espectrofotométrico UV, en inglés, *diode array detector* (DAD). Otros métodos incluyen un detector de espectrometría de masas (Carrasco-Pancorbo et al., 2005). Este detector sirve para mejorar en la identificación de los compuestos.

Existe también un método espectrofotométrico para medir el contenido total de compuestos fenólicos (Vázquez, Janer y Janer, 1973). Está basado en la extracción de los compuestos fenólicos mediante extracción líquido-líquido y su posterior análisis mediante espectrofotometría UV-visible, debido a que estos compuestos absorben radiación en este rango del espectro.

d) *Pigmentos fotosintéticos*

Las clorofilas y los carotenoides se ubican principalmente en el tejido hipodérmico de cloroplastos de la aceituna. Son colorantes naturales que se degradan en gran medida durante la maduración de las aceitunas y el almacenamiento de los aceites. La cantidad de los productos de descomposición de los pigmentos puede ser un indicador de la maduración de la aceituna o del tiempo de almacenamiento de los aceites de oliva (Ranalli, Gomes, Delcuratolo, Contento y Lucera, 2003).

La clorofila está relacionada con el centro activo de los complejos moleculares que absorben la luz durante la fotosíntesis. La forma molecular de la clorofila es $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ y su estructura se representa en la Figura 2.40. El grupo R de la clorofila "a" es $-CH_3$ (metilo) y el grupo R de la clorofila "b" es $-CHO$ (aldehído). La clorofila "b" se encuentra principalmente en las algas verdes y las plantas terrestres.

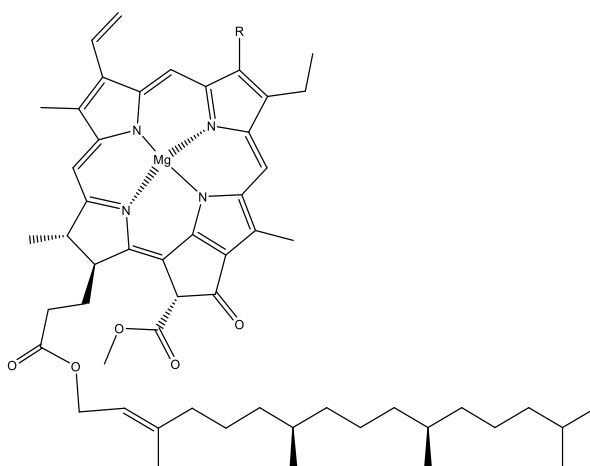


Figura 2.40. Estructura molecular de la clorofila

La clorofila tiene una mayor concentración en los aceites de oliva de recolección temprana. Esto es debido al empleo de aceitunas con un IM muy bajo y con color

más verde comparadas con aceitunas de final de campaña, más maduras. La clorofila posee un doble comportamiento frente a las condiciones lumínicas de exposición del aceite. En un lugar oscuro, se comporta como un antioxidante. Sin embargo, si está expuesto a la luz su comportamiento es como un prooxidante, acelerando la oxidación del aceite de oliva. Si durante el almacenamiento las condiciones no han sido las adecuadas, los aceites de oliva tempranos pueden tener un sabor anormalmente rancio, debido a la oxidación por parte de las clorofilas.

Dentro del grupo de los carotenoides destaca el β -caroteno por tener una mayor proporción en los aceites y ser el precursor del retinol o vitamina A. En la Figura 2.41 se representa la estructura molecular del β -caroteno. Su forma molecular es $C_{40}H_{56}$.

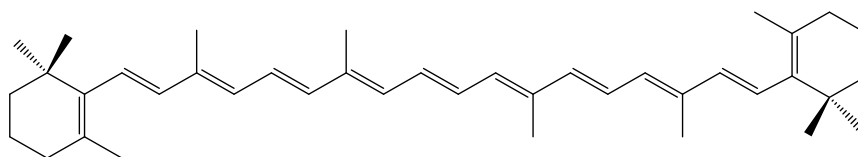


Figura 2.41. Estructura molecular del β -caroteno

Ambos pigmentos fotosintéticos, clorofilas y carotenoides, son los principales pigmentos responsables del color de las aceitunas y del aceite de oliva. Por lo tanto, el aceite de oliva tomará un color verde si proviene de aceitunas verdes, con poca maduración; o un color dorado, a partir de aceitunas moradas, con mayor maduración (Rallo et al., 2018). Los pigmentos naturales también juegan un papel importante en la estabilidad oxidativa (Criado, Romero, Casanovas y Motilva, 2008).

Según García, Morales-Sillero, Pérez-Rubio, Díaz-Espejo, Montero y Fernández (2017), la falta de riego induce a un AOVE con un alto nivel de pigmentos fotosintéticos. La disminución en el contenido de clorofilas y carotenoides durante el proceso de maduración se debe a la participación de un sistema enzimático que degrada los pigmentos, más rápidamente las clorofilas, de ahí que los aceites se tornen más amarillentos durante la maduración de las aceitunas (Vergara-Domínguez et al., 2016). Por lo tanto, existe correlación entre la etapa de madurez

de las aceitunas y la cantidad de pigmentos en los AOVE (Lazzerini, Cifelli y Domenici, 2017).

La concentración de los pigmentos fotosintéticos cambia según las condiciones utilizadas para la elaboración del AOVE. El contenido en clorofilas y carotenoides se incrementa al reducir el tamaño de criba y también con el uso del carbonato de calcio como coadyuvante. Igualmente, la temperatura de batido incrementa el contenido en clorofilas y el de los carotenoides. Por el contrario, el agua no ejerce influencia sobre estos compuestos (Alcalá-Reyes, 2016). Básicamente, para obtener un alto contenido de compuestos fotosintéticos, la temperatura de batido debe ser alta, el tiempo de batido también alto y el diámetro lo más pequeño posible.

La percepción del color del AOVE por parte del consumidor, es uno de los principales atributos que se evalúa para elegir un AOVE, aunque no por ello un aceite más verde sea indicativo de mejor calidad que uno más amarillo, o menos verde. Por lo tanto, es importante que el aceite tenga un color que llame la atención del consumidor para que lo escoja entre otros aceites. Durante la extracción del aceite existen fenómenos de partición entre la fase sólida y las líquidas, los cuáles van a determinar la distribución de estos. Los pigmentos de los cloroplastos tienen una naturaleza lipofílica, poseen más afinidad por la fase oleosa. Por el contrario, las antocianinas presentan más afinidad por la fase sólida (orujo) y las aguas residuales, debido a su naturaleza más hidrofílica (Criado et al., 2008).

La determinación del contenido de los pigmentos fotosintéticos no es un criterio establecido por la Normativa Europea, o el COI, como criterio de calidad o pureza del AOVE. Sin embargo, varios investigadores han desarrollado métodos para su determinación, un método espectrofotométrico (Mínguez-Mosquera, Rejano-Navarro, Gandul-Rojas, Sánchez-Gómez y Garrido-Fernández, 1991) y otro método mediante HPLC (Roca y Mínguez-Mosquera, 2003). Estos métodos de análisis se basan en la detección del grupo cromóforo de estos compuestos mediante espectrofotometría. La clorofila y el β -caroteno tienen diferentes bandas de absorción de radiación en el espectro UV-visible. Por lo tanto, se pueden identificar qué compuesto es por sus máximos de absorbancia en el espectro UV.

2.4.5 Aceite de oliva y salud

Desde la Antigüedad eran conocidas las propiedades saludables del AOVE. En la antigua Grecia se referían al aceite de oliva como medicinal. El conocimiento sobre las bondades del aceite de oliva está cada vez más extendido. Existen numerosos estudios que evidencian los beneficios saludables sobre la salud humana. La ciencia moderna ha identificado los compuestos fenólicos con propiedades beneficiosas para la salud. En la actualidad se continúa investigando la acción y efectividad de estos fenoles para la prevención y el tratamiento de muchas de las enfermedades crónicas actuales, como el infarto cardíaco, el derrame cerebral, la presión arterial alta, la artritis reumatoide, obesidad, Alzheimer, Parkinson, diabetes tipo II y cáncer (Lombardo, Grasso, Lanciano, Loria y Monetti, 2018; Covas et al., 2015).

En países donde está establecida la dieta mediterránea, la grasa usada principalmente es el AOVE. Esta dieta es rica en ácido oleico como ácido graso fundamental (Ramírez-Tortosa et al., 1999). El AOVE se ha consumido de forma tradicional sin refinar, aportando así multitud de compuestos, como terpenos, tocoferoles, esteroides, clorofilas, y otros compuestos fenólicos con carácter antioxidante (Ramírez-Tortosa, López-Pedrosa, Suárez, Ros, Mataix y Gil, 1999).

El estudio de Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED) es un ensayo aleatorizado pionero que prueba la dieta mediterránea en la prevención cardiovascular primaria. Se han efectuado diversas investigaciones sobre los beneficios que tiene la dieta mediterránea en la salud. Una de las aportaciones más relevantes ha sido la existencia de una relación entre el consumo de AOVE y la osteoporosis. Se ha comprobado que existe un menor riesgo de fracturas óseas en la población que consume AOVE (García-Gavilán et al., 2018). También se puede reducir el riesgo de sufrir diabetes tipo II con la alimentación suplementada con AOVE (Seguí Díaz, 2014). La dieta mediterránea, con AOVE como grasa principal, ejerce un efecto antiinflamatorio sobre el sistema cardiovascular ya que regula los biomarcadores inflamatorios celulares (Urpi-Sarda et al., 2012). La población que sigue la dieta mediterránea tiene un menor riesgo de sufrir cáncer de mama,

diabetes, enfermedades cardiovasculares y Alzheimer (Ruiz-Canela y Martínez-González, 2011; Visioli et al., 2018).

Tener una dieta rica en aceite de oliva mejora la microbiota intestinal y el perfil lipídico en sangre. Además, disminuye el riesgo de padecer problemas de síndrome metabólico. El aumento de peso corporal y la presión arterial es menor comparado con una dieta rica en mantequilla (Prieto et al., 2018).

El consumo de AOVE se ha relacionado con un menor riesgo de padecer enfermedades coronarias o enfermedades cardiovasculares. Esto es debido a que aumentan las lipoproteínas de alta densidad en sangre, conocidas por sus siglas en inglés, HDL, o denominado comúnmente, “colesterol bueno” (Scotece et al., 2015).

Según el Reglamento de la UE (CEE, 2012) “los polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre frente al daño oxidativo. Esta declaración solo puede utilizarse respecto a aceite de oliva que contenga un mínimo de 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados (por ejemplo, un complejo de oleuropeína o tirosol) por 20 g de aceite de oliva. Para que un producto pueda llevar esta declaración, se informará al consumidor de que el efecto beneficioso se obtiene con una ingesta diaria de 20 g de aceite de oliva”.

Los compuestos fenólicos están presentes de forma natural en el AOVE, tienen biodisponibilidad y son beneficiosos para la salud humana. Afectan beneficiosamente la actividad microbiana, los procesos oxidativos y la inflamación (Cicerale, Lucas y Keast, 2012; Yang, Kong y Zhang, 2007). Existen evidencias de que algunos compuestos presentes en el AOVE, como el oleocantal, tienen propiedades antiinflamatorias similares al ibuprofeno (Beauchamp et al., 2005). Recientemente se ha creado la Sociedad Andaluza del Oleocantal (SAO) que promueve el desarrollo y difusión de actividades relacionadas con el oleocantal, compuesto orgánico natural aislado del AOVE, que se ha demostrado científicamente un efecto antiinflamatorio similar a los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), pero sin los efectos secundarios perjudiciales de éstos (SAO, 2015).

Los fenoles del AOVE se encuentran entre los compuestos dietéticos que se consideran beneficiosos para la salud intestinal. La mayoría de ellos llegan al intestino, donde pueden ser absorbidos directamente o metabolizados bajo absorción. Otros se someten a una extensa biotransformación gastrointestinal, que producen diversos metabolitos que retienen el potencial efecto beneficioso o ejercen una acción biológica más eficiente. A nivel intestinal, la acción de los fenoles radica en su interacción con la microbiota y su capacidad para modular potencialmente el estado oxidativo de la capa epitelial intestinal, la inflamación y la respuesta inmune (Deiana, Serra y Corona, 2018).

Las propiedades bioactivas del hidroxitirosol se logran a través de diversos mecanismos bioquímicos. El hidroxitirosol previene la artritis, la colitis, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer a través de sus efectos nutrigenómicos e inmunomoduladores. Además de tener propiedades anti-VIH y antimicrobianas, el hidroxitirosol previene y trata varias complicaciones de salud, incluyendo el síndrome metabólico, enfermedades cardiovasculares, cáncer, anomalías neuromusculares, entre otras (Wani et al., 2018).

Los lignanos presentes en el AOVE, pinorresinol y 1-acetoxipinorresinol, tienen varios beneficios para la salud, desde la eliminación de radicales libres hasta los efectos biológicos *in vitro* e *in vivo*. Se han asociado con tener actividad antitumoral, especialmente en tumores de mama, y con una disminución en la expresión de proteínas y moléculas que están directamente implicadas en los procesos de cáncer (López-Biedma, Sánchez-Quesada, Delgado-Rodríguez y Gaforio, 2016).

Los fenoles de gran peso molecular, como los secoiridoides, proporcionan efectos beneficiosos sobre la presión arterial sistólica y el estado oxidativo sérico. Estos compuestos deben considerarse como un nutracéutico en la prevención cardiovascular (Hohmann et al., 2015). Los mecanismos mediante los cuales los compuestos fenólicos del aceite de oliva pueden ejercer sus efectos beneficiosos son la disminución de la lipoproteína de baja densidad (LDL) y un efecto nutrigenómico que modula la expresión de genes relacionados con la aterosclerosis (Covas et al., 2015).

El ácido oleico (C18:1) es el precursor de algunos eicosanoides. Estos pueden tener actividad vasodilatadora y antiagregante. Este compuesto es capaz de provocar el aumento de la fracción de HDL. Al mismo tiempo, produce una disminución de LDL, del colesterol total y de los triglicéridos (Massaro, Carluccio y De Caterina, 1999).

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) tipo omega 3, presentes en algunos alimentos como el AOVE, pueden actuar como agentes antiinflamatorios, antiarritmogénicos y protectores a nivel cardiovascular. El ácido linolénico (C18:3), presente en el AOVE, es el principal precursor del ácido docosahexaenóico (DHA). Este compuesto da lugar a leucotrienos, prostaglandinas o tromboxanos con actividad antiinflamatoria, antiagregante, anticoagulante y vasodilatadora. Los ácidos grasos omega 6 también generan compuestos estimulantes del sistema inmune, procoagulantes y vasoconstrictores (Leaf, 2002; Jialal, Devaraj, Huet y Traber, 1999).

Los triterpenos del AOVE presentan diferentes propiedades, como actividad antitumoral, cardioprotectora, antiinflamatoria y protección antioxidante. Además, son una fuente natural de antioxidantes que podrían ser compuestos útiles para la prevención de múltiples enfermedades relacionadas con el daño oxidativo celular (Sánchez-Quesada, López-Biedma, Warleta, Campos, Beltrán y Gaforio, 2013). El ácido maslínico, junto al ácido oleanólico, es un triterpeno presente en el AOVE. Este puede modular la respuesta inflamatoria y podría prevenir la inflamación crónica, lo que representa un paso crucial en el desarrollo de algunos cánceres (Sánchez-Quesada, López-Biedma y Gaforio, 2015a). El ácido oleanólico es un componente de la piel de las aceitunas y de otras frutas. Este compuesto inhibe la proliferación de las células altamente invasivas. Al mismo tiempo, disminuye el estrés y el daño oxidativo en las células epiteliales mamarias humanas. Todo esto lleva a la conclusión que puede ejercer una acción como agente quimiopreventivo del cáncer de mama y podría inhibir la proliferación de células de cáncer de mama altamente invasivas (Sánchez-Quesada, López-Biedma y Gaforio, 2015b).

El AOVE interactúa con otros alimentos durante la cocción. En la gastronomía mediterránea se utiliza sin procesar, añadido a los alimentos después de la cocción

o junto con las ensaladas. Esta es la mejor forma de expresar el sabor original y maximizar la ingesta de antioxidantes naturales y compuestos relacionados con los efectos positivos en la salud humana. Sin embargo, el AOVE también muestra sus propiedades protectoras durante y después de la cocción. Se producen diferentes interacciones químicas entre los compuestos biofenólicos y otros ingredientes alimentarios. Incluso durante la cocción, el AOVE muestra fuertes propiedades antioxidantes e influye en el sabor general de los alimentos cocinados (Sacchi, Paduano, Savarese, Vitaglione y Fogliano, 2014).

El aceite de oliva tiene propiedades nutraceuticas y farmaceuticas debido a sus ácidos grasos y a los compuestos fenólicos. Uno de los aspectos de las tendencias modernas en los alimentos es la composición nutraceutica de nuestra dieta diaria para mejorar el nivel general de salud. Los nutraceuticos proporcionan diversos beneficios para la salud al intervenir en los procesos biológicos a través de mecanismos nutrigenómicos e inmunomoduladores (Wani et al., 2018).

2.5 Metodología de Superficies de Respuesta

La Metodología de Superficies de Respuesta (MSR) es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas utilizadas para el modelado y análisis de problemas, cuando diversas variables influyen sobre una respuesta. También sirve para el diseño, desarrollo y formulación de nuevos productos. El objetivo principal es encontrar la combinación de factores, y sus valores, que optimicen la variable respuesta del proceso (Myers, Montgomery y Anderson-Cook, 2016; Montgomery, 2002).

La aplicación de MSR en la optimización de los procedimientos se difunde y consolida en gran medida debido a sus ventajas sobre la optimización clásica de una sola variable a la vez, genera grandes cantidades de información a partir de un pequeño número de experimentos y tiene la posibilidad de evaluar el efecto de interacción entre las variables sobre la respuesta (Bezerra, Santelli, Oliveira, Villar y Escaleira, 2008).

La mayoría de las aplicaciones de MSR son de naturaleza secuencial. Al principio se generan algunas ideas sobre qué factores o variables pueden ser importantes en el estudio de la superficie de respuesta. Generalmente, se va a necesitar la realización de un experimento diseñado para investigar estos factores y poder determinar cuáles son los que tienen influencia en la respuesta. Este tipo de experimento se le denomina experimento de detección (en inglés, *screening experiment*). Al comienzo de un estudio de superficie de respuesta, existen diferentes variables que podrían ser importantes para la respuesta. El objetivo de la selección de factores es reducir el número de variables, para que los experimentos posteriores sean más eficientes y requieran menos tiempo. La elección de los factores requiere un conocimiento previo del sistema, asimismo deben poder modificarse y controlarse con facilidad (Myers et al., 2016). Una vez identificadas las variables independientes que ejercen los principales efectos en el sistema se delimita la región experimental, de acuerdo con el objetivo y la experiencia del investigador. Seguidamente, se elige el diseño de experimentos y se ejecutan los experimentos. Después, se realiza el tratamiento matemático-estadístico de los datos experimentales obtenidos mediante el ajuste de una función lineal o polinómica. A continuación, se evalúa la aptitud del modelo y la posibilidad de realizar un desplazamiento en dirección a la región dónde están los valores óptimos. Finalmente, se obtienen los valores óptimos para cada variable (Bezerra et al., 2008).

Cuando se utiliza un procedimiento de optimización con varias variables, en la MSR se deben reconocer dos tipos de variables: variables independientes o factores y variables dependientes o respuestas (Bezerra et al., 2019; Montgomery, 2002). En la mayoría de los casos, la relación que existe entre la respuesta y las variables independientes es desconocida. Por lo tanto, primero se busca una relación entre ambos. Si la función de aproximación es de primer orden, la respuesta se modela para una función lineal de las variables independientes, como se muestra en la Ecuación 2.3:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j>i}^k \beta_{ij} x_i x_j \pm \varepsilon \quad [2.3]$$

Para la función de aproximación de segundo orden se usa el modelo cuadrático o de segundo orden, Ecuación 2.4:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \sum_{j>i}^k \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 \pm \varepsilon \quad [2.4]$$

Donde k es el número de variables independientes o factores, β_0 es el término independiente u ordenada en el origen, β_i son los coeficientes de los términos de primer orden, β_{ij} son los coeficientes de los términos de interacción entre factores, β_{ii} los coeficientes de los términos cuadráticos, x_i es el nivel de la variable independiente, y ε el error del modelo. El método de mínimos cuadrados se usa para estimar los parámetros de los polinomios de aproximación (Montgomery, 2002).

A la representación de una función, con al menos dos variables independientes, se le denomina superficie de respuesta. Por lo general, la superficie de respuesta se representa gráficamente, como en la Figura 2.42, donde los factores 1 y 2 son x_1 y x_2 , respectivamente, y la respuesta está representada en el eje y .

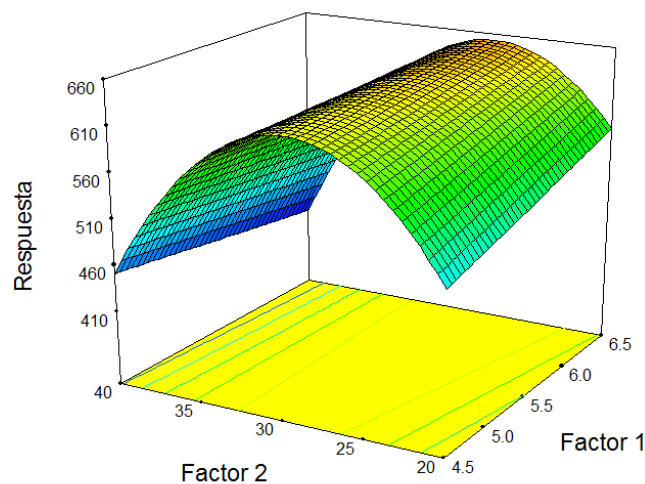


Figura 2.42. Superficie de respuesta

Una vez obtenida la superficie de respuesta se realiza un análisis de la misma. Si es una aproximación adecuada de la verdadera función de la respuesta será un equivalente aproximado del análisis del sistema real. Además, los parámetros del modelo pueden estimarse de manera más eficiente cuando se emplean los diseños

experimentales apropiados para generar los datos. Una vez que se ha encontrado la región del óptimo debe llevarse a cabo un análisis más exhaustivo para localizar el punto óptimo. Si el óptimo que se busca es el valor máximo de la respuesta, el análisis de una superficie de respuesta puede suponerse como "el ascenso a una colina", dónde el punto más alto representa el punto de la respuesta máxima. Al contrario, "el descenso a un valle" sería para buscar el valor óptimo para una respuesta mínima. MSR tiene como objetivo determinar las condiciones óptimas del sistema o determinar una región del espacio de los factores en la que se cumplan los requerimientos de operación (Montgomery, 2002).

Para encontrar los niveles que optimizan la respuesta predicha se debe calcular las derivadas parciales de la respuesta frente al factor. Se optimizará el valor de la respuesta en el punto o los puntos donde las derivadas parciales tengan un valor nulo. A este punto se le denomina punto estacionario. Puede representar un punto de respuesta máxima, un punto de respuesta mínima, o un punto silla. Las gráficas de contorno pueden ser útiles a la hora de hallar el punto estacionario de forma gráfica (Myers et al., 2016; Montgomery, 2002).

La función deseabilidad o función con condición deseable (en inglés, *desirability*) tiene la utilidad de optimizar las respuestas obtenidas. Se utiliza cuando existen diferentes posibilidades de optimización de la respuesta. Esta metodología multicriterio se basa en la construcción de una función de deseabilidad para cada respuesta individual. Cada función de deseabilidad individual es una función continua elegida entre una familia de funciones lineales o exponenciales y varía de cero (respuesta no deseada) a 1 (respuesta óptima). Basándose en las funciones de deseabilidad individuales, la función de deseabilidad global se estima como el promedio geométrico ponderado de las funciones de deseabilidad individuales (Ortiz, Herrero, Sanlloriente y Reguera, 2005). La función de deseabilidad permite el establecimiento de múltiples criterios para que el usuario pueda expresar sus necesidades y limitaciones en relación con el sistema que se desea optimizar y la adopción de parámetros adecuados puede llevar a una ubicación rápida y adecuada de las condiciones óptimas que satisfacen simultáneamente las propiedades consideradas respuestas (Bezerra et al., 2019).

2.5.1 Diseño experimental

El estudio de superficies de respuesta se facilita en gran parte con la elección de un diseño de experimentos apropiado. El trabajo experimental puede llegar a ocupar largo tiempo en la investigación. Para utilizar el tiempo de forma eficiente se debe hacer de forma planificada. El diseño experimental o diseño estadístico de experimentos (DEE) tiene como objetivo realizar una planificación de modo que se obtenga la máxima cantidad de información con el mínimo número de ensayos. Esto se realiza para minimizar el coste y el tiempo en la experimentación y mejorar la evaluación de los resultados experimentales (Montgomery, 2002). El uso de DEE hace posible ensayar varios factores simultáneamente. La información obtenida a partir de estos diseños puede alcanzar una solución empírica del problema a resolver (Box, Hunter y Hunter, 2008).

Los principios en los que se basa el DEE son la reproducibilidad y la aleatoriedad. Ambas permiten determinar el error experimental y obtener una información más precisa de la influencia de los factores sobre la respuesta. Se suelen repetir ensayos para minimizar y cuantificar los errores en el diseño. El error experimental es la variabilidad de una respuesta que no se puede atribuir a influencias conocidas. Este error experimental es inevitable. Por lo general, la mayor parte del error proviene de variaciones de las materias primas, del muestreo o de las condiciones de trabajo. Únicamente una parte se debe a errores de medición. DEE ayuda a evitar que los efectos reales de los factores resulten encubiertos por el error experimental. Igualmente, a la inversa, evitando confundir erróneamente la existencia de efectos que no existen. Es recomendable el uso adecuado del análisis estadístico de un diseño de experimentos para reducir en gran medida una posible confusión de la influencia del error experimental (Box et al., 2008).

DEE es un conjunto específico de experimentos definidos por una matriz compuesta por las diferentes combinaciones de niveles de las variables estudiadas. Este diseño define un conjunto específico de combinaciones para los niveles de variables que deben aplicarse experimentalmente para obtener las respuestas (Bezerra et al., 2008). Algunas características que deben tener los diseños son: distribuir los puntos de los datos en toda la región de interés, permitir la

investigación de la adecuación del modelo, permitir la realización de experimentos en bloques, proporcionar una estimación del error, estimar los coeficientes del modelo, proporcionar robustez, minimizar el número de experimentos y asegurar el cálculo de los parámetros del modelo de forma simple (Montgomery, 2002).

Una vez que los factores más influyentes en el sistema han sido identificados, se deben elegir los rangos de los valores de estos factores. Esto se define como dominio experimental. Cada valor de los factores puede ser codificado. Los valores codificados permiten determinar con mayor facilidad la influencia de cada factor sobre la respuesta, independientemente de los valores reales. La codificación de los niveles de las variables independientes o factores consiste en transformar cada valor real estudiado en coordenadas dentro de una escala con valores adimensionales, que deben ser proporcionales en el espacio experimental. El valor real mayor le corresponde el valor codificado [+1], el valor codificado [0] es para el punto medio del intervalo, y el valor real menor adquiere el valor codificado [-1]. La codificación permite la evaluación de variables con diferentes órdenes de magnitud. La Ecuación 2.5 se aplica para transformar un valor real (z_i), del intervalo de experimentación (z_a, z_b) en un valor codificado [x_i] de acuerdo con un diseño experimental determinado:

$$x_i = \left(\frac{z_i - z_0}{z_b - z_0} \right) \quad [2.5]$$

donde z_0 es el punto medio, o central, del intervalo de experimentación. El factor codificado x_i oscila entre -1 para el valor z_a y +1 para el valor z_b , en el punto central $x_0 = 0$ (Bezerra et al., 2008).

Existen varios tipos de diseños de experimentos. Los diseños que se utilizan para ajustar un modelo de primer orden (términos lineales e interacción, aunque este se considera de segundo orden) son los diseños de primer orden ortogonales. Estos incluyen el diseño factorial, el diseño Taguchi y el diseño símplex. Los diseños para ajustar un modelo de segundo orden (los términos del primer nivel más los cuadráticos) son el diseño central compuesto, diseño central compuesto rotatable, Box-Behnken, diseños equirradiales, diseño compuesto pequeño o diseños híbridos (Montgomery, 2002). Los diseños experimentales más utilizados para

ajustar funciones cuadráticas son Box-Behnken, central compuesto y Doehlert (Bezerra et al., 2019; Hibbert, 2012).

La interpretación de los resultados se realiza con los valores de los factores y de la respuesta. Se pueden comprobar los efectos de cada uno y sus interacciones. Mediante el análisis de varianza (ANOVA) se puede establecer si los efectos son o no significativos. El modelo matemático que se obtiene permite predecir el valor de la respuesta, según los valores de los factores, y permite buscar el valor óptimo (Montgomery, 2002).

El desarrollo de modelos matemáticos permite evaluar la relevancia y la interacción de los efectos de los factores. Si existe una interacción significativa entre los factores las condiciones óptimas indicadas por los estudios con una variable serán diferentes de los resultados correctos de la optimización con varias variables. Por lo tanto, el procedimiento con una variable puede fallar, ya que el efecto de una variable puede depender del nivel de las otras involucradas en la optimización. Es por eso que la optimización con varias variables involucra diseños para los cuales los niveles de todas las variables se cambian simultáneamente. Una vez determinados los factores significativos del sistema, se utilizan diseños experimentales más complejos, como el diseño Doehlert, diseños compuestos centrales o diseños de tres niveles, como el diseño de Box-Behnken, para determinar las condiciones óptimas de operación (Ferreira et al., 2007).

En esta Tesis se ha utilizado un software informático específico de diseño de experimentos (*Design Expert®*, Stat-Ease, Inc., Minneapolis, EEUU) para la aplicación de MSR y DEE. Este nos ha permitido planificar el trabajo de laboratorio y, además, hacer un análisis estadístico de los resultados obtenidos en los experimentos. En cuanto a los diseños de experimentos utilizados han sido el diseño factorial y el diseño Box-Behnken.

a) Diseño factorial

El diseño en el que se investigan todas las combinaciones posibles de los niveles de los factores se denomina diseño factorial. Por ejemplo, si el factor *A* tiene *a* niveles y el factor *B* tiene *b* niveles, el diseño tendrá todas las *ab* combinaciones posibles

de ambos factores (Montgomery, 2002). Los diseños factoriales son los diseños de primer orden más populares debido a su simplicidad. Son muy útiles para estudios preliminares y en pasos iniciales de optimización. Los diseños factoriales fraccionarios tienen mayores ventajas cuando el problema involucra una gran cantidad de factores (Tarley et al., 2009). El diseño factorial completo de dos niveles es el precursor del diseño central compuesto. Una ventaja es que se puede realizar de manera preliminar para una evaluación previa de los factores y después ampliar los experimentos con un diseño central compuesto (Ferreira et al., 2018).

En general, un diseño factorial completo se representa por n^k , donde k es el número de factores y n es el número de niveles, o valores posibles, que pueden tomar los factores. En la Figura 2.43 se representan dos diseños factoriales completos. Un diseño de dos factores con dos niveles, 2^2 , a) con un total de 4 ensayos; y un diseño de dos factores y tres niveles, 3^2 , b) con un total de 9 ensayos. Cada punto representa los valores de los factores para cada experimento (Hibbert, 2012).

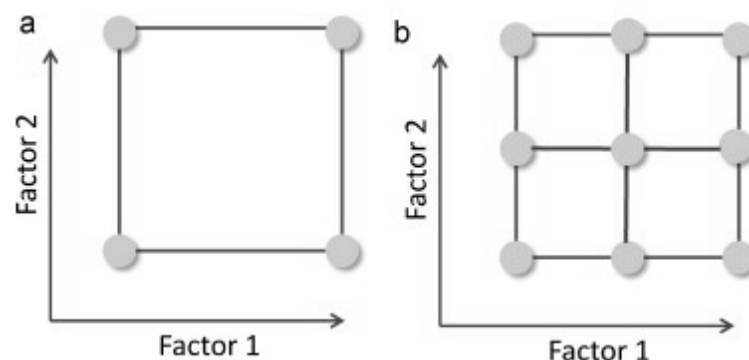


Figura 2.43. Diseños factoriales donde los puntos representan el número de experimentos: a) Diseño 2^2 ; b) Diseño 3^2 (Hibbert, 2012)

b) Diseño Box-Behnken

Un diseño de experimentos muy utilizado para obtener superficies de respuesta es el diseño Box-Behnken. Es un diseño factorial incompleto a tres niveles, donde los puntos experimentales son escogidos para permitir una estimación eficiente de los coeficientes de un modelo de segundo orden (Myers et al., 2016; Box et al., 2008). Este diseño fue descrito por primera vez por Box y Behnken (1960). Este diseño se

forma combinando factoriales 2^k con diseños de bloques incompletos, siendo rotatable o casi rotatable (Ferreira et al., 2007; Montgomery, 2002). La representación gráfica para tres factores del diseño Box-Behnken, Figura 2.44, es un cubo con un punto central y los puntos medios en los bordes.

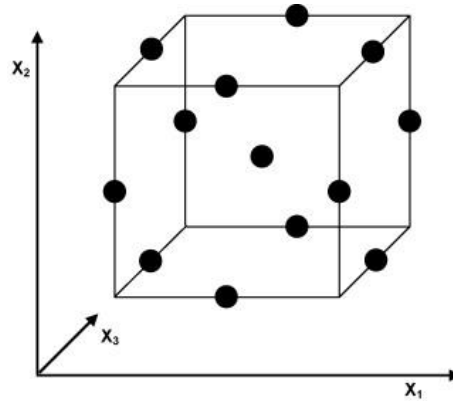


Figura 2.44. Diseño Box-Behnken para tres factores (Ferreira et al., 2007)

El número de experimentos (N) necesarios para llevar a cabo el diseño se calcula con la Ecuación 2.6:

$$N = 2k(k - 1) + C_0 \quad [2.6]$$

donde k es el número de factores y C_0 es el número de puntos centrales. Todos los niveles de los factores deben ajustarse solo en tres niveles $(-1, 0, +1)$, con intervalos igualmente espaciados entre ellos (Bezerra et al., 2008). Según Ferreira et al. (2007) este tipo de diseño es ligeramente más eficiente que el diseño central compuesto, y a su vez, más eficiente que los diseños factoriales completos de tres niveles.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS



3.1 Hipótesis

Como hipótesis de partida de esta Tesis Doctoral se acepta que, actuando sobre los principales factores agronómicos y tecnológicos, se pueden modular y, por tanto, mejorar las características organolépticas, nutricionales y funcionales del aceite de oliva virgen.

Para el estudio de los principales factores tecnológicos del proceso de elaboración de aceite de oliva virgen (tamaño de criba del molino, temperatura y tiempo de batido y uso de coadyuvantes tecnológicos y sus dosis) se puede utilizar la Metodología de Superficies de Respuesta, que permita obtener modelos matemáticos que nos ayuden a predecir los cambios que se producen en la composición del aceite de oliva virgen durante el proceso de elaboración. La razón por la que se considera adecuado realizar esta investigación es para poder comprobar la hipótesis de partida y optimizar los factores tecnológicos del proceso, y con ello obtener aceites con las mejores características organolépticas, nutricionales y funcionales.

Los factores agronómicos (regadío o secano, variedad de aceituna y estado de maduración de la aceituna) pueden influir, en gran medida, en la composición y calidad del aceite. Se pretende comprobar la hipótesis de partida y conocer, en conjunto, la influencia de los factores agronómicos en los modelos matemáticos obtenidos para los factores tecnológicos, según la variación de los factores agronómicos. La hipótesis se comprobará en cultivos superintensivos, durante una campaña oleícola, en dos fincas previamente seleccionadas que reúnen los requisitos necesarios.

En los últimos años se han introducido nuevas plantaciones de olivar en cultivos intensivos y superintensivos, con una mayor densidad de olivos por superficie, con más fácil mecanización y mayor producción y rentabilidad. Mediante el estudio y la difusión de los resultados se espera concienciar a la sociedad para que, paulatinamente, se produzca la transformación del cultivo tradicional en estos más competitivos y rentables.

La variedad de aceituna utilizada en los cultivos, el estado de maduración y la utilización del regadío van a proporcionar diferentes tipos de frutos, los cuáles van a producir aceites con distintas características. Principalmente, los cultivos de la provincia de Jaén son, mayoritariamente, tradicionales y de variedad Picual; las nuevas plantaciones de cultivos, con mayor densidad de plantas, son de variedades distintas a la Picual. Por esta razón, es interesante realizar ensayos con distintas variedades y analizar y comparar sus características.

Como consecuencia del cambio de los cultivos y cambios en la producción se espera que las almazaras se vayan adaptando a las nuevas tendencias, y se produzca la actualización tecnológica de su maquinaria y de la metodología de trabajo. En definitiva, se espera sensibilizar a la sociedad de que para competir debemos producir aceites de muy buena calidad y con rendimientos altos. Por ello, creemos y esperamos que este trabajo tenga una alta contribución al desarrollo social de la provincia y región.

En resumen, se pretende obtener aceites de oliva con unas características organolépticas, nutricionales y funcionales óptimas, por lo que el aceite tendría un valor añadido extra, haciéndolo más atractivo para el consumidor final. Mejorando su composición, el aceite de oliva puede ser una fuente natural de algunos compuestos de alto valor añadido como son los antioxidantes. El enriquecimiento del aceite de oliva en estos compuestos conlleva grandes beneficios, tanto económicos como sociales, ya que tendría repercusión en la economía local y nacional, y también en los efectos beneficiosos sobre la salud humana.

3.2 Objetivos

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral es obtener modelos matemáticos que nos permitan predecir la composición y calidad del aceite de oliva en función de los principales factores tecnológicos que intervienen en el proceso de elaboración a nivel de laboratorio e industrial. Asimismo, se estudiará la influencia de algunos factores agronómicos sobre dichos modelos obtenidos. Los objetivos específicos, detallados y enumerados, son los siguientes:

1. Modelar y optimizar los factores tecnológicos del proceso de obtención de aceite de oliva virgen: grado de molienda, temperatura y tiempo de batido de las pastas para la obtención de aceites de oliva vírgenes ricos en antioxidantes y compuestos volátiles.
2. Comparar la composición del aceite procedente de aceitunas de diferentes variedades.
3. Estudiar la influencia del índice de madurez en la composición y los rendimientos en aceite de algunas variedades de aceituna empleadas en cultivos superintensivos.
4. Determinar el índice de madurez óptimo y, por lo tanto, el momento adecuado para la recolección de la aceituna para poder obtener aceites de oliva vírgenes de calidad y de composición equilibrada.
5. Estudiar la influencia del tipo de cultivo, seco o regadío, en la composición del aceite de oliva.
6. Comprobar la validez de los modelos matemáticos obtenidos, para los factores tecnológicos, cuando varían los factores agronómicos.
7. Estudiar la influencia del talco como coadyuvante tecnológico en la calidad y composición del aceite obtenido a nivel industrial, y determinar la dosis adecuada.
8. Evaluar la influencia de los procesos de limpieza del aceite (lavado en centrifuga vertical, decantación y filtración) en la calidad y composición del aceite obtenido a nivel industrial.

4. DISCUSIÓN DE RESULTADOS



En el presente capítulo se hace un resumen global del trabajo realizado durante el período de investigación, se muestran los resultados obtenidos clasificados en dos bloques y 7 artículos, a los que han dado lugar, y se realiza una discusión conjunta de los resultados.

Para la obtención de los datos se ha trabajado con aceitunas recogidas en olivares pertenecientes a diferentes sistemas de cultivo (tradicional y superintensivo), de distintas variedades (Picual, Arbequina, Arbosana y Koroneiki), y los aceites se han obtenido de forma diferente (en discontinuo, a nivel de laboratorio, y en continuo, en almazara).

En la elaboración de los artículos, los resultados han sido tratados de forma separada. No obstante, en la última parte de este capítulo se realizan algunas comparaciones entre las diferentes respuestas analizadas de los distintos artículos publicados. En el bloque 1 y en el 2 se recogen los artículos publicados, aceptados o enviados a revistas científicas internacionales, con los mejores resultados obtenidos durante este trabajo. El bloque 1 está formado por los ensayos de extracción de aceites en el laboratorio mediante el sistema Abencor y el bloque 2 por los ensayos a escala industrial mediante el sistema de dos fases.

4.1 Resumen global

La recogida de aceitunas para el trabajo de esta Memoria se ha realizado durante tres campañas oleícolas, de la 2014/2015 a 2016/2017. En la Figura 4.1 se muestran las distintas campañas, con diferentes colores. En cada campaña se detalla el nivel experimental, la procedencia de las aceitunas y la variedad o variedades utilizadas. Además, se especifican las publicaciones a las que ha dado lugar cada campaña oleícola. Por último, también se especifican todas las determinaciones analíticas realizadas.

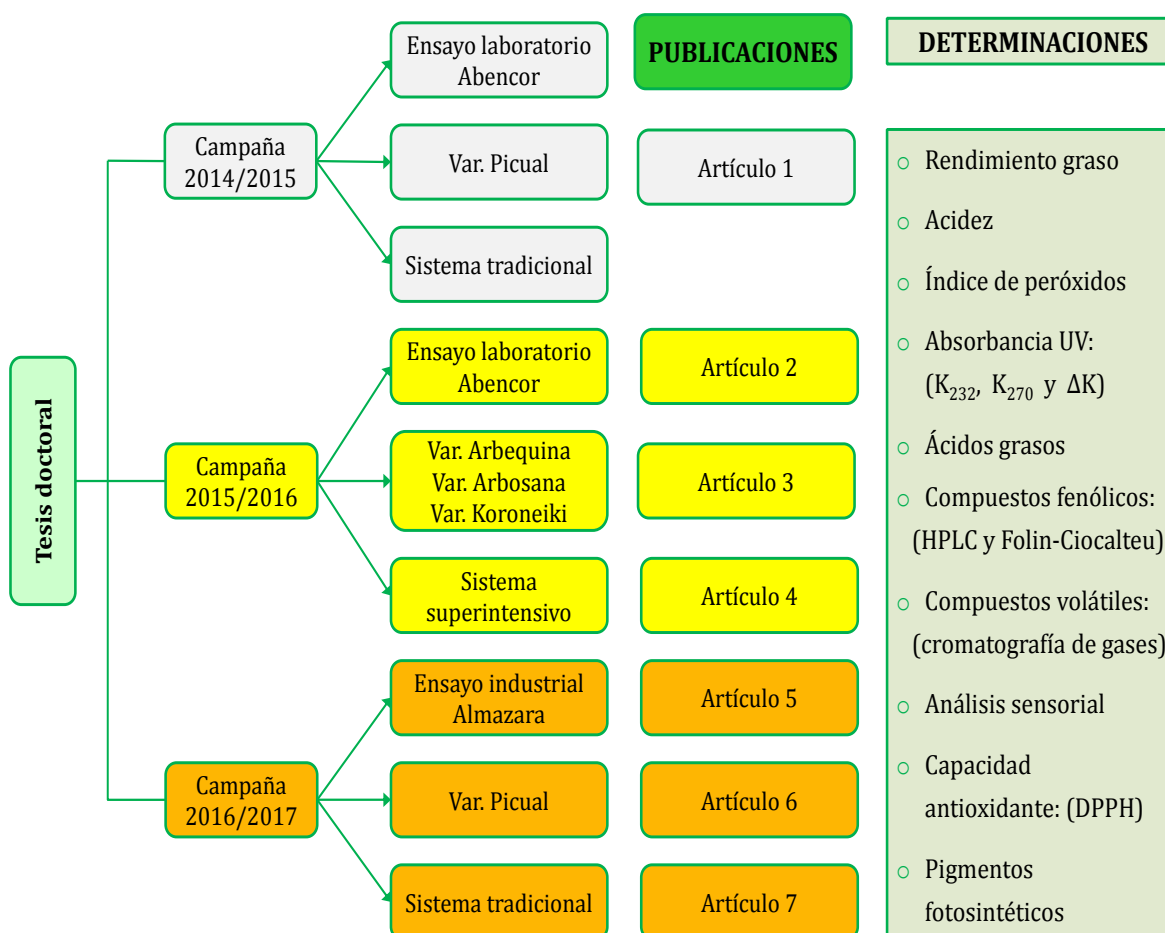


Figura 4.1. Resumen global

A) Campaña 2014/2015

En esta primera campaña se recogió una muestra de aceitunas de olivos procedentes de Cambil (Jaén), en la comarca de Sierra Mágina. La muestra fue de la variedad Picual, de cultivo tradicional, de secano, compuesta por 10 kg de aceitunas aproximadamente. Las coordenadas exactas de la recogida son: 37°39'23"N, 3°33'38"O. Las muestras fueron procesadas en discontinuo con el sistema Abencor en el mínimo tiempo posible desde su recogida.

B) Campaña 2015/2016

Un total de 17 muestras fueron recogidas en El Carpio (Córdoba), en fincas de la empresa Todolivo SL. Cada muestra formaba un lote compuesto por 10 kg de

aceitunas aproximadamente. Las muestras procedían de cultivos de secano y de regadío, de sistema de cultivo superintensivo y de diferentes variedades: Arbequina i-21[®], Arbosana i-43[®] y Koroneiki i-38[®]. Las coordenadas de la finca de regadío son: 37°57'13"N, 4°27'51"O y las coordenadas de la finca de secano son: 37°53'33"N, 4°35'39"O. Las muestras de aceitunas fueron transportadas hasta el laboratorio, dónde rápidamente fueron procesadas mediante el sistema Abencor.

C) Campaña 2016/2017

En esta campaña se realizaron ensayos en una almazara para estudiar a escala industrial y en continuo el proceso de elaboración de aceite de oliva virgen. La almazara se encuentra en Mancha Real (Jaén), concretamente en el Cortijo Virgen de los Milagros, perteneciente a la empresa MONVA SL. Las coordenadas de la almazara son: 37°51'37"N, 3°36'51"O. En todo momento la almazara operó en continuo. Se utilizaron dos muestras de aceitunas de 50000 kg, aproximadamente. Estas muestras se dividieron en 15 lotes, 8 lotes se utilizaron para un diseño estadístico de experimentos y el resto para el estudio del talco como coadyuvante tecnológico siguiendo la metodología tradicional. De cada lote se recogió el aceite por triplicado a la salida del decanter y de la centrífuga vertical, así como de pasta de aceituna y de orujo. También se recogieron algunas muestras de aceites antes y después del proceso de filtración.

En total, durante las tres campañas, 402 muestras de aceite de oliva fueron analizadas, junto a 468 muestras de pasta de aceituna y orujo. Todas las determinaciones analíticas que se realizaron a los aceites están indicadas en la Figura 4.1. A las muestras de pasta de aceituna y orujo se le determinó contenido graso, humedad y sólidos. En todos los ensayos de extracción de aceite se determinó el rendimiento y la eficacia de extracción.

4.2 BLOQUE 1. Extracción de aceites en laboratorio mediante el sistema Abencor

Este bloque contiene los resultados obtenidos de los ensayos a nivel de laboratorio en dos sistemas de cultivo y utilizando diferentes variedades de aceitunas. Con estos datos se han elaborado cuatro artículos científicos.

4.2.1 Campaña 2014/15: cultivo tradicional

En este primer punto se exponen los resultados más relevantes obtenidos de la muestra recogida en olivar tradicional, variedad Picual, y procesada en el laboratorio, con el sistema Abencor, en la campaña 2014/2015. Con los datos obtenidos se ha realizado un artículo y varias comunicaciones a congresos internacionales: *Artículo 1* (Figura 4.1) de título “Modeling of volatile and phenolic compounds and optimization of the process conditions for obtaining balanced extra virgin olive oils”. *Grasas y aceites*, 69 (2), e250 (Vidal, Alcalá, Ocaña, de Torres, Espínola y Moya, 2018).

Se han estudiado tres factores tecnológicos: el tamaño de criba del molino, con un rango entre 4,5 y 6,5 mm; la temperatura de batido, variable entre 20 y 40 °C; y el tiempo de batido, entre 30 y 90 minutos. Se ha realizado un diseño experimental tipo Box-Behnken de los tres factores y con 5 puntos centrales.

El principal objetivo fue obtener aceites de oliva vírgenes extra (AOVEs) equilibrados, con altos contenidos en compuestos volátiles y fenólicos. Siguiendo la Metodología de Superficies de Respuesta se han interpretado los resultados obtenidos y se ha optimizado con la función deseabilidad para maximizar los contenidos en volátiles y fenoles. Por tanto, se han determinado las condiciones óptimas de operación para obtener aceites equilibrados en su valoración organoléptica, frutados, y con los atributos de amargo y picante.

La temperatura de batido fue el factor con mayor influencia en las tres respuestas estudiadas (compuestos volátiles, fenólicos y capacidad antioxidante). Para los compuestos volátiles la temperatura tiene una influencia negativa, al aumentar la

temperatura disminuye el contenido de estos compuestos. Los compuestos volátiles disminuyen su contenido en un 36 % al aumentar la temperatura de 20 a 40 °C. Las condiciones óptimas para obtener el contenido máximo de volátiles (12,7 mg/kg) fueron 20 °C y con un diámetro de criba de 6,5 mm. Por el contrario, para los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante la influencia de la temperatura es positiva. A mayor temperatura mayor es el valor de ambas respuestas. Las condiciones óptimas para obtener el contenido máximo de compuestos fenólicos y capacidad antioxidante fueron 40 °C y con un diámetro de criba de 4,5 mm. En realidad, el tiempo de batido y diámetro de la criba del molino han mostrado una influencia poco significativa en estas respuestas. Aunque para la criba del molino, al aumentar el diámetro sí se observa que incrementan ligeramente los volátiles.

Para obtener un aceite de oliva virgen extra equilibrado, de alta calidad, de la variedad Picual, las condiciones de óptimas de elaboración son: temperatura de batido entre 20 y 25 °C y, preferiblemente, con un diámetro de orificio de la criba del molino de 6,5 mm. El tiempo de batido no tiene una influencia estadísticamente significativa en las respuestas. Con estas condiciones, los aceites obtenidos serán fragantes, amargos y picantes, y, nutricionalmente, saludables. Según el Reglamento UE (CEE, 2012), un AOVE se considera saludable cuando contiene más de 250 mg/kg, de hidroxitirosol y sus derivados.

4.2.2 Campaña 2015/2016: cultivo superintensivo

En esta campaña se realizaron distintos ensayos, a nivel de laboratorio, con aceitunas procedentes de cultivos superintensivos, de secano y regadío. Las muestras recogidas se procesaron mediante el sistema Abencor. Los factores agronómicos que se tuvieron en cuenta fueron: el índice de madurez, cultivos de regadío y secano, y diferentes variedades, Arbosana, Koroneiki y Arbequina. Como factores tecnológicos en la elaboración de aceites se consideraron el tamaño de criba del molino, la temperatura y el tiempo de batido de las pastas de aceituna. Se determinó el rendimiento y eficacia de extracción, por una parte, y en los aceites

obtenidos se analizaron compuestos volátiles, compuestos fenólicos, capacidad antioxidante y ácidos grasos, así como, los parámetros de calidad del aceite.

Con los resultados obtenidos de estas muestras de aceitunas se han elaborado tres artículos científicos y algunas comunicaciones a congresos internacionales:

- ✓ *Artículo 2* (Fig. 4.1), “Characterization of olive oils from superintensive crops with different ripening degree, irrigation management, and cultivar: (Arbequina, Koroneiki and Arbosana)”. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121 (4), 1800360. (Vidal, Alcalá, de Torres, Moya y Espínola, 2019b).
- ✓ *Artículo 3* (Fig. 4.1), “Elaboration of virgin olive oils rich in the bioactive compounds oleocanthal and oleacein. Proposal for separation at pilot plan level” (enviado).
- ✓ *Artículo 4* (Fig. 4.1), “Fresh and aromatic virgin olive oil obtained from Arbequina, Koroneiki, and Arbosana cultivars” (enviado).

Artículo 2

El objetivo de artículo fue estudiar la influencia de los factores agronómicos en la composición de los aceites. Para ello, los factores tecnológicos no se modificaron, fijándose una temperatura de batido de 30 °C, un tiempo de batido de 60 minutos y un tamaño de criba del molino de 5,5 mm.

Se observaron variaciones de la composición en los aceites según se utilizaban aceitunas de distintas variedades, diferente cultivo, regadío o secano, y con diferentes índices de madurez.

Generalmente, todas las variedades analizadas presentaban un mayor contenido en compuestos volátiles en los aceites obtenidos de las muestras procedentes de cultivos de regadío y bajos índices de madurez. El máximo contenido total de volátiles (35 mg/kg) se obtuvo con la muestra de variedad Arbequina, de cultivo de regadío y con un IM igual a 1,11.

Comparando todas las variedades estudiadas, las muestras de cultivos de secano y con alto IM, en el rango estudiado, presentaron un mayor contenido en compuestos fenólicos. En particular, el contenido máximo de fenoles totales (1320 mg/kg) se alcanzó con la muestra de la variedad Koroneiki, de secano y con el IM más alto del rango estudiado (2,05).

Respecto del perfil ácido de los aceites, el contenido de ácidos grasos monoinsaturados (MUFA) se incrementa al aumentar el IM y disminuye la proporción de ácidos grasos saturados (SFA). La variedad Koroneiki presentó la proporción más elevada de MUFA (79,6 %), y la menor proporción de SFA (14,7 %). La mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) se ha obtenido en los aceites procedentes de aceitunas de la variedad Arbequina (12,9 %).

Artículo 3

Con el objetivo de obtener aceites con alto contenido en compuestos bioactivos: oleocantal y oleaceína, se han realizado diseños Box-Behnken de tres factores tecnológicos y cinco puntos centrales. Se han utilizado tres variedades de aceituna, de regadío y de secano, en diferentes estados de maduración y se han estudiado tres factores de operación, temperatura de batido ente 20 y 40 °C, tiempo de batido entre 30 y 90 minutos y tamaño de criba del molino entre 4,5 y 6,5 mm.

A los aceites obtenidos, 289 en total, se les determinó la eficacia de extracción, parámetros de calidad reglamentada, contenido en compuestos volátiles mediante HPLC, capacidad antioxidante y contenido en los compuestos volátiles de la ruta de la lipoxigenasa (LOX). Aplicando la Metodología de Superficies de Respuesta y agrupando los fenoles por grupos (alcoholes fenólicos, flavonoides, lignanos y secoiridoides) y los compuestos volátiles totales, se han obtenido 221 modelos que reproducen el total de respuestas analizadas.

En las variedades analizadas, Arbequina, Arbosana y Koroneiki, se deduce que las aceitunas de la variedad Arbequina, procedentes de cultivos de regadío, producen los aceites con mayor concentración de compuestos volátiles (34,94 mg/kg), pero, por el contrario, con menor contenido en compuestos fenólicos (144 mg/kg). Las condiciones para obtener estos AOVEs son: diámetro de criba, 4,5 mm, tiempo de

batido, 30 minutos, y temperatura de batido, 20 °C. Los aceites de oliva de la variedad Koroneiki, de secano, obtenidos con diámetro de criba de 4,5 mm, tiempo de batido de 30 minutos y temperatura de 40 °C, son los aceites con mayor contenido de fenoles (1307 mg/kg), pero, por el contrario, tienen un bajo contenido de compuestos volátiles (5 mg/kg).

En conclusión, las variedades Arbequina y Arbosana de regadío producen aceites de oliva equilibrados, aromáticos y con un buen perfil de compuestos fenólicos. Por esto, son apreciados para su uso alimentario en crudo. En cambio, la variedad Koroneiki de secano produce aceites con bajo perfil organoléptico, pero con alto contenido en fenoles, sobretodo secoiridoides. Por lo tanto, estos aceites son idóneos para extracción de compuestos bioactivos, especialmente oleocantal y oleaceína.

Artículo 4

En este presente artículo se analiza la influencia de los factores tecnológicos y agronómicos de las mismas muestras de aceitunas utilizadas en el Artículo 3 sobre el contenido en compuestos volátiles y en pigmentos fotosintéticos. También se han utilizado los mismos diseños Box-Behnken de tres factores con cinco puntos centrales del artículo anterior. Los factores estudiados han sido temperatura de batido de las pastas, variable entre 20 y 40 °C; tiempo de batido, entre 30 y 90 minutos; y tamaño de criba del molino, de 4,5 a 6,5 mm. Se ha utilizado la MSR para analizar los resultados. Considerando los 17 aceites obtenidos y las respuestas analizadas y aplicando la MSR se han obtenido 204 modelos, estadísticamente significativos, que permiten reproducir los resultados experimentales.

A partir de los modelos se deduce que, la temperatura de batido es el factor con más influencia en las respuestas. Incrementos del factor elevan el contenido en pigmentos y disminuye el de compuestos volátiles en los aceites. La temperatura y el tiempo de batido son los factores con mayor influencia sobre las respuestas, el tamaño de criba ha mostrado una influencia pequeña.

El máximo contenido en pigmentos (60,13 mg/kg clorofilas y 23,50 mg/kg carotenoides, Koroneiki de secano e IM = 0,16) se ha obtenido para a 40 °C y 90 minutos, de temperatura y tiempo de batido de la pasta de aceituna, y tamaño de criba de 4,5 mm. El máximo de compuestos volátiles (34,94 mg/kg) se ha obtenido para la muestra de la variedad Arbequina de IM = 1,11 y, en todos los casos, en las muestras de cultivos de regadío; para las condiciones de tiempo y temperatura de batido de 20 minutos y 60 °C, respectivamente, y tamaño de criba del molino de 6,5 mm. El contenido en compuestos volátiles de los aceites de la variedad Koroneiki es muy inferior a los de Arbequina. (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexenol y hexanol son los compuestos que más incrementan su contenido en los aceites de oliva procedentes de muestras de regadío. El contenido de (*E*)-2-hexenal se incrementa durante la maduración, alcanzando el máximo cuando el color de la piel de la aceituna llega al envero.

4.3 BLOQUE 2. Ensayos a escala industrial mediante el sistema de dos fases

Este bloque contiene los resultados obtenidos en los ensayos realizados a nivel industrial en la almazara Cortijo Virgen de los Milagros de Mancha Real (Jaén), durante la campaña 2016/2017. Con estos resultados se han realizado tres artículos científicos.

4.3.1 Producción de aceite de oliva equilibrado

El objetivo de este trabajo fue obtener un excelente y equilibrado aceite de oliva virgen comercial, a nivel industrial, en condiciones de trabajo reales. La materia prima fue aceituna Picual de regadío en cultivo tradicional. Aunque la operación se realizó toda en continuo se modificaron tres variables de operación. Los ensayos se realizaron según un diseño factorial de 3 factores y dos niveles por factor. Los factores estudiados fueron: el tiempo de batido, fijado a 60 y 120 minutos, la temperatura de batido, fijada en 22 y 32 °C, y el tamaño de la criba del molino, utilizando cribas de 5 y 6 mm. El artículo publicado tiene por título “Industrial production of a balanced virgin olive oil”. *LWT-Food Science and Technology*, 97, 588–596. (Artículo 5, Fig. 4.1) (Vidal, Alcalá, de Torres, Moya y Espínola, 2018a).

Con los resultados experimentales y los modelos matemáticos obtenidos, aplicando la Metodología de Superficies de Respuesta, se deduce que el factor más influyente es la temperatura. La eficacia de extracción aumenta al aumentar el tiempo y la temperatura de batido, el máximo (88,9 %) se obtiene a 120 minutos y 32 °C de batido. Igual influencia tienen los factores sobre las clorofilas (32,5 mg/kg), oleocantal (62,3 mg/kg) y la capacidad antioxidante (992 µmol/kg). El contenido en compuestos fenólicos solo se ve influenciado significativamente por el factor temperatura, siendo máximo (338 mg/kg) a la máxima temperatura (32 °C). En cambio, el mayor contenido de compuestos volátiles de la ruta LOX (12,2 mg/kg) se obtuvo a la temperatura más baja (22 °C), tiempo alto (120 min.) y tamaño de criba pequeño (5 mm).

4.3.2 Uso de talco en la almazara

El objetivo que se persiguió fue evaluar la influencia de la adición de talco como coadyuvante tecnológico en la etapa de batido de la pasta de aceituna en almazara y condiciones reales de trabajo. Con los resultados obtenidos se elaboró el *Artículo 6* (Fig. 4.1), "Use of talc in oil mills: influence on the quality and content of minor compounds in olive oils". *LWT-Food Science and Technology*, 98, 31-38. (Vidal, Alcalá, de Torres, Moya y Espínola, 2018b).

Los resultados muestran varias ventajas del uso del coadyuvante durante la etapa de batido. La ventaja principal es que no se requiere un aumento de la temperatura durante el batido debido a la mejora en la extracción de aceite de oliva por adición del coadyuvante y, al mismo tiempo, no cambia la categoría de AOVE.

A bajas dosis de talco (0,75 %) la eficacia de extracción tiene un incremento máximo del 2,35 %. La desventaja es que el talco retiene el 26 % de su peso en aceite, es un compuesto lipofílico. Por lo tanto, es conveniente usar bajas dosis de coadyuvante. Los compuestos volátiles se ven poco influenciados por la adición de talco en el batido de la pasta de aceituna. No obstante, pequeñas dosis de talco reducen el contenido de etanol de los aceites de oliva. Los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante aumentaron con una adición de talco del 2 %, pero

disminuyeron a las dosis de 0,6 y 2,9 %. Las clorofilas disminuyen conforme aumenta la dosis de talco.

Los coadyuvantes tecnológicos, según definición del reglamento europeo (CEE, 2008) no son aditivos alimentarios. Su uso está justificado cuando los frutos están poco maduros, helados, con elevada humedad, o son de variedades con tendencia a formar pastas difíciles o emulsionadas, que dificultan la extracción del AOVE.

4.3.3 Influencia de la centrifugación, decantación y filtración de los aceites

Al objeto de estudiar la influencia del lavado de los aceites, su decantación en bodega y la filtración para eliminar sólidos en suspensión y humedad, se han recogido muestras de aceites en almazara. Con los resultados se ha elaborado el *Artículo 7* (Fig. 4.1), "Centrifugation, storage, and filtration of olive oil in an oil mill: effect on the quality and content of minority compounds". *Journal of Food Quality*, 2019, ID 7381761 (Vidal, Alcalá, de Torres, Moya y Espínola, 2019a).

Las muestras de aceites se tomaron a la salida de la centrífuga horizontal, vertical, salida de los depósitos decantadores y tras la filtración.

El lavado en centrífuga vertical influye sobre las respuestas estudiadas, disminuyendo el contenido en compuestos volátiles y fenólicos y la capacidad antioxidante. Esto es debido al uso de agua en esta etapa. Por lo que se debe minimizar la adición de agua durante la centrifugación, ya que muchos de estos compuestos tienen una constante de reparto agua/aceite que favorece la transferencia de los fenoles del aceite al agua (Rodis, Karathanos y Mantzavinou, 2002).

El almacenamiento para decantar los aceites disminuye en gran medida la capacidad antioxidante, hasta un 77 %, compuestos fenólicos hasta un 33 % y el contenido en clorofilas hasta un 54 %. Por tanto, la decantación debe durar el menor tiempo posible.

La filtración no tuvo gran influencia en las respuestas analizadas. Únicamente se vio afectado el contenido en clorofilas, que disminuyó un 47 %. Esto indica que la

filtración no afecta a la composición de ácidos grasos y compuestos volátiles y fenólicos del aceite de oliva, solo elimina partículas en suspensión y humedad, alterando el contenido de clorofilas.

4.4 Discusión conjunta

En este punto se va a llevar a cabo una descripción conjunta de todos los resultados obtenidos. Partimos de la base de que los datos obtenidos son heterogéneos en las tres campañas ya que han utilizado diferentes sistemas de extracción, cultivos y variedades de aceituna, por lo que la comparativa va ser meramente descriptiva. Mediante esta se va a resumir el trabajo realizado en estos años y a identificar qué muestras, qué factores agronómicos o qué condiciones de extracción van a ser las óptimas para conseguir un AOVE con una composición determinada, pudiendo así maximizar la eficacia de extracción, el contenido en compuestos volátiles, fenólicos, pigmentos fotosintéticos o la proporción de ácidos grasos.

En la Tabla 4.1 se recogen los resultados más relevantes en estas tres campañas de aceituna, clasificados según la campaña oleícola y la variedad utilizada. Además, en la columna de la variedad se encuentra el número de artículo. Se especifica el valor máximo experimental obtenido para cada parámetro determinado (eficacia de extracción, compuestos volátiles, fenoles, capacidad antioxidante, clorofilas y proporción de MUFA y PUFA) y las condiciones de operación, excepto para SFA que se ha buscado que tenga un valor mínimo, pues estos son perjudiciales para la salud humana. En la tabla también se muestran las condiciones de obtención del AOVE y algunos parámetros específicos de las muestras de aceituna, como IM y tipo de cultivo.

Tabla 4.1. Resultados de algunas respuestas para todas las muestras analizadas

Campaña oleícola	Variedad	Eficacia de extracción, %	Volátiles LOX, mg/kg	Fenoles totales, mg/kg	DPPH, $\mu\text{mol}/\text{kg}$	Ácidos grasos			Pigmentos (clorofilas), mg/kg	
						SFA, %	MUFA, %	PUFA, %		
2014/ 2015	Picual (Artículo 1)	85,9 (20 °C, 90 min, 5,5 mm)	13,4 (20 °C, 60 min, 6,5 mm)	851 (40 °C, 90 min, 5,5 mm)	2668 (40 °C, 90 min, 5,5 mm)	-	-	-	-	
		Secano, IM = 4,9								
2015/ 2016	Arbequina (Artículos 2, 3 y 4)	78,5 (20 °C, 90 min, 5,5 mm)	35,0 (20 °C, 60 min, 6,5 mm)	644 (40 °C, 30 min, 5,5 mm)	2074 (40 °C, 30 min, 5,5 mm)	17,9 (30 °C, 60 min, 5,5 mm)	74,5 (40 °C, 90 min, 5,5 mm)	12,9 (20 °C, 30 min, 5,5 mm)	30,0 (40 °C, 60 min, 4,5 mm)	
		Secano, IM = 2,6								
		Regadío, IM = 1,1								
2015/ 2016	Koroneiki (Artículos 2, 3 y 4)	85,1 (20 °C, 90 min, 5,5 mm)	12,8 (20 °C, 90 min, 5,5 mm)	1320 (40 °C, 60 min, 4,5 mm)	3490 (40 °C, 30 min, 5,5 mm)	14,7 (20 °C, 60 min, 6,5 mm)	79,6 (30 °C, 60 min, 5,5 mm)	9,2 (30 °C, 90 min, 4,5 mm)	51,9 (40 °C, 60 min, 6,5 mm)	
		Secano, IM = 2,1								
		Regadío, IM = 2,1								
2016/ 2017	Picual (Artículo 5)	77,3 (30 °C, 90 min, 6,5 mm)	23,8 (20 °C, 90 min, 5,5 mm)	920 (40 °C, 30 min, 5,5 mm)	2810 (40 °C, 30 min, 5,5 mm)	16,9 (30 °C, 60 min, 5,5 mm)	77,1 (20 °C, 60 min, 6,5 mm)	8,4 (30 °C, 90 min, 4,5 mm)	11,7 (40 °C, 60 min, 6,5 mm)	
		Secano, IM = 2,1								
		Regadío, IM = 0,6								
2016/ 2017	Picual (Artículo 6)	88,9 (32 °C, 120 min, 6 mm)	12,2 (22 °C, 120 min, 5 mm)	338 (32 °C, 120 min, 6 mm)	992 (32 °C, 120 min, 6 mm)	15,8 (32 °C, 120 min, 5 mm)	80,1 (32 °C, 60 min, 6 mm)	4,4 (22 °C, 60 min, 5 mm)	32,5 (32 °C, 120 min, 5 mm)	
		Regadío, IM = 1,8								
		Regadío, IM = 1,8								
2016/ 2017	Picual (Artículo 7)	92,2 (22 °C, 150 min, 0,6 % talco)	7,8 (22 °C, 6 mm, 2,9 % talco)	522 (22 °C, 6 mm, 0 % talco)	1616 (22 °C, 6 mm, 0,6 % talco)	15,1 (22 °C, 6 mm, 0 % talco)	80,9 (22 °C, 6 mm, 0,6 % talco)	4,3 (22 °C, 6 mm, 2,1 % talco)	13,8 (22 °C, 6 mm, 0 % talco)	
		Regadío, IM = 4,4								
		Regadío, IM = 4,4								
2016/ 2017	Picual (Artículo 7)	-	11,7 (Sin filtrar)	438 (Salida decanter)	1360 (Salida decanter)	15,8 (32 °C, 120 min, 6 mm)	80,1 (32 °C, 120 min, 6 mm)	4,1 (32 °C, 120 min, 6 mm)	35,2 (Salida decanter)	
		Regadío, IM = 1,7								
		Regadío, IM = 1,7								

4.4.1 Eficacia de extracción

La eficacia de extracción se define como el porcentaje del contenido de aceite inicial que se extrae en el proceso. Este parámetro ofrece información sobre la efectividad de la extracción del aceite de oliva (Moya et al., 2010). El aceite que no se ha extraído durante el proceso queda en el orujo. Así, poca cantidad de aceite en el orujo es sinónimo de una elevada eficacia de extracción. Generalmente, un alto porcentaje del aceite contenido en la aceituna es extraído fácilmente, pero un resto de alrededor de 10-20 % es difícil de extraer (Squeo et al., 2017; Tamborrino et al., 2017). Para obtener la mayor cantidad de aceite se debe optimizar el proceso. En este caso, la etapa del batido es fundamental para maximizar la cantidad de aceite extraído (Clodoveo, 2012; Inarejos-García, Gómez-Rico, Salvador y Fregapane, 2009) y mejorar la eficacia de extracción (Tamborrino et al., 2017; Espínola, Moya, Fernández y Castro, 2009).

El valor más elevado de eficacia de extracción (92,2 %) se ha obtenido en un ensayo industrial a una temperatura y un tiempo de batido de 22 °C y 150 min, respectivamente, con una adición de talco del 0,6 %. Según nuestros resultados, el factor con mayor influencia sobre la eficacia de extracción es el tiempo de batido. La temperatura de batido y el diámetro del orificio de la criba del molino tienen una influencia menor. La adición de talco, a baja temperatura (22 °C), tiene una influencia positiva a pequeñas dosis, hasta una dosis del 0,75 %. Por el contrario, a altas dosis tiene una influencia negativa. Según los resultados obtenidos por Espínola et al. (2009), el uso de coadyuvante a baja temperatura (20 °C) mejora la extracción más que el aumento de la temperatura sin coadyuvante, y el tiempo debe ser el más elevado posible. También Alcalá-Reyes (2016) observa que el tiempo tiene una gran influencia sobre la eficacia de extracción.

Con el sistema Abencor, a nivel de laboratorio, se obtiene un rendimiento y una eficacia de extracción inferior comparado con el proceso continuo en una almazara, ya que este proceso es discontinuo y las condiciones de extracción del aceite son menos intensas que en el proceso continuo. Con las aceitunas de cultivo superintensivo, recogidas con un IM muy bajo, se han obtenido los valores más

bajos de eficacia de extracción, en concordancia con los resultados obtenidos por Espínola, Moya, Fernández y Castro (2011) para cultivo tradicional.

4.4.2 Compuestos volátiles

Comparando los compuestos volátiles de todas las muestras, no se observa una tendencia definida, ya que existe una gran diferencia entre todas las muestras analizadas. Esto es debido a que se están comparando muestras recogidas con diferentes características (variedad, índice de madurez, regadío o seco, procedencia y año de recolección). Además, las condiciones de extracción también son diferentes. En general, las aceitunas recolectadas en cultivos de regadío producen aceites con un mayor contenido en estos compuestos. La temperatura de batido es la variable que más influye, el contenido máximo de volátiles de la ruta LOX se ha determinado en las muestras extraídas a bajas temperaturas.

El máximo contenido de compuestos volátiles procedentes de la ruta LOX, 35 mg/kg, se ha obtenido con la muestra de aceitunas de la variedad Arbequina, campaña 2015/2016 e índice de madurez de 1,1, las condiciones de operación fueron 20 °C, 6,5 mm y 60 min. Los aceites procedentes de muestras de cultivos de seco tienen hasta un 39 % menos de estos compuestos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Baccouri et al. (2008), Benito et al. (2013), Cherfaoui, Cecchi, Keciri y Boudriche (2018), Fregapane, Gómez-Rico y Salvador (2010), Gómez-Rico, Salvador, La Greca y Fregapane (2006), Gómez-Rico, Fregapane y Salvador (2008) y Kalua, Allen, Bedgood Jr., Bishop y Prenzler (2005).

Los compuestos volátiles, y en particular el (*E*)-2-hexenal, aumentan con el IM, alcanzando una concentración máxima durante el envero, la piel de las aceitunas inicia el cambio del color verde-amarillo a púrpura, con IM, para la variedad Picual, alrededor de 3-3,5.

La mayoría de los compuestos volátiles se forman a partir de la degradación de ácidos grasos poliinsaturados mediante una serie de reacciones bioquímicas. La razón por la cual los compuestos volátiles tienen una mayor concentración a temperatura baja es debido a que esta es la temperatura óptima de trabajo de las

enzimas implicadas en la ruta LOX (Sánchez-Ortiz, Bejaoui, Quintero-Flores, Jiménez y Beltrán, 2018; Sánchez-Ortiz, Pérez y Sanz, 2013; Sánchez y Harwood, 2002).

La variabilidad en el contenido de los compuestos volátiles en el AOVE está fuertemente predeterminada según las características genéticas de cada variedad (Hachicha Hbaieb, Kotti, Gargouri, Msallem y Vichi, 2016; Inglese, Famiani, Galvano, Servili, Esposito y Urbani, 2010; Kalua et al., 2005). Esto explica las grandes diferencias entre las muestras analizadas durante las tres campañas oleícolas.

4.4.3 Compuestos fenólicos

Existe una gran variabilidad en los datos de compuestos fenólicos obtenidos en los diferentes aceites debido a las diferencias entre variedades y a los factores agronómicos y tecnológicos aplicados en la elaboración de los diferentes aceites. Estas diferencias también han sido confirmadas por varias investigaciones anteriores (Rodrigues et al., 2018; de Torres, Espínola, Moya, Alcalá, Vidal y Castro, 2018; Lukic, Žanetic, Jukic Špika, Lukic, Koprivnjak, y Brkic Bubola, 2017; de Torres, Espínola, Moya y Castro, 2016; Romero, Saavedra, Tapia, Sepúlveda y Aparicio, 2015; Ballus, Meinhart, de Souza Campos, da Silva, Luiz Fernando de Oliveira, de Oliveira y Godoy, 2014; Gómez-Rico et al., 2008; Kalua et al., 2005).

Haciendo un análisis global, las concentraciones más altas de compuestos fenólicos en los aceites se obtuvieron a temperaturas de batido elevadas (40 °C). Además, la temperatura es el factor más influyente sobre este grupo de compuestos en los aceites. De todos los resultados experimentales, el mayor valor obtenido es 1320 mg/kg de compuestos fenólicos totales en un aceite procedente de aceitunas de la variedad Koroneiki, en la campaña 2015/2016, de secano y con índice de madurez 2,1; con las condiciones de extracción de 40 °C, 60 min y 4,5 mm. Los aceites procedentes de aceitunas de cultivos de secano tienen un mayor contenido de fenoles que los aceites de regadío. Los aceites de regadío tienen hasta un 63 % menos de contenido en estos compuestos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Hachicha Hbaieb, Kotti, Valli, Bendini, Toschi y Gargouri (2017) y

Lukić, Žanetić, Jukić Špika, Lukić, Koprivnjak y Brkić Bubola (2017). La disponibilidad y distribución del agua durante el ciclo vegetativo del olivo influye sobre la concentración fenólica del AOVE (Servili, Selvaggini, Esposito, Taticchi, Montedoro y Morozzi, 2004). Incluso las lluvias producidas durante el crecimiento y la maduración de los frutos del olivo afectan al contenido fenólico del AOVE obtenido a partir de estos (Pannelli, Servili, Servaggini, Baldioli y Montedoro, 1994).

Durante la maduración se producen importantes cambios químicos dentro de las aceitunas que están relacionados con la síntesis de sustancias orgánicas y con otras actividades enzimáticas que afectan la composición del aceite de oliva virgen. (Wani et al., 2018; Bengana et al., 2013; Benito et al., 2013; Dag, Kerem, Yogev, Zipori, Lavee y Ben-David, 2011; Damak, Bouaziz, Ayadi, Sayadi y Damak, 2008; Salvador, Aranda y Fregapane, 2001; Yousfi, Cert y García, 2006; Boskou, 2006; Gómez-Rico et al., 2008; Morelló, Romero y Motilva, 2004; Montedoro, Garafolo y Bertuccioli, 1986). El contenido en compuestos fenólicos totales aumenta progresivamente hasta alcanzar un máximo a un IM aproximado de 2-3 (dentro de la zona de envero), pasada esta zona, con aceituna negra, disminuyen progresivamente (Benito et al., 2013; Youssef et al., 2010; Baccouri et al., 2008; Salvador et al., 2001). En nuestros trabajos también se observa un punto máximo en la zona del envero. Esto se debe a que la actividad de la enzima responsable de la síntesis de compuestos fenólicos, fenilalanina amoniaco liasa, disminuye durante el proceso de maduración. Posteriormente, a medida que avanza la maduración de la aceituna, la actividad de la enzima polifenol oxidasa aumenta, coincidiendo con una fuerte disminución de la concentración de oleuropeína en la aceituna (Morelló, Vuorela, Romero, Motilva y Heinonen, 2005).

El contenido total de estos compuestos en los aceites se ve afectado por las variables de operación en el proceso de elaboración del AOVE. La solubilidad y la distribución de los fenoles entre las fases oleosa y acuosa en el proceso de elaboración de AOVE es un factor importante, pero no es el único mecanismo involucrado en la reducción de la concentración fenólica en los aceites. Las reacciones oxidativas catalizadas por oxidorreductasas, como la polifenoloxidasa y la peroxidasa, pueden promover la oxidación fenólica durante el proceso y

producir una disminución de estos (Servili et al., 2004; Rodis et al., 2002; Bianco, Cocioli, Guiso y Marra, 2002). Al mismo tiempo, la temperatura influye sobre estas reacciones de oxidación, de aquí que este factor tenga una gran importancia en el proceso. Por otra parte, a nivel industrial se ha observado un aumento de los compuestos fenólicos por el uso de coadyuvantes tecnológicos en la etapa del batido. Por lo que los aceites obtenidos mediante el uso de coadyuvantes son más saludables y, a falta de otras valoraciones, tienen mayor calidad (Espínola, Moya, de Torres y Castro, 2015).

Dentro de este grupo existen compuestos con gran capacidad antioxidante y propiedades saludables para el ser humano. Para el caso del oleocantal y oleaceína, dos compuestos secoiridoides, se ha propuesto un proceso para realizar una extracción a partir de aceites procedentes de aceitunas de la variedad Koroneiki (Figura 4, del *Artículo 3*), ya que es la variedad con un mayor contenido en estos compuestos, de las variedades estudiadas. Para un aceite de aceitunas de secano de esta variedad se han encontrado contenidos de oleaceína y oleocantal de 500 mg/kg y 174 mg/kg, respectivamente. Así, el aceite de oliva puede considerarse como una fuente de compuestos bioactivos. De las variedades con las que hemos trabajado, la variedad Picual, mayoritaria en Jaén, también produce aceites con elevado contenido en compuestos fenólicos.

Como se ha indicado anteriormente, el esquema que se muestra en la Figura 4, *Artículo 3*, parte de someter el aceite de oliva a una extracción con una mezcla de etanol-agua (4:1). La fase polar se seca al vacío y se recupera el extracto fenólico seco. Los componentes individuales del extracto seco se separan mediante cromatografía de partición, usando una mezcla de hexano-acetato de etilo (2:3) como fase móvil y una mezcla de fase estacionaria de etanol-agua (2:3). Estos compuestos se separan por sus afinidades con cada fase y se recuperaran de acuerdo con sus tiempos de elución. Este método está diseñado para obtener compuestos bioactivos, de alto valor añadido, a partir de aceites de oliva ricos en compuestos fenólicos.

4.4.4 Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante, determinada mediante el radical DPPH, tiene una tendencia similar a los compuestos fenólicos. En el *Artículo 1*, Figura 2, se demuestra que existe una buena correlación ($R^2 = 0,94$) entre ambas respuestas. Ramos-Escudero, Morales y Asuero (2015), Franco et al. (2014) y Fuentes, Paucar, Tapia, Ortiz, Jiménez y Romero (2018) también observaron que existe relación entre la capacidad antioxidante y los compuestos fenólicos, aunque depende de la variedad y de los factores ambientales. Por otro lado, en el *Artículo 3* se ha determinado una buena correlación entre la capacidad antioxidante y el contenido de oleaceína, con $R^2 = 0,958$.

El máximo valor obtenido fue de 3490 μmol trolox/kg, en la variedad Koroneiki, de cultivo de secano con un IM igual a 2,1. Las condiciones de extracción para obtener este resultado fueron de 40 °C de temperatura de batido, tiempo de batido de 60 min y tamaño de criba de 5,5 mm. En general, a temperaturas elevadas, 40 °C, se obtuvieron los resultados más altos de capacidad antioxidante. La temperatura fue el factor que tuvo mayor influencia sobre esta respuesta. Los aceites procedentes de muestras de cultivos de secano tienen una mayor capacidad antioxidante que los aceites de cultivos de regadío.

4.4.5 Ácidos grasos

El perfil ácido de los aceites de oliva depende principalmente de la variedad de aceituna (Alowaiesh, Singh, Fang y Kailis, 2018; Borges, Pereira, Cabrera-Vique, Lara, Oliveira y Seiquer, 2017; Rondanini, Castro, Searles y Rousseaux, 2014; Conde, Delrot y Gerós, 2008; Berenguer, Vossen, Grattan, Connell y Polito, 2006; Beltrán, Aguilera, Río, Sánchez y Martínez, 2005; Salvador et al., 2001). Las distintas variedades analizadas tienen diferentes proporciones de MUFA, PUFA y SFA.

De los resultados incluidos en esta Memoria, el aceite con la mayor proporción de MUFA (80,9 %) se obtuvo de la variedad Picual, procedente de cultivo de regadío y con IM de 4,4; a las condiciones de operación de 22 °C de temperatura de batido,

tamaño de criba de 6 mm y adición de 0,6 % de talco. Para las diferentes variedades utilizadas, se alcanzó el valor máximo de MUFAs en los IM más elevados. La mayor proporción de PUFA fue de 12,9 %, para un aceite de la variedad Arbequina, de secano, con un IM de 1,3; y condiciones de operación de 5,5 mm de tamaño de criba, temperatura 20 °C y tiempo de batido de 30 min. La mínima proporción de SFA (14,7 %) se obtuvo en un aceite de la variedad Koroneiki, de regadío, IM = 2,3 y empleando como factores tecnológicos criba de 6,5 mm, 20 °C de temperatura de batido y tiempo de 60 min. Para las variedades estudiadas, las muestras con índices de madurez más alto presentaron la proporción menor de SFA. Por lo tanto, el índice de madurez es clave para la formación de los ácidos grasos. Estos resultados coinciden con los publicados por Fuentes de Mendoza et al. (2013) y Poiana y Mincione (2004).

El momento de recogida de los frutos y la variedad utilizada va a ser importante para obtener un aceite de oliva que tenga un perfil lipídico lo más saludable posible, siendo rico en compuestos MUFA y pobre en SFA. El contenido de ácido oleico en los aceites se incrementa al aumentar el IM. Por el contrario, los ácidos grasos linoleico y linolénico tienen un comportamiento diferente. Cuando el IM aumenta, su contenido disminuye. Este hecho se explica por la degradación que sufren estos dos compuestos en la ruta LOX (Salas, Williams, Harwood y Sánchez, 1999). Los ácidos grasos cambian su contenido a lo largo del tiempo, dependiendo de la variedad y de las condiciones ambientales (Rondanini et al., 2014). La proporción de MUFA se incrementa con la maduración y, en cambio, los SFA disminuyen. Estos resultados coinciden con los de Poiana y Mincione (2004) y Fuentes de Mendoza et al. (2013) y son contrarios a los obtenidos por Alowaiesh et al. (2018), pero utilizando variedades diferentes.

Los factores tecnológicos estudiados no han tenido una gran influencia en el contenido de ácidos grasos de los aceites, ni la filtración de los mismos. Estos resultados son similares a los obtenidos por Bubola y Koprivnjak (2015) y Lozano-Sánchez, Cerretani, Bendini, Gallina-Toschi, Segura-Carretero y Fernández-Gutiérrez (2012).

4.4.6 Pigmentos fotosintéticos: clorofilas

Las clorofilas son los pigmentos fotosintéticos responsables del color verde del aceite de oliva. El contenido total de estos pigmentos en las aceitunas y en los aceites depende de los factores agronómicos (Baccouri et al., 2008; Cerretani, Motilva, Romero, Bendini y Lercker, 2008; Criado, Motilva, Goñi y Romero, 2007; Criado, Romero y Motilva, 2007; Roca y Mínguez-Mosquera, 2003) y de los factores tecnológicos (Criado et al., 2007; Gallardo-Guerrero, Gandul-Rojas, Roca y Mínguez-Mosquera, 2005; Cert, Alba, León-Camacho, Moreda y Pérez-Camino, 1996; Di Giovacchino, Solinas y Miccoli, 1994). En nuestros trabajos se ha determinado que la composición de pigmentos fotosintéticos en los aceites depende, tanto cuantitativa como cualitativamente, de la composición genética de la aceituna utilizada. Similar a lo indicado por Criado et al. (2007) Giuliani, Cerretani y Cichelli (2011) y Roca y Mínguez-Mosquera (2001). Esto explica las grandes diferencias encontradas en las cuatro variedades analizadas (Picual, Arbequina, Arbosana y Koroneiki). Además, los aceites procedentes de aceitunas de secano contienen más pigmentos fotosintéticos que los obtenidos a partir de aceitunas de regadío, similar al trabajo realizado por García, Morales-Sillero, Pérez-Rubio, Díaz-Espejo, Montero y Fernández (2017), Lazzerini, Cifelli y Domenici (2017) y Criado et al. (2007).

El máximo contenido en clorofilas (51,9 mg/kg) se ha obtenido para aceites de la variedad Koroneiki, de secano, con IM de 0,2, en concordancia con Psomiadou y Tsimidou (2001) que, comparando diferentes variedades de aceitunas, indican que los aceites de la variedad Koroneiki son los que tienen mayor contenido de clorofilas. El máximo valor anterior se ha obtenido con tamaño de criba de 6,5 mm, temperatura de batido de 40 °C y 60 min de tiempo de batido.

En general, el IM de las aceitunas influye en el contenido de pigmentos fotosintéticos, clorofilas y carotenoides. Realizando una comparativa entre todos los resultados obtenidos, el contenido de clorofilas es mayor a índices de madurez bajos. Durante el proceso de maduración disminuye el contenido de compuestos fotosintéticos, pero, debido a factores agronómicos y medioambientales, la disminución es diferente entre distintos años (Benito et al., 2013; Garrido, Gandul,

Gallardo y Mínguez, 1990; Gutiérrez, Jiménez, Ruíz y Albi, 1999). En aceitunas poco maduras tiene una gran actividad la enzima clorofilasa, responsable de la síntesis de la clorofila. Después, a lo largo de la maduración, disminuye la actividad de clorofilasa y aparecen otras enzimas que catalizan la oxidación del anillo de porfirina de la clorofila (Giuliani et al., 2011; Roca y Mínguez-Mosquera, 2001) por lo que se produce una reducción de clorofilas en las aceitunas y en los aceites.

Como se ha indicado anteriormente, también los factores tecnológicos del proceso de elaboración de aceites influyen en el contenido de los pigmentos (Criado et al., 2007; Gallardo-Guerrero, Gandul-Rojas, Roca y Mínguez-Mosquera, 2005; Cert, Alba, León-Camacho, Moreda y Pérez-Camino, 1996; Di Giovacchino, Solinas y Miccoli, 1994), a mayor temperatura se ha obtenido mayores concentraciones de clorofilas en los aceites.

La molturación también influye en la concentración de los pigmentos fotosintéticos en los aceites, gran parte de ellos se liberan en el molino debido a la rotura de los tejidos de la aceituna. Solo una pequeña parte de los pigmentos pasa al AOVE, porque en el proceso de extracción existe una pérdida de clorofila de hasta el 80 %, quedando mayoritariamente el resto en los subproductos de la extracción (Gallardo-Guerrero, Roca y Mínguez-Mosquera, 2002). La pérdida de los pigmentos durante el proceso de extracción del aceite de oliva se debe principalmente a la retención de estos en el orujo, más que a la degradación durante el proceso (Criado et al., 2007). Por esto, es importante controlar el grado de molienda de las aceitunas para obtener aceites de oliva con una mayor o menor proporción de estos compuestos. Un diámetro de orificio pequeño (4,5 mm) va a producir mayor rotura de los tejidos, y por lo tanto, se va a transferir mayor cantidad de pigmentos al aceite de oliva (Alcalá-Reyes, 2016).

A escala industrial, el contenido en clorofilas disminuyó al aumentar la adición de talco. Este resultado es similar a los obtenidos por Alcalá-Reyes (2016) y Tamborrino et al. (2017). Por el contrario, según Criado et al. (2007) el uso de coadyuvantes aumenta la afinidad de los pigmentos por la fase oleosa. Esto es contrario a nuestros resultados, puede ser debido a la diferencia entre ambos trabajos sobre la dosis de coadyuvante utilizada, o el uso de distintas variedades o

condiciones de trabajo diferentes. No obstante, en algunos trabajos de investigación se han observado variaciones significativas en el contenido de clorofilas usando talco en el batido y en otros trabajos no (Caponio, Squeo, Difonzo, Pasqualone, Summo y Paradiso, 2016).

Por último, la filtración reduce el contenido de clorofilas en los aceites, de acuerdo con otros trabajos, y probablemente, debido a que son retenidos por el medio filtrante (Bottino, Capannelli, Mattei, Rovellini y Zunin, 2008; Lozano-Sánchez, Cerretani, Bendini, Segura-Carretero y Fernández-Gutiérrez, 2010).

5. CONCLUSIONES



Las principales conclusiones alcanzadas en esta Tesis Doctoral son las siguientes:

1. La Metodología de Superficies de Respuesta ha resultado muy eficaz para el modelado y optimización de los principales factores tecnológicos que intervienen en el proceso de elaboración del aceite de oliva virgen.
2. Cada variedad de aceituna proporciona un aceite de oliva virgen distinto en relación a su composición. La variedad Arbequina proporciona aceites de oliva ricos en compuestos volátiles (35 mg/kg). En cambio, la variedad Koroneiki tiene una mayor proporción de compuestos fenólicos (1320 mg/kg) y mayor capacidad antioxidante (3490 μmol trolox/kg), comparando las variedades analizadas.
3. Los factores agronómicos influyen en la composición final del aceite de oliva virgen. Las muestras de aceitunas procedentes de cultivos de regadío proporcionan aceites más ricos en compuestos volátiles. Por el contrario, las muestras de cultivos de secano son más ricos en compuestos fenólicos.
4. La evolución de la maduración de la aceituna influye sobre la composición del aceite de oliva. Los compuestos fenólicos aumentan durante la maduración hasta alcanzar un máximo. El índice de madurez óptimo para alcanzar una concentración máxima de estos compuestos, para la variedad Picual, está alrededor de 3-3,5 (durante el envero). Para las variedades Arbequina, Arbosana y Koroneiki, de cultivo superintensivo, el índice de madurez óptimo es 2, aproximadamente.
5. Se han obtenido modelos matemáticos que relacionan los principales factores tecnológicos con las respuestas: eficacia de extracción, compuestos volátiles y fenólicos, capacidad antioxidante, pigmentos fotosintéticos y perfil de ácidos grasos.
6. Los factores tecnológicos influyen notablemente en la composición final del aceite de oliva virgen.

7. La temperatura de batido es el factor tecnológico con mayor influencia sobre la composición del aceite de oliva. El tiempo de batido y el tamaño de la criba tienen menos influencia en dicha composición.
8. El uso del talco durante el batido, como coadyuvante tecnológico, aumenta la eficacia de extracción a bajas dosis (< 1%). A dosis elevadas disminuye el rendimiento dada su capacidad de retener el 26% de su peso en aceite.
9. La composición del aceite de oliva depende de los procesos de limpieza del mismo (lavado en centrífuga vertical, decantación y filtración). Estos procesos son necesarios, ya que ayudan a eliminar las impurezas del aceite de oliva virgen. No obstante, durante la centrifugación vertical se reduce el contenido de compuestos volátiles un 9 % y de fenólicos un 22,9 %. Durante la decantación se produce una disminución del contenido de compuestos fenólicos del 33,5 %. Por el contrario, la filtración no tiene gran influencia en las respuestas estudiadas.
10. Se deben optimizar los factores tecnológicos y agronómicos para producir un aceite de oliva virgen equilibrado. Es una labor difícil ya que los factores tecnológicos y agronómicos influyen de forma diferente sobre los compuestos volátiles y fenólicos.
11. Para obtener aceites de oliva ricos en compuestos fenólicos, como oleocantal y oleaceína, se debe trabajar, principalmente, a temperatura de batido alta (40 °C). Con aceitunas de cultivos de secano se pueden llegar a obtener hasta un 63 % más de estos compuestos que con aceitunas de regadío.
12. Para obtener aceites de oliva ricos en compuestos volátiles, de la ruta LOX, se debe trabajar, principalmente, a temperatura de batido baja (20 °C). A partir de aceitunas de cultivos de regadío se obtiene hasta un 39 % más de estos compuestos que con aceitunas de secano.
13. La variedad de aceituna es el factor que tiene mayor influencia sobre el perfil ácido del aceite de oliva. De cada variedad de aceituna se puede obtener aceite de oliva rico en ciertos tipos de ácidos grasos y ser nutricionalmente saludable. De las variedades analizadas, con aceites de Picual se obtiene la

mayor proporción de MUFA (80,9 %). La mayor proporción de PUFA, 12,9 %, se ha obtenido para un aceite de la variedad Arbequina. La menor proporción de ácidos grasos saturados, 14,7 %, se ha obtenido en un aceite de la variedad Koroneiki.

CONCLUSIONS

The main conclusions reached in this work are the following:

1. Response Surface Methodology has been turned out very effective for the modeling and optimization of the main technological factors involved in the process of elaborating virgin olive oil.
2. Each olive cultivar provides a different virgin olive oil in relation to its composition. The cv. Arbequina provides olive oils rich in volatile compounds (35 mg/kg). In contrast, the cv. Koroneiki is the cultivar with a higher proportion of phenolic compounds (1320 mg/kg) and greater antioxidant capacity (3490 $\mu\text{mol trolox/kg}$), compared to the others cultivars analyzed.
3. The agronomic factors influence the final composition of the virgin olive oil. The samples of irrigated crops are richer in volatile compounds. On the contrary, samples of rain-fed crops are richer in phenolic compounds.
4. The evolution of the maturation of the olives influences the composition of olive oil. Phenolic compounds increase during ripening until to reach a maximum. The optimum maturity index for to reach a maximum concentration of these compounds, for the cv. Picual, is around 3-3.5 (during the “envero”). For the cultivars Arbequina, Arbosana and Koroneiki, of superintensive crops, the optimum maturity index is 2-2.5, approximately.
5. Mathematical models have been obtained that relate the main technological factors with the responses of extraction efficacy, volatile and phenolic compounds, antioxidant capacity, photosynthetic pigments and fatty acid profile.
6. Technological factors will influence the final composition of virgin olive oil.
7. The malaxation temperature is the technological factor with the greatest influence on the composition of olive oil. The malaxation time and the size of the sieve in the milling have less influence on the composition.

8. The use of talc during the malaxation as a technological coadjuvant increases the extraction efficacy at low doses (<1%). At high doses the yield decreases given its ability to retain 26 % of its weight in oil.
9. The composition of the olive oil depends on the cleaning processes (washing in vertical centrifuge, decantation and filtration). These processes are necessary, since they help eliminate the impurities of virgin olive oil. However, during vertical centrifugation, there is a reduction in the content of volatile compounds of 9 % and phenolic compounds of 22.9 %. During decantation, there is a decrease in phenolic compounds of 33.5 %. On the contrary, filtration has no great influence on the responses studied.
10. The technological and agronomic factors must be optimized to produce a balanced virgin olive oil. It is a difficult task since technological and agronomic factors influence differently on the volatile and phenolic compounds.
11. To obtain olive oils rich in phenolic compounds and bioactive compounds, such as oleocanthal and oleacein, must be worked, mainly, at high malaxation temperature (40 °C). With olives from rainfed crops, olive oils can be obtained with up to 63 % more of these compounds than olives from irrigated.
12. To obtain olive oils rich in volatile compounds of the LOX pathway must be worked, mainly, at low malaxation temperature (20 °C). Up to 39 % more of these compounds are obtained from olives from irrigated than rainfed crops.
13. The olive cultivar is the factor that has the greatest influence on the acidic profile of olive oil. From each olive cultivar can be obtained olive oil rich in certain types of fatty acids and be nutritionally healthy. Of the cultivars analyzed, the highest proportion of MUFA was obtained from the cv. Picual (80.9%). The highest proportion of PUFA was 12.9%, for an oil of the cv. Arbequina. The lowest proportion of SFA was 14.7% and was obtained in an oil of the cv. Koroneiki.

6. BIBLIOGRAFÍA



- Abenoza, M., Raso, J., Oria, R., Sánchez-Gimeno, A. C. (2019). Modulating the bitterness of Empeltre olive oil by partitioning polyphenols between oil and water phases: Effect on quality and shelf life. *Food Science and Technology International*, 25(1), 47-55.
- Aguilera, M. P., Beltrán, G., Sánchez, S., Uceda, M., Jiménez, A. (2010). Kneading olive paste from unripe 'Picual' fruits: I. Effect on oil process yield. *Journal of Food Engineering*, 97(4), 533-538.
- Alba, J., Martínez, F., Moyano, M. J., Hidalgo, F. (2009). Tecnología de elaboración de aceite de oliva virgen. En J. Vilar Hernández, *Algunas contribuciones sobre Olivicultura y Elaiotecnia desde la perspectiva de la experiencia*, (1ª Ed.) Úbeda (Jaén): Ed. Gea Westfalia Separator. Andalucía, S.L.
- Alcalá, S., Ocaña, M. T., Cárdenas, J. R., Miquel, M. Á, Vilar, J., Espínola, F., Moya, M. (2017). Alkyl esters content and other quality parameters in oil mill: A response surface methodology study. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(1), 1600026.
- Alcalá-Reyes, S. (2016). Elaboración de aceites de oliva vírgenes a partir de aceitunas de distintas variedades y tipos de cultivo. Aplicación industrial. Tesis doctoral, Universidad de Jaén. Jaén, España.
- Alowaiesh, B., Singh, Z., Fang, Z., Kailis, S. G. (2018). Harvest time impacts the fatty acid compositions, phenolic compounds and sensory attributes of Frantoio and Manzanilla olive oil. *Scientia Horticulturae*, 234, 74-80.
- Altieri, G., Genovese, F., Tauriello, A., Di Renzo, G. C. (2015). Innovative plant for the separation of high quality virgin olive oil (VOO) at industrial scale. *Journal of Food Engineering*, 166, 325-334.
- Angelis, A., Antoniadis, L., Stathopoulos, P., Halabalaki, M., Skaltsounis, L. A. (2018). Oleocanthalic and Oleaceinic acids: New compounds from extra virgin olive oil (EVOO). *Phytochemistry Letters*, 26, 190-194.
- 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(9), 639-660.
- Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R. (2000). Virgin olive oil odour notes: Their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chemistry*, 68(3), 283-287.
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., Montedoro, G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: Occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 17-31.
- Aparicio, R., Harwood, J. (2003). *Manual del aceite de oliva*. (1ª Ed.) Madrid: Ed. Mundi-Prensa.

- Aroca-Santos, R., Lastra-Mejías, M., Cancilla, J. C., Torrecilla, J. S. (2018). Intelligent modelling to monitor the evolution of quality of extra virgin olive oil in simulated distribution conditions. *Biosystems Engineering*, 172, 49-56.
- Baccouri, O., Guerfel, M., Baccouri, B., Cerretani, L., Bendini, A., Lercker, G., Zarrouk, M., Daoud Ben Miled, D. (2008). Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry*, 109(4), 743-754.
- Ballus, C. A., Meinhart, A. D., de Souza Campos, F. A., da Silva, Luiz Fernando de Oliveira, de Oliveira, A. F., Godoy, H. T. (2014). A quantitative study on the phenolic compound, tocopherol and fatty acid contents of monovarietal virgin olive oils produced in the southeast region of Brazil. *Food Research International*, 62, 74-83.
- Barranco, D., Fernández, R., Rallo, L. (2017). *El Cultivo del Olivo*. (7ª Ed.) Madrid (España): Mundi-Prensa.
- Beauchamp, G. K., Keast, R. S. J., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., Lee, C., Smith, A. B., Breslin, P. A. S. (2005). Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*, 437(7055), 45-46.
- Bejaoui, M. A., Beltrán, G., Aguilera, M. P., Jiménez, A. (2016). Continuous conditioning of olive paste by high power ultrasounds: Response surface methodology to predict temperature and its effect on oil yield and virgin olive oil characteristics. *LWT - Food Science and Technology*, 69, 175-184.
- Beltrán, G., Aguilera, M. P., Río, C. D., Sánchez, S., Martínez, L. (2005). Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chemistry*, 89(2), 207-215.
- Beltrán, J., Martínez, D.M., Aguilera, D., Gámez, J., Gómez, J. (2016). Novel technologies for monitoring the in-line quality of virgin olive oil during manufacturing and storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(14), 4644-4662.
- Ben Brahim, S., Marrakchi, F., Gargouri, B., Bouaziz, M. (2015). Optimization of malaxing conditions using CaCO₃ as a coadjuvant: A method to increase yield and quality of extra virgin olive oil cv. Chemlali. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 243-252.
- Bengana, M., Bakhouch, A., Lozano-Sánchez, J., Amir, Y., Youyou, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Influence of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of Chemlal extra-virgin olive oil. *Food Research International*, 54(2), 1868-1875.
- Benito, M., Lasa, J. M., Gracia, P., Oria, R., Abenoza, M., Varona, L., Sánchez-Gimeno, A. C. (2013). Olive oil quality and ripening in super-high-density Arbequina orchard. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(9), 2207-2220.

- Berenguer, M. J., Vossen, P. M., Grattan, S. R., Connell, J. H., Polito, V. S. (2006). Tree irrigation levels for optimum chemical and sensory properties of olive oil. *American Society for Horticultural Science*, 41(2), 427-432.
- Besnard, G., Terral, J., Cornille, A. (2018). On the origins and domestication of the olive: a review and perspectives. *Annals of Botany*, 121(3), 385-403.
- Bezerra, M. A., Ferreira, S. L. C., Novaes, C. G., dos Santos, A. M. P., Valasques, G. S., da Mata Cerqueira, Uillian Mozart Ferreira, dos Santos Alves, J. P. (2019). Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. *Talanta*, 194, 941-959.
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965-977.
- Bianco, A., Coccioli, F., Guiso, M., Marra, C. (2002). The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy-isochromans. *Food Chemistry*, 77(4), 405-411.
- Bonvino, N. P., Liang, J., McCord, E. D., Zafiris, E., Benetti, N., Ray, N. B., Hung, A., Boskou, D., Karagiannis, T. C. (2018). OliveNetData: a comprehensive library of compounds from *Olea europaea*. *Database : the journal of biological databases and curation*, 2018, bay016.
- Borges, T. H., López, L. C., Pereira, J. A., Cabrera-Vique, C., Seiquer, I. (2017). Comparative analysis of minor bioactive constituents (CoQ10, tocopherols and phenolic compounds) in Arbequina extra virgin olive oils from Brazil and Spain. *Journal of Food Composition and Analysis*, 63, 47-54.
- Borges, T. H., Pereira, J. A., Cabrera-Vique, C., Lara, L., Oliveira, A. F., Seiquer, I. (2017). Characterization of Arbequina virgin olive oils produced in different regions of Brazil and Spain: Physicochemical properties, oxidative stability and fatty acid profile. *Food Chemistry*, 215, 454-462.
- Boskou, D. (2006). 2 - Characteristics of the Olive Tree and Olive Fruit. En D. Boskou, *Olive Oil (2ª Ed.)* (pp. 13-19). Champaign, Illinois: AOCS Press.
- Bottino, A., Capannelli, G., Mattei, A., Rovellini, P., Zunin, P. (2008). Effect of membrane filtration on the flavor of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110(12), 1109-1115.
- Box, G., Hunter, J., Hunter, W. (2008). *Estadística para investigadores: diseño, innovación y descubrimiento*. (2ª Ed.) Barcelona, España: Reverté.
- Box, G., Behnken, D. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2(4), 455-475.

- Bubola, K. B., Koprivnjak, O. (2015). Chapter 31 - Influence of filtration on composition of olive oils. En V. Preedy, *Processing and impact on active components in food* (1ª Ed.) (pp. 259-265). San Diego, EEUU: Academic Press.
- Bubola, K. B., Koprivnjak, O., Sladonja, B. (2012). Influence of filtration on volatile compounds and sensory profile of virgin olive oils. *Food Chemistry*, 132(1), 98-103.
- Bubola, K. B., Lukic, M., Mofardin, I., Butumovic, A., Koprivnjak, O. (2017). Filtered vs. naturally sedimented and decanted virgin olive oil during storage: Effect on quality and composition. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 370-377.
- Caponio, F., Squeo, G., Difonzo, G., Pasqualone, A., Summo, C., Paradiso, V. M. (2016). Has the use of talc an effect on yield and extra virgin olive oil quality? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 3292-3299.
- Caponio, F., Squeo, G., Monteleone, J. I., Paradiso, V. M., Pasqualone, A., Summo, C. (2015). First and second centrifugation of olive paste: Influence of talc addition on yield, chemical composition and volatile compounds of the oils. *LWT - Food Science and Technology*, 64(1), 439-445.
- Cárdenas, J. R., Vilar, J., Marcos, J., Talavera, J., Velasco, M., Puentes, R. (2013). *El manual del maestro de almazara*. (1ª Ed.) Úbeda (Jaén): GEA Westfalia S.A.
- Cárdenas-García, J. R. (2018). *El fin del sector oleícola (tal y como lo conocemos)*. (1ª Ed.) Úbeda (Jaén): GEA Westfalia S.A..
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Del Carlo, M., Gallina-Toschi, T., Lercker, G., Compagnone, D., Fernández-Gutiérrez, A. (2005). Evaluation of the antioxidant capacity of individual phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 8918-8925.
- Cayuela, J. A., Gómez-Coca, R. B., Moreda, W., Pérez-Camino, M. C. (2015). Sensory defects of virgin olive oil from a microbiological perspective. *Trends in Food Science & Technology*, 43(2), 227-235.
- Cayuela-Sánchez, J. A., Caballero-Guerrero, B. (2019). Fresh extra virgin olive oil, with or without veil. *Trends in Food Science & Technology*, 83, 78-85.
- CEE (2016). Reglamento UE N° 2095/2016 que modifica el Reglamento (CEE) n.º 2568/91, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. L326, 1-6.
- CEE (2013a). Reglamento UE N° 497/2013 que modifica y corrige el Reglamento (UE) n°231/2012, por el que se establecen especificaciones para los aditivos alimentarios que figuran en los anexos II y III del Reglamento (CE) n°1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo.

- CEE (2013b). Reglamento UE N° 1308/2013 por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios y por el que se derogan los Reglamentos (CEE) n° 922/72, (CEE) n° 234/79, (CE) n° 1037/2001 y (CE) n° 1234/2007. *L347*, 671-854.
- CEE (2013c). Reglamento UE N° 1348/2013 que modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. *L338*, 31-67.
- CEE (2012). Reglamento UE N° 432/2012 por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. *L136*, 1-40.
- CEE (2011). Reglamento UE N° 61/2011 por el que se modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. *L23*, 1-14.
- CEE (2008). Reglamento UE N° 1333/2008 sobre aditivos alimentarios. *L354*, 16-33.
- CEE (1991). Reglamento UE N° 2568/1991 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. *L248*, 1-83.
- Cerretani, L., Motilva, M., Romero, M., Bendini, A., Lercker, G. (2008). Pigment profile and chromatic parameters of monovarietal virgin olive oils from different Italian cultivars. *European Food Research and Technology*, *226*(6), 1251-1258.
- Cert, A., Alba, J., León-Camacho, M., Moreda, W., Pérez-Camino, M. C. (1996). Effects of talc addition and operating mode on the quality and oxidative stability of virgin olive oils obtained by centrifugation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *44*(12), 3930-3934.
- Cherfaoui, M., Cecchi, T., Keciri, S., Boudriche, L. (2018). Volatile compounds of Algerian extra-virgin olive oils: Effects of cultivar and ripening stage. *International Journal of Food Properties*, *21*(1), 36-49.
- Cevik, S., Aydin, S., Sermet, O. S., Ozkan, G., Karacabey, E. (2017). Optimization of olive oil extraction process by Response Surface Methodology. *Akademik Gida*, *15*, 337-343.
- Cicerale, S., Conlan, X. A., Barnett, N. W., Keast, R. S. J. (2013). Storage of extra virgin olive oil and its effect on the biological activity and concentration of oleocanthal. *Food Research International*, *50*(2), 597-602.

- Cicerale, S., Lucas, L., Keast, R. (2012). Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 129-135.
- Civantos López-Villalta, L., Contreras Carazo, R. J., Grana Gil, R. M. (2008). *Obtención del aceite de oliva virgen*. (3ª Ed.) Madrid, España: Editorial Agrícola Española.
- Clodoveo, M. L., Hbaieb, R. H., Kotti, F., Mugnozza, G. S., Gargouri, M. (2014). Mechanical strategies to increase nutritional and sensory quality of virgin olive oil by modulating the endogenous enzyme activities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 135-154.
- Clodoveo, M. L. (2012). Malaxation: Influence on virgin olive oil quality. Past, present and future - An overview. *Trends in Food Science and Technology*, 25(1), 13-23.
- COI (2018). Best practice guidelines for the storage of olive oils and olive-pomace oils for human consumption. Recuperado de: <www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/14055-guidelines-for-the-storage-english>.
- COI (2017). Determination of biophenols in olive oils by HPLC. COI/T.20/Doc No 29/Rev 1.
- COI (2016). Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y a los aceites de orujo.
- COI (2015). Estudio internacional sobre los costes de producción del aceite de oliva.
- COI (2007). Análisis sensorial del aceite de oliva. Vocabulario general básico. COI/T.20/Doc. nº 4/Rev. 1.
- COI (2005). Valoración organoléptica del aceite de oliva virgen extra (COI/T.20/Doc. nº 15/rev. 2).
- Conde, C., Delrot, S., Gerós, H. (2008). Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *Journal of Plant Physiology*, 165(15), 1545-1562.
- Conte, L., Bendini, A., Valli, E., Lucci, P., Moret, S., Maquet, A., Lacoste, F., Brereton, P., García-González, D. L., Moreda, W., Gallina Toschi, T. (2019). Olive oil quality and authenticity: A review of current EU legislation, standards, relevant methods of analyses, their drawbacks and recommendations for the future. *Trends in Food Science & Technology*, (In press).
- Contreras, M. d. M., Arroyo-Manzanares, N., Arce, C., Arce, L. (2019). HS-GC-IMS and chemometric data treatment for food authenticity assessment: Olive oil

- mapping and classification through two different devices as an example. *Food Control*, 98, 82-93.
- Covas, de La Torre, R., Fitó, M. (2015). Virgin olive oil: A key food for cardiovascular risk protection. *British Journal of Nutrition*, 113(S2), S19-S28.
- Covas, Fitó, M., de la Torre, R. (2015). 2 - Minor bioactive olive oil components and health: Key data for their role in providing health benefits in humans. En D. Boskou, *Olive and olive oil bioactive constituents*. (1ª Ed.) Urbana, Illinois: AOCS Press.
- Criado, M. N., Motilva, M. J., Goñi, M., Romero, M. P. (2007). Comparative study of the effect of the maturation process of the olive fruit on the chlorophyll and carotenoid fractions of drupes and virgin oils from Arbequina and Farga cultivars. *Food Chemistry*, 100(2), 748-755.
- Criado, M., Romero, M., Casanovas, M., Motilva, M. (2008). Pigment profile and colour of monovarietal virgin olive oils from Arbequina cultivar obtained during two consecutive crop seasons. *Food Chemistry*, 110(4), 873-880.
- Criado, M. N., Romero, M. P., Motilva, M. J. (2007). Effect of the technological and agronomical factors on pigment transfer during olive oil extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(14), 5681-5688.
- Dag, A., Kerem, Z., Yogev, N., Zipori, I., Lavee, S., Ben-David, E. (2011). Influence of time of harvest and maturity index on olive oil yield and quality. *Scientia Horticulturae*, 127(3), 358-366.
- Damak, N., Bouaziz, M., Ayadi, M., Sayadi, S., Damak, M. (2008). Effect of the maturation process on the phenolic fractions, fatty acids, and antioxidant activity of the Chetoui olive fruit cultivar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(5), 1560-1566.
- De la Torre-Robles, A., Monteagudo, C., Mariscal-Arcas, M., Lorenzo-Tovar, M. L., Olea-Serrano, F., Rivas, A. (2019). Effect of light exposure on the quality and phenol content of commercial extra virgin olive oil during 12-month storage. *JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96(4), 381-389.
- De Torres, A., Espínola, F., Moya, M., Alcalá, S., Vidal, A. M., Castro, E. (2018). Assessment of phenolic compounds in virgin olive oil by response surface methodology with particular focus on flavonoids and lignans. *LWT- Food Science and Technology*, 90, 22-30.
- De Torres, A., Espínola, F., Moya, M., Castro, E. (2016). Composition of secoiridoid derivatives from Picual virgin olive oil using response surface methodology with regard to malaxation conditions, fruit ripening, and irrigation management. *European Food Research and Technology*, 242(10), 1709-1718.

- De Torres-Sánchez, A. (2013). *Influencia de los factores tecnológicos en la calidad y en el contenido en antioxidantes del aceite de oliva virgen*. Tesis doctoral, Universidad de Jaén. Jaén, España.
- Deiana, M., Serra, G., Corona, G. (2018). Modulation of intestinal epithelium homeostasis by extra virgin olive oil phenolic compounds. *Food & Function*, 9(8), 4085-4099.
- Di Giovacchino, L., Solinas, M., Miccoli, M. (1994). Effect of extraction systems on the quality of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 71(11), 1189-1194.
- Di Serio, M. G., Giansante, L., Di Loreto, G., Di Giacinto, L. (2018). Shelf life of extra-virgin olive oils: First efforts toward a prediction model. *Journal of Food Processing and Preservation*, 42(7), e13663.
- Droneolive (2018). Droneolive. Uso de técnicas de teledetección para controlar el estado del olivar y la calidad de producción. Recuperado de: <<http://www.inoleo.es/index.php/es/proyectos/cooperacion/231-dronolive-uso-de-tecnicas-de-teledeteccion-para-controlar-el-estado-del-olivar-y-calidad-de-produccion.html>>.
- El País (2019). El aceite de oliva recurre al 'blockchain' para asegurar su trazabilidad. Recuperado de: <https://cincodias.elpais.com/cincodias/2019/02/14/fortunas/1550171615_110385.html>.
- Espadas-Aldana, G., Vialle, C., Belaud, J., Vaca-García, C., Sablayrolles, C. (2019). Analysis and trends for life cycle assessment of olive oil production. *Sustainable Production and Consumption*, 19, 216-230.
- Espínola, F., Moya, M., de Torres, A., Castro, E. (2015). Comparative study of coadjuvants for extraction of olive oil. *European Food Research and Technology*, 241(6), 759-768.
- Espínola-Lozano, F. (2015). *Compuestos volátiles del aceite de oliva virgen y su relación con el análisis sensorial*. (1ª Ed.) Madrid (España): AMV Ediciones (pp. 158).
- Espínola, F., Moya, M., Fernández, D. G., Castro, E. (2011). Modelling of virgin olive oil extraction using response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(12), 2576-2583.
- Espínola, F., Moya, M., Fernández, D. G., Castro, E. (2009). Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjuvant extractant. *Journal of Food Engineering*, 92(1), 112-118.
- Esti, M., Contini, M., Moneta, E., Sinesio, F. (2009). Phenolics compounds and temporal perception of bitterness and pungency in extra-virgin olive oils: Changes occurring throughout storage. *Food Chemistry*, 113(4), 1095-1100.

- Fernández-Valdivia, D. G. (2009). *Modelado y optimización de las principales etapas del proceso de elaboración de aceite de oliva virgen: investigación de nuevos coadyuvantes tecnológicos*. Tesis doctoral, Universidad de Jaén. Jaén, España.
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-186.
- Ferreira, S. L. C., Lemos, V. A., de Carvalho, V. S., da Silva, E. G. P., Queiroz, A. F. S., Felix, C. S. A., da Silva, D. L. F., Dourado, G. B., Oliveira, R. V. (2018). Multivariate optimization techniques in analytical chemistry - an overview. *Microchemical Journal*, 140, 176-182.
- Franco, M. N., Galeano-Díaz, T., López, Ó, Fernández-Bolaños, J. G., Sánchez, J., De Miguel, C., Gil, M. V., Martín-Vertedor, D. (2014). Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. *Food Chemistry*, 163 (Supplement C), 289-298.
- Franco, M. N., Galeano-Díaz, T., Sánchez, J., De Miguel, C., Martín-Vertedor, D. (2014). Antioxidant capacity of the phenolic fraction and its effect on the oxidative stability of olive oil varieties grown in the southwest of Spain. *Grasas y Aceites*, 65(1).
- Frankel, E., Bakhouch, A., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Literature review on production process to obtain extra virgin olive oil enriched in bioactive compounds. Potential use of byproducts as alternative sources of polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(22), 5179-5188.
- Fratoddi, I., Rapa, M., Testa, G., Venditti, I., Scaramuzza, F. A., Vinci, G. (2018). Response surface methodology for the optimization of phenolic compounds extraction from extra virgin olive oil with functionalized gold nanoparticles. *Microchemical Journal*, 138, 430-437.
- Fregapane, G., Lavelli, V., León, S., Kapuralin, J., Salvador, M. D. (2006). Effect of filtration on virgin olive oil stability during storage. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(2), 134-142.
- Fregapane, G., Gómez-Rico, A., Salvador, M. D. (2010). Chapter 6 - Influence of irrigation management and ripening on virgin olive oil quality and composition. En V. R. Preedy & R. R. Watson, *Olives and olive oil in health and disease prevention* (1ª Ed.). San Diego, EEUU: Academic Press.
- Fuentes, E., Paucar, F., Tapia, F., Ortiz, J., Jimenez, P., Romero, N. (2018). Effect of the composition of extra virgin olive oils on the differentiation and antioxidant capacities of twelve monovarietals. *Food Chemistry*, 243, 285-294.

- Fuentes de Mendoza, M., De Miguel Gordillo, C., Marín Expósito, J., Sánchez Casas, J., Martínez Cano, M., Martín Vertedor, D., Franco Baltasar, M. N. (2013). Chemical composition of virgin olive oils according to the ripening in olives. *Food Chemistry*, 141(3), 2575-2581.
- Gallardo-Guerrero, L., Roca, M., Mínguez-Mosquera, M. I. (2002). Distribution of chlorophylls and carotenoids in ripening olives and between oil and alperujo when processed using a two-phase extraction system. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 79(1), 105-109.
- Gallardo-Guerrero, L., Gandul-Rojas, B., Roca, M., Mínguez-Mosquera, M. I. (2005). Effect of storage on the original pigment profile of spanish virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 82(1), 33
- García, J., Morales-Sillero, A., Pérez-Rubio, A. G., Díaz-Espejo, A., Montero, A., Fernández, J. E. (2017). Virgin olive oil quality of hedgerow 'Arbequina' olive trees under deficit irrigation: Oil quality from deficit irrigated olive hedgerow. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 1018-1026.
- García-Gavilán, J. F., Bulló, M., Canudas, S., Martínez-González, M. A., Estruch, R., Giardina, S., Fitó, M., Corella, D., Ros, E., Salas-Salvadó, J. (2018). Extra virgin olive oil consumption reduces the risk of osteoporotic fractures in the PREDIMED trial. *Clinical Nutrition*, 37(1), 329-335.
- García-Vico, L., Belaj, A., León, L., de la Rosa, R., Sanz, C., Pérez, A. G. (2018). A survey of ethanol content in virgin olive oil. *Food Control*, 91, 248-253.
- Garrido, F. J., Gandul, R. B., Gallardo, G. L., Mínguez, M. M. (1990). Chlorophyll and carotenoid pigments which contribute to the color of the virgin olive oil; Pigmentos clorofilicos y carotenoides responsables del color en el aceite de oliva virgen. *Grasas y Aceites*, 41, 404-409.
- Genovese, A., Yang, N., Linforth, R., Sacchi, R., Fisk, I. (2018). The role of phenolic compounds on olive oil aroma release. *Food Research International*, 112, 319-327.
- Gila, A., Beltrán, G., Bejaoui, M. A., Aguilera, M. P., Jiménez, A. (2017). How clarification systems can affect virgin olive oil composition and quality at industrial scale. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(10), 1600479.
- Giuliani, A., Cerretani, L., Cichelli, A. (2011). Chlorophylls in olive and in olive oil: chemistry and occurrences. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(7), 678-690.
- Gómez-Rico, A., Fregapane, G., Salvador, M. D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, 41(4), 433-440.

- Gómez-Rico, A., Inarejos-García, A. M., Salvador, M. D., Fregapane, G. (2009). Effect of malaxation conditions on phenol and volatile profiles in olive paste and the corresponding virgin olive oils (*Olea europaea* L. Cv. cornicabra). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3587-3595.
- Gómez-Rico, A., Salvador, M. D., La Greca, M., Fregapane, G. (2006). Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(19), 7130-7136.
- Green, P. S. (2002). A Revision of *Olea* L. (*Oleaceae*). *Kew Bulletin*, 57(1), 91-140.
- Gucci, R., Caruso, G., Gennai, C., Esposto, S., Urbani, S., Servili, M. (2019). Fruit growth, yield and oil quality changes induced by deficit irrigation at different stages of olive fruit development. *Agricultural Water Management*, 212, 88-98.
- Guerrini, L., Pantani, O. L., Parenti, A. (2017). The impact of vertical centrifugation on olive oil quality. *Journal of Food Process Engineering*, 40(3), e12489.
- Gutiérrez, F., Jiménez, B., Ruíz, A., Albi, M. A. (1999). Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties Picual and Hojiblanca and on the different components involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(1), 121-127.
- Hachicha Hbaieb, R., Kotti, F., Gargouri, M., Msallem, M., Vichi, S. (2016). Ripening and storage conditions of Chétoui and Arbequina olives: Part I. Effect on olive oils volatiles profile. *Food Chemistry*, 203, 548-558.
- Hachicha Hbaieb, R., Kotti, F., Valli, E., Bendini, A., Toschi, T. G., Gargouri, M. (2017). Effect of Tunisian olive ripeness on endogenous enzymes and virgin olive oil phenolic composition. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 43-50.
- Hibbert, D. B. (2012). Experimental design in chromatography: A tutorial review. *Journal of Chromatography B*, 910, 2-13.
- Hohmann, C. D., Cramer, H., Michalsen, A., Kessler, C., Steckhan, N., Choi, K., Dobos, G. (2015). Effects of high phenolic olive oil on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine*, 22(6), 631-640.
- Inarejos-García, A. M., Gómez-Rico, A., Salvador, M. D., Fregapane, G. (2009). Influence of malaxation conditions on virgin olive oil yield, overall quality and composition. *European Food Research and Technology*, 228(4), 671-677.
- Inglese, P., Famiani, F., Galvano, F., Servili, M., Esposto, S., Urbani, S. (2010). Factors affecting extra-virgin olive oil composition. *Horticultural Reviews*, 38, 83-147.
- Jialal, I., Devaraj, S., Huet, B., Traber, M. (1999). Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. *The Lancet*, 354(9177), 447-455.

- Jiménez Herrera, B., Carpio Dueñas, A. (2002). *La cata de aceites: Aceite de oliva virgen. Características organolépticas y análisis sensorial*. (1ª Ed.) Sevilla, España.: Junta de Andalucía.
- Kalogianni, E. P., Georgiou, D., Exarhopoulos, S. (2019). Olive oil droplet coalescence during malaxation. *Journal of Food Engineering*, 240, 99-104.
- Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood Jr, D. R., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, 100(1), 273-286.
- Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood Jr., D. R., Bishop, A. G., Prenzler, P. D. (2005). Discrimination of olive oils and fruits into cultivars and maturity stages based on phenolic and volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20), 8054-8062.
- Lazzerini, C., Cifelli, M., Domenici, V. (2017). Pigments in extra virgin olive oils produced in different mediterranean countries in 2014: Near UV-vis spectroscopy versus HPLC-DAD. *LWT- Food Science and Technology*, 84, 586-594.
- Leaf, A. (2002). Prevention of fatal cardiac arrhythmias by polyunsaturated fatty acids. *Nutr Health*, 16(1), 47-49.
- Lipshitz, N., Gophna, R., Hartman, M., Biger, G. (1991). The beginning of olive (*olea europaea*) cultivation in the old world: A reassessment. *Journal of Archaeological Science*, 18(4), 441-453.
- Lombardo, L., Grasso, F., Lanciano, F., Loria, S., Monetti, E. (2018). Chapter 2 - Broad-spectrum health protection of extra virgin olive oil compounds. *Studies in Natural Products Chemistry*, 57, 41-77.
- López-Biedma, A., Sánchez-Quesada, C., Delgado-Rodríguez, M., Gaforio, J. J. (2016). The biological activities of natural lignans from olives and virgin olive oils: A review. *Journal of Functional Foods*, 26, 36-47.
- Lozano-Sánchez, Bendini, A., Quirantes-Piné, R., Cerretani, L., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Monitoring the bioactive compounds status of extra-virgin olive oil and storage by-products over the shelf life. *Food Control*, 30(2), 606-615.
- Lozano-Sánchez, Cerretani, L., Bendini, A., Gallina-Toschi, T., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2012). New filtration systems for extra-virgin olive oil: Effect on antioxidant compounds, oxidative stability, and physicochemical and sensory properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(14), 3754-3762.
- Lozano-Sánchez, Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Filtration process of extra virgin olive oil: effect on minor

- components, oxidative stability and sensorial and physicochemical characteristics. *Trends in Food Science & Technology*, 21(4), 201-211.
- Lukić, I., Krapac, M., Horvat, I., Godena, S., Kosić, U., Brkić Bubola, K. (2018). Three-factor approach for balancing the concentrations of phenols and volatiles in virgin olive oil from a late-ripening olive cultivar. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 194-202.
- Lukic, I., Žanetic, M., Jukic Špika, M., Lukic, M., Koprivnjak, O., Brkic Bubola, K. (2017). Complex interactive effects of ripening degree, malaxation duration and temperature on Oblica cv. virgin olive oil phenols, volatiles and sensory quality. *Food Chemistry*, 232, 610-620.
- Malheiro, R., Rodrigues, N., Pereira, J. A. (2015). 4 - Olive oil phenolic composition as affected by geographic origin, olive cultivar, and cultivation systems, 93-121. En D. Boskou, Olive and olive oil bioactive constituents, (1^a Ed.). Urbana, Illinois: AOCS Press.
- Martínez, D., Cano, P., Gámez, J., Góme, J. (2018). Non-invasive methodology to estimate polyphenol content in extra virgin olive oil based on stepwise multilinear regression. *Sensors*, 18 (4), 975.
- Martínez, J. M., Muñoz, E., Alba, J., Lanzón, A. (1975). Informe sobre utilización del Analizador de Rendimientos "Abencor". *Grasas y Aceites*, 26, 379-385.
- Massaro, M., Carluccio, M. A., De Caterina, R. (1999). Direct vascular antiatherogenic effects of oleic acid: A clue to the cardioprotective effects of the Mediterranean diet. *Cardiologia*, 44(6), 507-513.
- Mercacei (2018). Olivacoin, la innovadora alternativa 4.0 al Mercado de Futuros del aceite de oliva. Recuperado de: <<https://www.mercacei.com/noticia/48779/actualidad/olivacoin-la-innovadora-alternativa-4.0-al-mercado-de-futuros-del-aceite-de-oliva.html>>.
- Miho, H., Díez, C. M., Mena-Bravo, A., Sánchez de Medina, V., Moral, J., Melliou, E., Magiatis, P., Rallo, L., Barranco, D., Priego-Capote, F. (2018). Cultivar influence on variability in olive oil phenolic profiles determined through an extensive germplasm survey. *Food Chemistry*, 266, 192-199.
- Mínguez-Mosquera, I. M., Rejano-Navarro, L., Gandul-Rojas, B., Sánchez-Gómez, A. H., Garrido-Fernández, J. (1991). Color-pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(5), 332-336.
- Montedoro, G. F., Garafolo, L., Bertuccioli, M. (1986). Factors shaping the quality characteristics of an olive oil. *Industria Alimentari*, 25, 549-555.
- Montgomery, D. C. (2002). *Diseño y análisis de experimentos*. (1^a Ed.) México: Limusa Wiley.

- Morales, M. T., Aparicio-Ruiz, R., Aparicio, R. (2013). Chromatographic methodologies: Compounds for olive oil odor issues. En R. Aparicio & J. Harwood, *Handbook of Olive Oil*, (2ª Ed.). Boston, MA: Springer.
- Morales, M. T., Tsimidou, M. (2003). El papel de los compuestos volátiles y los polifenoles en la calidad sensorial del aceite de oliva. En J. Harwood & R. Aparicio, *Manual del aceite de oliva* (1ª Ed.). Madrid: AMV Ediciones y Mundi-Prensa.
- Morelló, J., Romero, M., Motilva, M. (2004). Effect of the maturation of the olive fruit on the phenolic fraction of drupes and oils from Arbequina, Farga, and Morrut cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 6002-6009.
- Morelló, J., Vuorela, S., Romero, M., Motilva, M., 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.
- Moya, M., Alcalá, S., Ocaña, M. T., Vidal, A., Espínola, F. (2018). Oil mill coadjuvants: Aggregation due to moisture and action on olive-pomace oils. *Journal of Food Engineering*, 236, 51-59.
- Moya, M., Espínola, F., Fernández, D. G., de Torres, A., Marcos, J., Vilar, J., Josue, J., Sánchez, T., Castro, E. (2010). Industrial trials on coadjuvants for olive oil extraction. *Journal of Food Engineering*, 97(1), 57-63.
- Myers, R. H., Montgomery, D. C., Anderson-Cook, C. M. (2016). *Response Surface Methodology: Process and product optimization using designed experiments*. (3ª Ed.) New Jersey, EEUU.: Wiley.
- Nciri, H., Benna-Zayani, M., Stambouli, M., Kbir-Arighuib, N., Trabelsi-Ayadi, M., Rosilio, V., Grossiord, J. (2009). Influence of clay addition on the properties of olive oil in water emulsions. *Applied Clay Science*, 43(3), 383-391.
- Olivares Vivos (2019). Olivares Vivos es un proyecto de SEO BirdLife para recuperar la biodiversidad en el olivar. Recuperado de: <<https://olivaresvivos.com/>>.
- Olivarum (2018). Agricultura de Precisión en el Olivar con Drones. Recuperado de: <<https://www.fundacioncrj.es/agricultura-de-precision-en-el-olivar-con-drones/>>.
- OMS (2018). Nuevas recomendaciones sobre el consumo de grasas. Recuperado de: <<https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/healthy-diet>>
- Ordukaya, E., Karlik, B. (2017). Quality control of olive oils using machine learning and electronic nose. *Journal of Food Quality*, 7, ID 9272404.

- Ortiz, M. C., Herrero, A., Sanllorente, S., Reguera, C. (2005). Methodology of multicriteria optimization in chemical analysis: Some applications in stripping voltammetry. *Talanta*, 65(1), 246-254.
- Pannelli, G., Servili, M., Servaggini, R., Baldioli, M., Montedoro, G. F. (1994). Effect of agronomic and seasonal factors on olive (*Olea Europaea* L.) production and on the qualitative characteristics of the oil. *Acta Horticulturae*, (356), 239-244.
- Parenti, A., Spugnoli, P., Masella, P., Calamai, L. (2007). Influence of the extraction process on dissolved oxygen in olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(12), 1180-1185.
- Pastor, M., Vega, V., Hidalgo, J. C. (2006). Densidades de plantación en olivar de regadío. El caso de las plantaciones superintensivas de Andalucía. (1ª Ed.) Sevilla, España, Junta de Andalucía.
- Poiana, M., Mincione, A. (2004). Fatty acids evolution and composition of olive oils extracted from different olive cultivars grown in Calabrian area. *Grasas y Aceites*, 55(3), 282-290.
- Prieto, I., Hidalgo, M., Segarra, A. B., Martínez-Rodríguez, A. M., Cobo, A., Ramírez, M., Abriouel, H., Gálvez, A., Martínez-Cañamero, M. (2018). Influence of a diet enriched with virgin olive oil or butter on mouse gut microbiota and its correlation to physiological and biochemical parameters related to metabolic syndrome. *PLOS ONE*, 13(1), e0190368.
- Psomiadou, E., Tsimidou, M. (2001). Pigments in Greek virgin olive oils: occurrence and levels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(7), 640-647.
- Quintero-Flórez, A., Beltrán, G., Sánchez-Ortiz, A. (2017). Changes in virgin olive oil volatiles caused by *in vitro* digestion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(36), 7900-7907.
- R.D. 640 (2015) por el que se aprueba la lista de coadyuvantes tecnológicos autorizados para la elaboración de aceites vegetales comestibles y sus criterios de identidad y pureza, y por el que se modifica el Real Decreto 308/1983, de 25 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles. L347.
- Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J. M. (2005). Variedades de olivo en España. (1ª Ed.) Madrid, España: Grupo Mundi-Prensa.
- Rallo, L., Díez, C. M., Morales-Sillero, A., Miho, H., Priego-Capote, F., Rallo, P. (2018). Quality of olives: A focus on agricultural preharvest factors. *Scientia Horticulturae*, 233, 491-509.
- Ramos-Escudero, F., Morales, M. T., 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.

Ramírez-Tortosa, C., López-Pedrosa, J., Suárez, A., Ros, E., Mataix, J., Gil, A. (1999). Olive oil- and fish oil-enriched diets modify plasma lipids and susceptibility of LDL to oxidative modification in free-living male patients with peripheral vascular disease: the Spanish Nutrition Study. *British Journal of Nutrition*, 82(1), 31-39.

Ramírez-Tortosa, C., Suárez, A., Gómez, M., Mir, A., Ros, E., Mataix, J., Gil, A. (1999). Effect of extra-virgin olive oil and fish-oil supplementation on plasma lipids and susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative alteration in free-living Spanish male patients with peripheral vascular disease. *Clinical Nutrition*, 18(3), 167-174.

Ranalli, A., Gomes, T., Delcuratolo, D., Contento, S., Lucera, L. (2003). Improving virgin olive oil quality by means of innovative extracting biotechnologies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(9), 2597-2602.

Roca, M., Mínguez-Mosquera, M. I. (2003). Involvement of chlorophyllase in chlorophyll metabolism in olive varieties with high and low chlorophyll content. *Physiologia Plantarum*, 117(4), 459-466.

Roca, M., Mínguez-Mosquera, M. (2001). Changes in chloroplast pigments of olive varieties during fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 832-839.

Rodis, P. S., Karathanos, V. T., Mantzavinou, A. (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 596-601.

Rodrigues, N., Casal, S., Peres, A. M., Baptista, P., Bento, A., Martín, H., Asensio-S-Manzanera, M. C., Pereira, J. A. (2018). Effect of olive trees density on the quality and composition of olive oil from cv. Arbequina. *Scientia Horticulturae*, 238, 222-233.

Rodrigues, N., Dias, L. G., Veloso, A. C. A., Pereira, J. A., Peres, A. M. (2016). Monitoring olive oils quality and oxidative resistance during storage using an electronic tongue. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 683-692.

Romero, I., García-González, D. L., Aparicio-Ruiz, R., Morales, M. T. (2015). Validation of SPME-GCMS method for the analysis of virgin olive oil volatiles responsible for sensory defects. *Talanta*, 134, 394-401.

Romero, N., Saavedra, J., Tapia, F., Sepúlveda, B., Aparicio, R. (2015). Influence of agroclimatic parameters on phenolic and volatile compounds of Chilean virgin olive oils and characterization based on geographical origin, cultivar and ripening stage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96(2), 583-592.

- Romero-García, J. M., Sánchez, A., Rendón-Acosta, G., Martínez-Patiño, J. C., Ruiz, E., Magaña, G., Castro, E. (2016). An olive tree pruning biorefinery for co-producing high value-added bioproducts and biofuels: Economic and energy efficiency analysis. *BioEnergy Research*, 9(4), 1070-1086.
- Romero-Segura, C., García-Rodríguez, R., Sánchez-Ortiz, A., Sanz, C., 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.
- Rondanini, D. P., Castro, D. N., Searles, P. S., Rousseaux, M. C. (2014). Contrasting patterns of fatty acid composition and oil accumulation during fruit growth in several olive varieties and locations in a non-Mediterranean region. *European Journal of Agronomy*, 52, 237-246.
- Ruiz-Canela, M., Martínez-González, M. A. (2011). Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. *Maturitas*, 68(3), 245-250.
- Sacchi, R., Paduano, A., Savarese, M., Vitaglione, P., Fogliano, V. (2014). Extra virgin olive oil: From composition to "molecular gastronomy". *Advances in Nutrition and Cancer*, 159, 325-338.
- Sadkaoui, A., Jiménez, A., Pacheco, R., Beltrán, G. (2016). Micronized natural talc with a low particle size and a high carbonate rate is more effective at breaking down oil-in-water emulsion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(4), 545-552.
- Salas, J. J., Williams, M., Harwood, J. L., Sánchez, J. (1999). Lipoxygenase activity in olive (*Olea europaea*) fruit. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(10), 1163-1168.
- Salvador, M. D., Aranda, F., Fregapane, G. (2001). Influence of fruit ripening on 'Cornicabra' virgin olive oil quality A study of four successive crop seasons. *Food Chemistry*, 73(1), 45-53.
- Sanaeifar, A., Jafari, A., Golmakani, M. (2018). Fusion of dielectric spectroscopy and computer vision for quality characterization of olive oil during storage. *Computers and Electronics in Agriculture*, 145, 142-152.
- Sánchez, J., Salas, J. J. (2003). Biogénesis del aroma del aceite de oliva. En R. Aparicio & J. Harwood, *Manual del aceite de oliva*(1ª Ed.). Madrid, España: AMV Ediciones y Mundi-Prensa.
- Sánchez, J., Harwood, J. L. (2002). Biosynthesis of triacylglycerols and volatiles in olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9), 564-573.
- Sánchez-Ortiz, A., Bejaoui, M. A., Quintero-Flores, A., Jiménez, A., Beltrán, G. (2018). "Biosynthesis of volatile compounds by hydroperoxide lyase enzymatic activity during virgin olive oil extraction process". *Food Research International*, 111, 220-228.

- Sánchez-Ortiz, A., Pérez, A. G., Sanz, C. (2013). Synthesis of aroma compounds of virgin olive oil: Significance of the cleavage of polyunsaturated fatty acid hydroperoxides during the oil extraction process. *Food Research International*, 54(2), 1972-1978.
- Sánchez-Quesada, C., López-Biedma, A., Gaforio, J. J. (2015a). Maslinic acid enhances signals for the recruitment of macrophages and their differentiation to M1 state. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, ID 654721.
- Sánchez-Quesada, C., López-Biedma, A., Gaforio, J. J. (2015b). Oleoic acid, a compound present in grapes and olives, protects against genotoxicity in human mammary epithelial cells. *Molecules*, 20(8), 13670-13688.
- Sánchez-Quesada, C., López-Biedma, A., Warleta, F., Campos, M., Beltrán, G., Gaforio, J. J. (2013). Bioactive properties of the main triterpenes found in olives, virgin olive oil, and leaves of olea europaea. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(50), 12173-12182.
- Sanmartin, C., Venturi, F., Sgherri, C., Nari, A., Macaluso, M., Flamini, G., Quartacci, M. F., Taglieri, I., Andrich, G., Zinnai, A. (2018). The effects of packaging and storage temperature on the shelf-life of extra virgin olive oil. *Heliyon*, 4(11), e00888.
- SAO (2015). Sociedad Andaluza del Oleocantal. Recuperado de: <<http://www.oleocantal.es/>>.
- Scotece, M., Conde, J., Abella, V., Lopez, V., Pino, J., Lago, F., Smith, A. B., Gómez-Reino, J. J., Gualillo, O. (2015). New drugs from ancient natural foods. Oleocantal, the natural occurring spicy compound of olive oil: A brief history. *Drug discovery today*, 20(4), 406-410.
- Seguí Díaz, M. (2014). Prevención de la diabetes tipo 2 mediante la dieta mediterránea y grasas vegetales: el estudio PREDIMED (PREvención con DIeta MEDiterránea). *SEMERGEN - Medicina de Familia*, 40(5), 278-279.
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G., Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054(1-2), 113-127.
- Squeo, G., Tamborrino, A., Pasqualone, A., Leone, A., Paradiso, V. M., Summo, C., Caponio, F. (2017). Assessment of the influence of the decanter set-up during continuous processing of olives at different pigmentation index. *Food and Bioprocess Technology*, 10(3), 592-602.
- Squeo, G., Silletti, R., Summo, C., Paradiso, V. M., Pasqualone, A., Caponio, F. (2016). Influence of calcium carbonate on extraction yield and quality of extra virgin

- oil from olive (*Olea europaea* L. cv. Coratina). *Food Chemistry*, 209(Supplement C), 65-71.
- Tamborrino, A., Squeo, G., Leone, A., Paradiso, V. M., Romaniello, R., Summo, C., Pasqualone, A., Catalano, P., Bianchi, B., Caponio, F. (2017). Industrial trials on coadjuvants in olive oil extraction process: Effect on rheological properties, energy consumption, oil yield and olive oil characteristics. *Journal of Food Engineering*, 205, 34-46.
- Tarley, C. R. T., Silveira, G., dos Santos, W. N. L., Matos, G. D., da Silva, E. G. P., Bezerra, M. A., Miró, M., Ferreira, S. L. C. (2009). Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. *Microchemical Journal*, 92(1), 58-67.
- Uceda, M., Frías, L. (1975). Harvest dates: evolution of the fruit oil content, oil composition and oil quality. En: *Proceeding of the 2nd International Meeting of Olive Oil*, 125-130.
- Urpi-Sarda, M., Casas, R., Chiva-Blanch, G., Romero-Mamani, E. S., Valderas-Martínez, P., Arranz, S., Andres-Lacueva, C., Llorach, R., Medina-Remón, A., Lamuela-Raventos, R. M., Estruch, R. (2012). Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis. *Pharmacological Research*, 65(6), 577-583.
- Vázquez, A., Janer, C., Janer, M. L. (1973). Determinación de polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas y aceites*, 24, 350-357.
- Vergara-Domínguez, H., Ríos, J. J., Gandul-Rojas, B., Roca, M. (2016). Chlorophyll catabolism in olive fruits (var. Arbequina and Hojiblanca) during maturation. *Food Chemistry*, 212, 604-611.
- Vidal, A. M., Alcalá, S., de Torres, A., Moya, M., Espínola, F. (2019a). Centrifugation, storage, and filtration of olive oil in an oil mill: effect on the quality and content of minority compounds. *Journal of Food Quality*, 2019, 7381761, 1-7.
- Vidal, A. M., Alcalá, S., de Torres, A., Moya, M., Espínola, F. (2019b). Characterization of Olive Oils from Superintensive Crops with Different Ripening Degree, Irrigation Management, and Cultivar: (Arbequina, Koroneiki, and Arbosana). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 121(4), 1800360.
- Vidal, A. M., Alcalá, S., Ocaña, M. T., De Torres, A., Espínola, F., Moya, M. (2018). Modeling of volatile and phenolic compounds and optimization of the process conditions for obtaining balanced extra virgin olive oils. *Grasas y Aceites*, 69(2).
- Vidal, A. M., Alcalá, S., de Torres, A., Moya, M., Espínola, F. (2018a). Industrial production of a balanced virgin olive oil. *LWT - Food Science and Technology*, 97, 588-596.

- Vidal, A. M., Alcalá, S., de Torres, A., Moya, M., Espínola, F. (2018b). Use of talc in oil mills: Influence on the quality and content of minor compounds in olive oils. *LWT - Food Science and Technology*, 98, 31-38.
- Vilar, J., Pereira, J. (2018). La olivicultura internacional. Difusión histórica, análisis estratégico y visión descriptiva. (1ª Ed.) Jaén, España: *Fundación Caja Rural de Jaén*.
- Visioli, F., Franco, M., Toledo, E., Luchsinger, J., Willett, W. C., Hu, F. B., Martínez-González, M. A. (2018). Olive oil and prevention of chronic diseases: Summary of an International conference. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 28(7), 649-656.
- Wani, T. A., Masoodi, F. A., Gani, A., Baba, W. N., Rahmanian, N., Akhter, R., Wani, I. A., Ahmad, M. (2018). Olive oil and its principal bioactive compound: Hydroxytyrosol – A review of the recent literature. *Trends in Food Science & Technology*, 77, 77-90.
- Williams, M., Salas, J. J., Sánchez, J., Harwood, J. L. (2000). Lipoxygenase pathway in olive callus cultures (*Olea europaea*). *Phytochemistry*, 53(1), 13-19.
- Yang, D., Kong, D., Zhang, H. (2007). Multiple pharmacological effects of olive oil phenols. *Food Chemistry*, 104(3), 1269-1271.
- Yousfi, K., Cert, R. M., García, J. M. (2006). Changes in quality and phenolic compounds of virgin olive oils during objectively described fruit maturation. *European Food Research and Technology*, 223(1), 117-124.
- Youssef, N. B., Zarrouk, W., Carrasco-Pancorbo, A., Ouni, Y., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Daoud, D., Zarrouk, M. (2010). Effect of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of chétoui virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(2), 199-204.
- Zanoni, B. (2014). The role of oxygen and water in the extra virgin olive oil process. En Claudio Peri, *The Extra Virgin Olive Oil Handbook* (1ª Ed.). Nueva Jersey, United States: Wiley-Blackwell.

7. ANEXOS



ARTÍCULO 1

Título: Modeling of volatile and phenolic compounds and optimization of the process conditions for obtaining balanced extra virgin olive oils

Autores: Alfonso M. Vidal; Sonia Alcalá; María Teresa Ocaña; Antonia de Torres; Francisco Espínola; Manuel Moya

Publicación: Grasas y Aceites, 69 (2), e250 (2018) (Open Access)

Cuartil: Q4 (Food Science & Technology)

Índice de impacto (JCR 2018): 0,891

Índice de impacto (5 años): 1,203

doi: <https://doi.org/10.3989/gya.1220172>

Modeling of volatile and phenolic compounds and optimization of the process conditions for obtaining balanced extra virgin olive oils

A.M. Vidal^a, S. Alcalá^a, M.T. Ocaña^b, A. De Torres^a, F. Espínola^a and M. Moya^{a,✉}

^aCenter for Advanced Studies in Energy and Environment (CEAEMA). Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3). Department of Chemical, Environmental and Materials Engineering. University of Jaén, 23071 Jaén, Spain.

^bDepartment of Didactic of Sciences. University of Jaén, 23071 Jaén, Spain.

✉Corresponding author: mmoya@ujaen.es

Submitted: 05 December 2017; Accepted: 12 February 2018

SUMMARY: The main objective of this paper is to obtain extra virgin olive oils (EVOOs) which are balanced in volatile and phenolic compounds. An experimental design was performed and response surface methodology was applied. The factors for malaxation were: temperature 20-40 °C, time 30-90 min, and hole diameter of hammer-crusher 4.5-6.5 mm. The results show that high temperatures and small hole diameter must be used in order to obtain a higher content in phenolic compounds, while for volatile compounds a low temperature and large hole diameter must be used. The models predict that the best and more balanced EVOO are obtained with the hole diameter of greater size and a medium-low temperature. Thus, for a hammer-crusher hole diameter of 6.5 mm 337 and 356 mg/kg total HPLC phenols were obtained for malaxation temperature of 20 and 25 °C, respectively and, likewise, 12.7 and 11.5 mg/kg total LOX volatiles.

KEYWORDS: *Balanced olive oils; Oil mill; Phenolic compounds; Response Surface Methodology; Volatile compounds*

RESUMEN: *Modelado de compuestos volátiles y fenólicos y optimización de las condiciones de operación para obtener aceites de oliva virgen extra equilibrados.* El principal objetivo es obtener aceites de oliva vírgenes extra (AOVEs) equilibrados en compuestos volátiles y fenólicos. Se ha realizado un diseño experimental y aplicado metodología de superficie de respuesta. El rango de los factores de batido fue, temperatura 20-40 °C y tiempo 30-90 min, y diámetro de orificio del molino de martillos 4,5-6,5 mm. Los resultados muestran que a altas temperaturas y pequeño diámetro de orificio se obtienen elevados contenidos en compuestos fenólicos, mientras que para volátiles se debe usar temperatura baja y orificio de gran diámetro. Los modelos predicen que el mejor y más equilibrado EVOO se obtiene con el orificio de mayor tamaño y temperatura media-baja. Así, para diámetro de orificio de 6,5 mm se obtienen 337 y 356 mg/kg de fenoles totales HPLC, para temperaturas de batido de 20 y 25 °C respectivamente y, asimismo, 12,7 y 11,5 mg/kg de volátiles totales LOX.

PALABRAS CLAVE: *Aceites de oliva equilibrados; Almazara; Compuestos fenólicos; Compuestos volátiles; Metodología de superficie de respuesta*

ORCID ID: Vidal AM <https://orcid.org/0000-0003-3803-1876>, Alcalá S <https://orcid.org/0000-0002-5172-0847>, Ocaña MT <https://orcid.org/0000-0001-6944-8178>, De Torres A <https://orcid.org/0000-0002-4613-0279>, Espínola F <https://orcid.org/0000-0002-9570-6297>, Moya M <https://orcid.org/0000-0002-9820-396X>

Citation/Cómo citar este artículo: Vidal AM, Alcalá S, Ocaña MT, De Torres A, Espínola F, Moya M. 2018. Modeling of volatile and phenolic compounds and optimization of the process conditions for obtaining balanced extra virgin olive oils. *Grasas Aceites* 69 (2), e250. <https://doi.org/10.3989/gya.1220172>

Copyright: ©2018 CSIC. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0) License.

1. INTRODUCTION

Volatile and phenolic compounds are different groups of compounds present in virgin olive oil (VOO). Most of the taste and aroma of olive oil depend on these compounds. The volatile compounds present in olive oil are related to sensory attributes, and play an important role in consumers' sensory perceptions. These compounds are originated during the olive oil production process, most of them through the actions of enzymes which are released during the olive milling process. Many pathways are involved in the production of volatile compounds. Unsaturated fatty acids, such as linolenic and linoleic acid, are transformed into compounds of five and six carbon atoms through the Lipoxygenase (LOX) pathway (Gómez-Rico *et al.*, 2006; Sanchez and Salas, 2003). These compounds contribute to the pleasant aromas of olive oil (Angerosa *et al.*, 2000).

Sensory characteristics are a key factor in the perception of a product's quality level on the part of consumers. Volatile compounds are mainly responsible for aroma, even though phenolic compounds are related to the sense of the taste of olive oil (Angerosa *et al.*, 2004). Several factors influence the composition of volatile compounds of olive oil, from the agronomic and climatic to the technological ones (Luna *et al.*, 2006). However, the activity of the enzymes involved in the LOX pathway is genetically determined (Clodoveo *et al.*, 2014).

On the other hand, the phenolic compounds of olive oil are a complex group of chemical compounds which contribute to the stability of olive oil (Franco *et al.*, 2014). The composition of these compounds is mainly determined by the elaboration process, production technology, the variety and maturation of olives and the agro-climatic parameters (Romero *et al.*, 2016; Servili *et al.*, 2004). An overripe harvest of olives involves a decrease in the concentration of phenolic compounds. Therefore, olives should be harvested at the early stage of ripeness to obtain the maximum amount of phenolic compounds.

The antioxidant capacity, the increase in the quantity of HDL and the decrease in the quantity of LDL, the inhibition of the proliferation of cancer cells, the prevention of many diseases and the decrease in oxidative stress are just some of the properties of these compounds (Tripoli *et al.*, 2005). Several research papers (Beauchamp *et al.*, 2005; Cicerale *et al.*, 2012) have stated that oleocanthal has anti-inflammatory properties similar to classic non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) such as Ibuprofen, suppressing the Cyclooxygenase enzyme (COX) involved in the prostaglandin synthesis pathway. Recently, oleocanthal has been unveiled as a powerful therapeutic molecule for several diseases.

It can show pharmacological properties for various pathogenic processes, including inflammation, cancer and neurodegenerative diseases (Scotece *et al.*, 2015).

The hole diameter of the hammer-crusher and temperature and time in the malaxation stage are the main technological factors which influence the EVOO production process. These parameters can be modified to obtain olive oils of excellent quality. On the basis of the above, the main aim of this research is to determine the best conditions to obtain healthy and high quality EVOO, with a large quantity of phenolic compounds and a good profile of volatile compounds (balanced EVOO).

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Olives

Olive fruits, *Olea europaea* L., were hand-picked from a traditional grove in Sierra Mágina (Jaén, Spain). The cultivated variety is Picual with a 4.9 maturity index, determined according to Uceda and Frias and described by Espínola *et al.* (2009); 486 g/kg moisture content, determined by drying milled paste at 105 °C, and a 284 g/kg oil content, determined by the Soxhlet method. The olives were collected from unirrigated land.

2.2. Olive oil extraction

Oils were obtained under laboratory-scale conditions using an Abencor centrifugal system (Abencor analyzer, MC2, Ingeniería y Sistemas S.L., Seville, Spain) (Espínola *et al.*, 2011). The oils obtained were decanted into a graduated test tube for at least three hours, paper filtered and stored in amber glass bottles, under N₂ atmosphere, at -18 °C until they were analyzed.

2.3. Analysis of phenolic compounds

The method proposed by the International Olive Council (COI/T.20/Doc No 29) was used to determine the phenolic compounds present in virgin olive oils via High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The equipment used was a liquid chromatograph (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) with the essential components: an elution pump (model LC-20AD), solvent degasser (model DGU-20A5), a refrigerated automatic injector (model SIL-20A8HT), a column oven (model CTO-10A5vpC), a diode array detector (model SPD-M20) and LC LabSolutions V.5.42.SP3 software (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). The column used was BDS Hypersil C18 (Thermo Scientific, USA), the particle size was 5 µm, the column size was 25 cm and the internal diameter was 4.6 mm. The mobile phase was a

ternary gradient made up by orthophosphoric acid-water to 0.2% (A), Methanol (B) and Acetonitrile (C). The proportions of the phases are changed over time by means of a flow ramp. The initial proportion of phase A was 96%, B and C were 2%. At minute 40, the proportion of phase A was 50%, B and C were 25%. At minute 45, the proportion of phase A was 40%, B and C were 30%. At minute 60, the proportion of phase A was 0%, B and C were 50%. From minute 72 to 80 the proportions of the phases were identical to the initial ones; minute 80 was the end of the chromatogram. The elution flow was 1 mL/min. The oven temperature was set at 30 °C and the injected volume of sample was 20 µL. The detector UV provided a signal at 280 nm. The phenolic compounds were quantified through the addition of syringic acid as internal standard and tyrosol as external standard. The results obtained were expressed as mg of tyrosol per kg of oil. The phenolic compounds were identified through comparison with the following analytical standards: Syringic acid, vanillin, luteolin, vanillic acid, oleuropein, *trans*-ferulic acid and *trans*-cinamic acid, all purchased from Fluka (Milan, Italy). Tyrosol, pinoselinol, caffeic acid, apigenin and *p*-coumaric acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). *o*-coumaric acid and hydroxytyrosol were purchased from Extrasynthese (Genay Cedex, France). 3,4-DHPEA-EDA (oleacein) and *p*-HPEA-EDA (oleocanthal) were identified by analytical standards supplied by the Department of Organic Chemistry from the University of Jaén. *p*-HPEA-EA and 3,4-DHPEA-EA were identified using the method proposed by COI, Determination of bio-phenols in olive oils by HPLC, (COI/T.20/Doc No 29).

The Folin-Ciocalteu reagent was used to determine the total quantity of phenolic compounds in the olive oil, with slight adjustments (Vázquez-Roncero *et al.*, 1973). The weight of the oil samples was 1 g. The sample was placed in a tube and dissolved in 5 mL of hexane. The liquid-liquid extraction was performed by repeating contact with a 2 mL methanol-water solution (60:40). This extraction was repeated three times. Each contact was shaken for 2 min with a Vortex type agitator. The methanolic extracts were collected in a test tube of 10 mL. To conclude, the methanol-water solution was added to complete 10 mL. The methanolic extracts were reacted with the Folin-Ciocalteu reagent. The absorbance of the solutions was measured at a wavelength of 725 nm. The equipment used was a UV spectrophotometer, model Shimadzu UV-Spectrophotometer 1800 (Kyoto, Japan). A standard curve was used to determine the quantity of phenolic compounds, using caffeic acid as external standard. The results were expressed as mg of caffeic acid per kg of olive oil.

The antioxidant potential was determined as DPPH free radical scavenging activity. A DPPH stock solution (0.1 mmol/L) was prepared in methanol, and further diluted to 1.0 AU at 515 nm prior to use. Aliquots of extract (20-2000 mL) were adequately diluted to a volume of 200 mL and added to 1.5 mL of DPPH solution cuvettes, shaken and kept in the dark for 60 min, and then the absorbance was measured at 515 nm using methanol as a blank. The percentage of scavenged DPPH radicals was calculated according to Equation 1:

$$\%DPPH_{rem} = \frac{A_0 - A_{sample}}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

where A_0 and A_{sample} stand for the absorbance of the control and sample, respectively. The percentage of inhibition was converted into antioxidant activity by using Trolox as standard antioxidant.

2.4. Analysis of volatile compounds

Headspace solid-phase micro extraction (HS-SPME) and the gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) technique were used for the analysis of volatile compounds.

Two sample grams were placed in a 20 mL amber glass vial tightly capped with polytetrafluoroethylene (PTFE)/silicone septum and a magnetic cap. The vial was heated up to 40 °C for 10 minutes to reach the equilibration of volatile compounds in the headspace. Afterwards, the SPME needle was inserted through the septum and the fiber was exposed for 40 min. The SPME fiber (2 cm length and 50/30 µm film thickness), purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA), was composed of Carboxen/DVB/polydimethylsiloxane (PDMS). Previously, the fiber had been conditioned following the instructions of the supplier.

The GC-FID analysis was performed using a gas chromatograph model 7890B (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The gas chromatograph was equipped with a split/splitless injector and a flame ionization detector. The volatile compounds adsorbed in the fiber were desorbed into the injector port for 1 min in splitless mode. The DB-WAXetr polyethylene glycol capillary column (30 m length, 0.25 mm internal diameter, 0.25 µm coating) (Agilent Technologies, USA) was used for the chromatographic separation. The carrier gas was helium at a flow rate of 1 mL/min. The injector temperature was 260 °C and the detector temperature was 280 °C. The oven temperature was initially 40 °C for 10 min. Afterwards, the temperature was increased with a ramp of 3 °C/min up to 160 °C and immediately increased with a ramp of 15 °C/min up to 200 °C and held for 5 min to the end. The integrations were

performed with Agilent OpenLAB ChemStation C.01.06 Software (Agilent Technologies, CA, USA).

The chromatographic peaks were quantified by the Internal Standard Method. 4-Methyl-2-pentanol was the internal standard and each and every one of the compounds was used as external standard. The results obtained were expressed as mg of each standard compound per kg of oil.

For the analysis of volatile compounds, 39 analytical standards were used: acetic acid, *trans*-2-pentenal, 1-penten-3-one, pentanal, 1-penten-3-ol, pentan-1-ol, 2-methyl-1-butanol, hexanal, *cis*-3-hexen-1-ol, hexan-1-ol, heptanal, octane, octanal, 1-octen-3-ol, *cis*-3-hexenyl acetate, hexyl acetate, *trans,trans*-2,4-decadienal, propionic acid, 2-methylpropan-1-ol and butanoic acid, all supplied by Fluka (Buchs, Switzerland); 4-methylpentan-2-ol, *trans,trans*-2,4-heptadienal, *trans*-2-heptenal, heptan-2-ol, *trans*-2-penten-1-ol, 2-methylbutanal, 3-methylbutanal, 3-methyl butanoic acid, ethyl acetate, *cis*-3-hexenal, 2-methylpropanoic acid, ethyl butanoate, *trans,trans*-2,6-nonadienal, and *trans*-2-hexenyl acetate were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); pentan-3-one and nonanal were supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA); *cis*-2-penten-1-ol and *trans*-2-hexen-1-ol were supplied

by SAFC; *trans*-2-hexenal was supplied by Acrös Organics (Geel, Belgium).

2.5. Experimental design and statistical analysis

The Statistical Design of Experiments (SDE) and Response Surface Methodology (RSM) were used to plan and analyze the experiments. Both constitute a planning methodology and analysis based on statistical tools, where SDE selects the optimal experimental strategy to obtain the desired information with the minimum cost of analysis and RSM evaluates the experimental results ensuring maximum reliability in the conclusions (Box *et al.*, 2005).

In this process, a Box-Behnken design, with five repetitions of central points, for three factors was used: diameter of the holes of the hammer-crusher, temperature and malaxation time. The range of variation of these factors is 4.5 to 6.5 mm, 20 to 40 °C and 30 to 90 minutes, respectively. Table 1 shows the different trials proposed by the design and their order of execution. Likewise, Table 1 also shows the actual and coded values of the factors used in each trial. The design tests allow to determine the influence of these technological factors on the phenolic and volatile compounds obtained in the olive oils.

TABLE 1. Experimental design and responses for Picual virgin olive oil

Design points*	Actual factors (coded factors)			Responses***			
	Diameter** (mm)	Temperature (°C)	Time (min)	Total HPLC phenols (mg/kg tyrosol)	Total Folin phenols (mg/kg caffeic acid)	DPPH (µmol/kg)	Total LOX volatiles (mg/kg)
1	5.5 (0)	30 (0)	60 (0)	411	415	1109	12.2
2	5.5 (0)	20 (-1)	90 (+1)	357	344	844	12.4
3	4.5 (-1)	30 (0)	90 (+1)	508	467	1306	12.4
4	6.5 (+1)	30 (0)	90 (+1)	474	462	1393	11.7
5	6.5 (+1)	40 (+1)	60 (0)	747	761	2298	7.21
6	5.5 (0)	20 (-1)	30 (-1)	351	404	979	11.2
7	6.5 (+1)	20 (-1)	60 (0)	356	374	910	13.4
8	5.5 (0)	40 (+1)	90 (+1)	851	866	2668	7.03
9	4.5 (-1)	40 (+1)	60 (0)	758	762	2581	7.45
10	5.5 (0)	40 (+1)	30 (-1)	760	862	2662	7.40
11	6.5 (+1)	30 (0)	30 (-1)	380	422	1229	10.1
12	4.5 (-1)	30 (0)	30 (-1)	544	642	1919	9.21
13	5.5 (0)	30 (0)	60 (0)	610	724	1873	8.03
14	4.5 (-1)	20 (-1)	60 (0)	423	444	1427	10.9
15	5.5 (0)	30 (0)	60 (0)	583	639	1601	8.31
16	5.5 (0)	30 (0)	60 (0)	522	556	1636	8.60
17	5.5 (0)	30 (0)	60 (0)	415	483	1298	10.1

* Experiments were run in a random order

** Hole diameter of the hammer-crusher

*** Average of two replicates

The factors were coded according to the following transformation, Equation 2.

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X} \quad (2)$$

Where x_i is the dimensionless coded value of the factor X_i , X_0 is the value of X_i at the center point or average level of the factor and ΔX the half-step change. The factors are usually coded because they provide a uniform framework to investigate the effects of factors and the coefficients of the models can be easily compared.

The experimental results were analyzed by Design-Expert v. 8.0.7.1 software (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA). The adequacy of the proposed model was determined by evaluating the lack of fit, coefficient of determination (R^2) and the Fisher value (F-value) obtained from the analysis of variance (ANOVA). A quadratic model for each response studied was used according to Eq. 3:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 D + \beta_2 T + \beta_3 t + \beta_{12} D T + \beta_{13} D t + \beta_{23} T t + \beta_{11} D^2 + \beta_{22} T^2 + \beta_{33} t^2 \pm SD \quad (3)$$

Where: D is the hole diameter of the crusher (mm), T is the malaxation temperature ($^{\circ}\text{C}$) and t is the malaxation time (min). The predicted response (Y) was correlated with the set of coefficients (β): the intercept (β_0), linear ($\beta_1, \beta_2, \beta_3$), interaction ($\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$) and quadratic ($\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$). SD is the standard deviation of the model.

The statistical significance of the model and model coefficients were determined at 5% probability level (p -value = 0.05). The models for each response were expressed in terms of actual factors and without taking into account terms which were not statistically significant.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Effect of technological factors on phenolic compounds and antioxidant activity

Phenolic compounds play a very important role in VOO due to their high antioxidant activity, which contributes to the shelf life of the oils and, in addition, gives them their typical bitter taste (Zribi *et al.*, 2013).

Table 1 shows the total phenols as determined by HPLC (mg/kg tyrosol), which are the sum of the individual phenolic compounds, total phenols determined by Folin-Ciocalteu reagent (mg/kg caffeic acid) and the antioxidant potential determined by DPPH free radical scavenging activity ($\mu\text{mol}/\text{kg}$). Table 2 shows the content of individual phenolic compounds identified by HPLC (mg/kg tyrosol). Table 3 shows the models obtained for all the responses, which can be used later to predict the answers once the factors have been fixed. All the responses in Tables 1, 2 and 4 were determined in duplicate; the average values are shown in these tables as well. The software generates the regression equations after discarding the terms which are not statistically significant (p -value > 0.05); however, in order to support hierarchy, some linear terms were

TABLE 2. Responses for individual phenolic compounds by HPLC* (mg/kg tyrosol)

Design points	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
hydroxytyrosol	8.40	4.61	4.07	5.68	4.35	4.09	4.81	4.27	1.72	4.12	3.95	5.60	4.11	4.02	1.76	2.38	1.71
tyrosol	1.46	1.25	1.80	3.35	1.53	0.88	1.77	1.57	1.46	1.23	1.38	1.53	1.23	1.26	3.72	2.65	1.84
vainillin	0.89	1.73	1.46	1.29	1.86	1.23	0.63	2.91	2.38	1.71	1.54	1.01	1.45	1.01	1.55	1.89	1.97
<i>p</i> -coumaric acid	6.10	2.61	2.79	3.66	5.00	1.51	2.43	2.45	2.54	1.58	1.39	1.33	1.39	2.20	2.06	2.32	1.74
<i>trans</i> -ferulic acid	4.88	2.28	6.92	8.10	8.63	2.25	1.60	11.5	10.2	6.80	4.93	2.52	5.39	2.50	3.74	5.28	6.38
3,4-DHPEA-EDA (oleacein)	150	107	188	190	285	140	122	338	320	356	159	252	298	164	252	218	164
3,4-DHPEA-EA	64.6	51.3	78.4	83.0	192	44.1	58.0	233	179	157	52.9	87.5	111	62.4	115	104	75.9
<i>p</i> -HPEA-EDA (oleocanthal)	45.2	36.7	63.2	45.7	78.1	25.8	28.1	90.8	77.4	62.2	41.3	39.6	55.6	38.8	53.6	53.0	50.5
<i>p</i> -HPEA-EA	36.3	46.3	50.3	49.1	65.4	35.9	41.0	72.1	61.7	48.2	43.4	28.8	32.9	33.0	41.3	40.1	45.5
pinoresinol	6.23	6.07	5.47	4.86	10.9	9.35	7.92	8.45	11.4	37.0	14.6	44.1	32.5	29.2	34.0	11.8	7.48
luteolin	2.52	2.16	6.23	3.04	4.58	2.00	2.50	3.63	4.51	4.39	1.73	2.65	2.31	4.63	4.21	6.81	4.62
apigenin	3.24	2.83	4.77	3.31	3.44	2.59	3.32	4.74	5.61	8.17	1.93	3.77	3.69	2.96	2.98	2.70	2.26

3,4-DHPEA-EDA: dialdehyde form of decarboxymethyl oleuropein aglycone

p-HPEA-EDA: dialdehyde form of decarboxymethyl ligstroside aglycone

3,4-DHPEA-EA: aldehyde and hydroxylic form of oleuropein aglycone

p-HPEA-EA: aldehyde and hydroxylic form of ligstroside aglycone

* Average of two replicates

TABLE 3. Models (Eq. 3) in terms of actual factors and statistical parameters for the responses in Tables 2 and 4

Response	Model	p-value	R ²	Std. Dev.
Total HPLC phenols (mg/kg tyrosol)	1038.4 - 34.5 D - 46.0 T + 1.11 T ²	< 0.0001	0.939	47.7
Total Folin phenols (mg/kg caffeic acid)	948.1 - 37.0 D - 37.0 T + 0.97 T ²	< 0.0001	0.915	60.9
DPPH (μmol/kg)	2439.1 - 242.3 D - 42.8 T + 1.97 T ²	< 0.0001	0.939	175.2
Total LOX volatiles pathway (mg/kg)	12.49 + 0.76 D - 0.24 T	< 0.0001	0.859	0.85
Phenol compounds (mg/kg)				
Hydroxytyrosol	62.66 - 13.6 D - 0.71 T - 0.43 t + 0.13 D T + 0.027 D t + 0.74 D ² + 0.002 t ²	0.0002	0.975	0.31
Tyrosol	1.49			0.22
Vainillin	1.52			0.32
p-coumaric acid	-6.27 + 1.31 D + 0.25 T + 0.019 t - 0.045 D T	0.0008	0.913	0.19
trans-ferulic acid	-1.08 + 0.12 T - 0.067 t + 0.004 T t	< 0.0001	0.942	0.81
3,4-DHPEA-EDA	380.4 - 20.9 D - 14.7 T + 0.41 T ²	< 0.0001	0.904	28.4
3,4-DHPEA-EA	160.9 - 11.1 T + 0.29 T ²	< 0.0001	0.918	14.8
p-HPEA-EDA	18.6 - 0.55 T - 0.093 t + 0.015 T t + 0.032 T ²	< 0.0001	0.974	3.48
p-HPEA-EA	18.9 + 11.0 D - 4.62 T + 0.94 t - 0.13 D t + 0.098 T ²	< 0.0001	0.961	2.99
Pinoresinol	142.9 - 36.6 D + 0.27 T + 0.057 t + 0.52 D T + 0.24 D t - 0.058 T t	0.0057	0.914	5.34
Luteolin	3.30			1.10
Apigenin	3.73 - 0.89 D + 0.11 T + 0.019 t	< 0.0001	0.922	0.32
Volatile compounds (mg/kg)				
LOX pathway				
Hexanal	1.12 - 0.016 T + 0.001 t	< 0.0001	0.891	0.047
Hexan-1-ol	0.480 + 0.049 D - 0.006 T + 0.0005 t	< 0.0001	0.922	0.019
trans-2-hexenal	-0.124 + 1.81 D + 0.082 T - 0.049 D T	< 0.0001	0.901	0.57
trans-2-hexen-1-ol	-2.95 + 0.67 D + 0.087 T + 0.012 t - 0.018 D T - 0.002 D t	0.0002	0.926	0.045
cis-3-hexen-1-ol	3.37 - 0.82 D - 0.016 T + 0.002 t + 0.080 D ²	< 0.0001	0.915	0.048
cis-3-hexenyl acetate	0.094 + 0.45 D - 0.10 T + 0.041 t - 0.008 D t + 0.002 T ²	0.0006	0.906	0.037
1-penten-3-ol	0.376 - 0.019 D - 0.002 T	< 0.0001	0.856	0.009
1-penten-3-one	0.890 - 0.039 D - 0.001 t	< 0.0001	0.842	0.017
cis-2-penten-1-ol	0.476 - 0.008 D + 0.001 t	< 0.0001	0.906	0.007
$\frac{1}{\sqrt{\text{trans-2-Pentenal} + 0.05}}$	-13.4 + 1.04 T - 0.015 T ²	< 0.0001	0.999	0.011
Sugar fermentation				
Ethanol	-15.7 + 5.10 D + 0.58 T - 0.013 t - 0.13 D T	0.0003	0.908	0.36
Acetic acid	0.47			0.042
Other compounds				
Octane	0.239 + 0.095 D + 0.009 T + 0.010 t - 0.001 D t	0.0001	0.904	0.029
Pentan-3-one	-0.134 + 0.10 D + 0.015 T - 0.003 D T	0.0004	0.885	0.011
Octanal	4.45 - 1.48 D + 0.003 t + 0.150 D ²	< 0.0001	0.904	0.064
Nonanal	11.6 - 1.82 D - 0.22 T - 0.021 t + 0.001 T t + 0.18 D ² + 0.003 T ²	< 0.0001	0.979	0.067

D is the hole diameter of the hammer-crusher (mm), T is the malaxation temperature (°C), t is the malaxation time (min) R² is the coefficient of determination, Std. Dev. (SD) is the standard deviation

TABLE 4. Responses for individual volatile compounds by GC* (mg/kg)

Design points	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
LOX pathway																	
Hexanal	0.706	0.884	0.834	0.789	0.510	0.827	0.850	0.539	0.546	0.564	0.704	0.654	0.512	0.885	0.609	0.620	0.728
Hexan-1-ol	0.625	0.685	0.639	0.658	0.569	0.645	0.698	0.566	0.574	0.520	0.644	0.530	0.556	0.607	0.572	0.550	0.608
<i>trans</i> -2-hexenal	6.862	6.544	6.652	5.908	2.393	5.547	7.210	2.181	2.568	2.546	4.830	4.394	3.326	5.422	3.298	3.837	4.867
<i>trans</i> -2-hexen-1-ol	0.637	0.717	0.641	0.547	0.484	0.543	0.902	0.516	0.490	0.575	0.501	0.395	0.471	0.451	0.481	0.457	0.527
<i>cis</i> -3-hexen-1-ol	1.254	1.179	1.075	1.100	0.944	1.096	1.301	0.831	0.846	0.765	1.041	0.871	0.882	1.056	0.976	0.904	0.958
<i>cis</i> -3-hexenyl acetate	0.973	1.056	1.152	1.490	1.035	1.179	1.143	1.090	1.065	1.134	1.164	0.886	0.921	1.093	0.923	0.905	1.122
1-penten-3-ol	0.210	0.241	0.240	0.185	0.193	0.212	0.228	0.198	0.214	0.210	0.193	0.273	0.226	0.256	0.262	0.243	0.214
1-penten-3-one	0.534	0.590	0.649	0.566	0.602	0.650	0.632	0.610	0.646	0.634	0.614	0.716	0.667	0.669	0.664	0.601	0.603
<i>cis</i> -2-penten-1-ol	0.418	0.481	0.524	0.460	0.479	0.476	0.481	0.503	0.496	0.456	0.450	0.495	0.470	0.491	0.528	0.489	0.476
<i>trans</i> -2-pentenal	0.340	0.394	0.000	0.000	0.000	0.000	0.409	0.000	0.000	0.000	0.000	0.372	0.000	0.378	0.000	0.000	0.000
Sugar fermentation																	
Ethanol	6.833	8.330	5.265	7.700	5.370	6.922	7.387	5.585	5.739	5.953	7.826	6.568	7.306	6.095	6.013	6.504	7.621
Acetic acid	0.466	0.498	0.732	0.546	0.492	0.499	0.515	0.501	0.511	0.459	0.404	0.409	0.426	0.472	0.494	0.422	0.381
Other compounds																	
Octane	0.908	1.097	1.210	1.139	1.210	1.166	1.086	1.305	1.227	1.059	1.131	1.028	1.096	1.034	1.167	1.094	1.158
Pentane-3-one	0.296	0.349	0.341	0.310	0.297	0.330	0.384	0.000	0.305	0.277	0.301	0.298	0.303	0.316	0.351	0.330	0.320
Octanal	1.284	1.186	1.273	1.470	1.332	1.135	1.309	1.061	1.003	0.997	1.263	0.865	1.103	1.056	0.947	0.949	1.473
Nonanal	3.506	3.429	3.594	3.805	3.864	3.564	3.703	4.043	3.647	2.976	3.252	2.938	3.015	2.990	3.178	3.214	3.300

* Average of two replicates

not eliminated from the models, although they were not statistically significant. As can be seen in Tables 1 and 2, all oils meet the condition of being healthy because all of them contain more than 250 mg/kg of Hydroxytyrosol and its derivatives, according to the Commission Regulation (EU) No 432/2012.

Figure 1 shows the model surface obtained for the total HPLC phenol response; for total Folin phenols (total phenols determined with the Folin-Ciocalteu method), the surface is similar, as can be deduced from the model equation in Table 3. According to the models, the temperature during malaxation has a major influence on the presence of phenolic compounds, which increase as temperature increases. On the contrary, the phenolic compounds decrease as the diameter of the crusher hole increases, but this has less influence. Similar results were reported by other authors studying malaxation and milling separately (Vekiari and Koutsaftakis, 2002; Ranalli *et al.*, 2003). However, Ben Brahim *et al.* (2015), using Response Surface Methodology (RSM), indicated that the malaxation time does not significantly affect the phenol content.

Figure 2 shows the relationship between phenolic compound content and the antioxidant potential DPPH, both for total HPLC phenols and total Folin phenols. A very good correlation was observed in it, as is also apparent from the models in Table 3. On the other hand, from Figure 2 and Table 3 a very good correlation between both methods of quantifying total phenolic compounds in the oils is deduced, although the Folin-Ciocalteu method overestimated the content regarding HPLC.

Table 3 shows the proposed models in terms of actual factors for individual phenols; each phenol had a different model, but after examining the response surfaces, small differences were observed

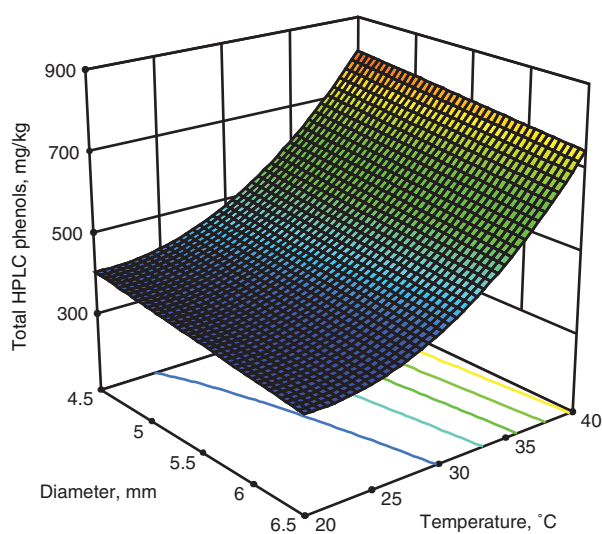


FIGURE 1. Effects of temperature and hole diameter of the hammer-crusher on total HPLC phenol content

among them. The secoiridoid derivative class (3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA, *p*-HPEA-EDA and *p*-HPEA-EA) was clearly predominant and all of them increased with temperature. The results are similar to those obtained by other authors (Fregapane and Salvador, 2013; Gómez-Rico *et al.*, 2009; Kalua *et al.*, 2006). In agreement with other papers (Rodis *et al.*, 2002), this increase can be attributed to the increased partition coefficient between the oil and water phases, which causes an increase in the solubility of these compounds in the oil phase.

The malaxation time had a positive influence on secoiridoid derivatives from ligstroside (*p*-HPEA-EDA and *p*-HPEA-EA), but did not show a significant influence on secoiridoid derivatives from oleuropein (3,4-DHPEA-EDA and 3,4-DHPEA-EA). This is in contradiction to Ranalli *et al.* (2003), who observed a reduction in these secoiridoid derivatives with the time of malaxation, and attributed it to an increase in the oxidative reactions catalyzed by the activity of oxidoreductase enzymes present in the olive fruit such as peroxidase and polyphenoloxidase, due to the fact that olive paste was exposed to air longer when the malaxation time increased. In our case, the positive influence of malaxation time may be due to the increased activity of the β -glucosidase enzyme that hydrolyzed ligstroside and oleuropein, and the greater phenol content of the Picual variety. Figure 3 shows the response surface for the influence of the temperature and time on oleocanthal (*p*-HPEA-EDA) content, and of temperature and diameter on oleacein (3,4-DHPEA-EDA) content. For these models, factors that are not considered are not significant.

Different behaviors are also observed in other compounds; for example, pinoresinol decreased when temperature increased with a malaxation time longer than 60 minutes; and luteolin was unaltered. In addition, as seen in Table 3, some models present interaction among the factors; for example, diameter-time in alcohols (hydroxytyrosol and tyrosol) and ligstroside aglycone (*p*-HPEA-EA), or

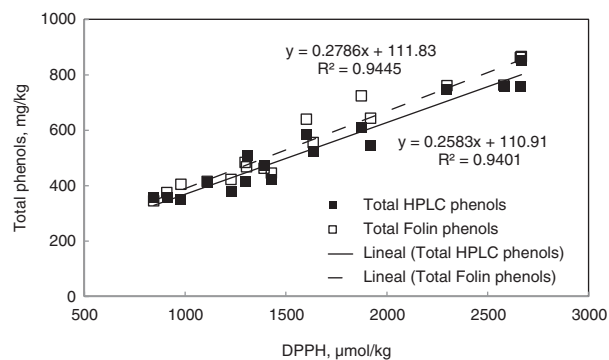


FIGURE 2. Relationship between phenolic compound content and antioxidant potential

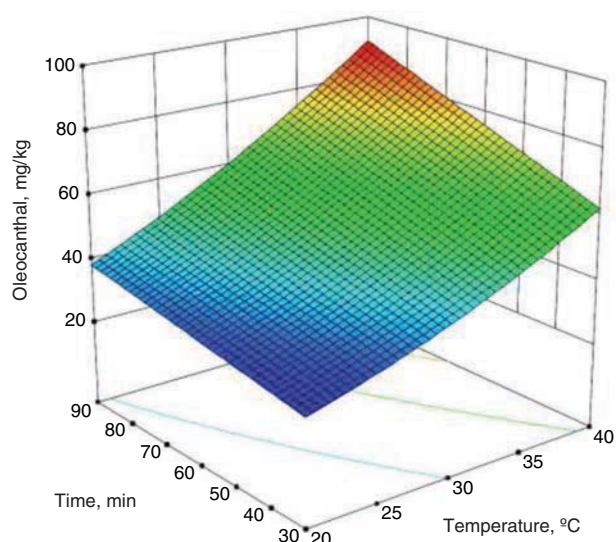
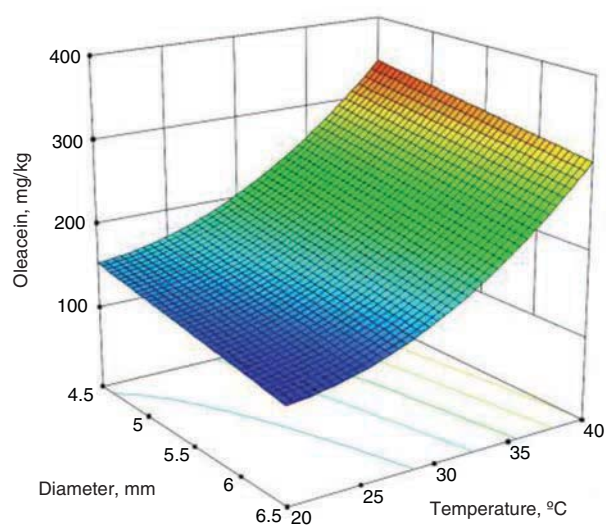


FIGURE 3. Response surfaces for oleacein and oleocanthal content

diameter-time and temperature-time in pinoresinol. Finally, an interaction was observed between temperature and time in oleocanthal (*p*-HPEA-EDA), in agreement with De Torres *et al.* (2016).

3.2. Effect of technological factors on volatile compounds

Table 4 shows the volatile compound contents grouped according to the most probable precursor molecule and Table 3 shows the models. Only 16, of the 39 analytical standards used were identified in the samples because some analytical standards corresponded to compounds present in olive oils with defects, which are unwanted in extra virgin olive oils. *Trans*-2-hexenal was clearly predominant. The volatiles arising from the lipoxygenase (LOX)

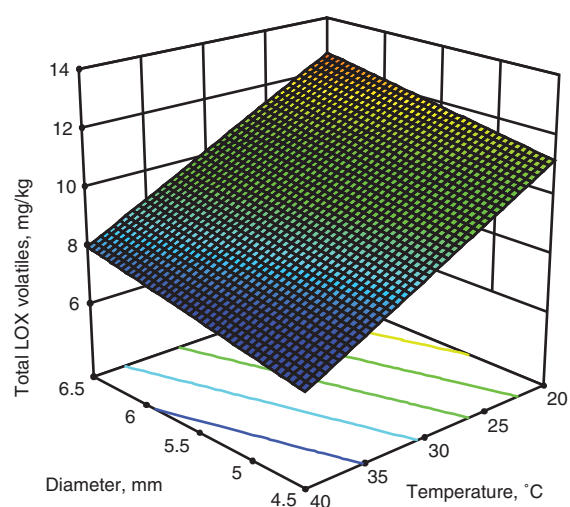


FIGURE 4. Effects of temperature and hole diameter on total LOX volatile content

cascade (Angerosa *et al.*, 2004; Kalua *et al.*, 2007) decreased with temperature, but increased with the crusher hole diameter. The malaxation time was not significant. Figure 4 shows the response surface for the influence of diameter and malaxation temperature on total LOX volatile contents. The influence of temperature was observed to be much greater than that of diameter. When temperature was increased from 20 °C to 40 °C, the content of *trans*-2-hexenal was reduced by 62%, while the content of 1-penten-3-ol only fell by 16%. The total volatile compounds decreased by 36%, in agreement with many research papers (Fregapane and Salvador, 2013; Gómez-Rico *et al.*, 2009; Angerosa and Basti, 2001; Ranalli *et al.*, 2001), as a result of the inactivation of hydroxylidelyase enzymes (Salas and Sánchez, 1999).

For most of the studied volatiles, a positive dependence was observed with malaxation time, except for 1-penten-3-one, for which one slight decrease was observed. Overall, the total volatile compounds were not significantly affected by the duration of the malaxation.

Finally, some of them increased with the diameter crusher holes: *trans*-2-hexenal, *cis*-3-hexenol, hexanol and *trans*-2-hexenol; while others decreased: 1-penten-3-ol, 1-penten-3-one and *cis*-2-pentenol. The end result would focus on an increase in total volatile compounds due to the importance of the *trans*-2-hexenal and *cis*-3-hexenol. In both cases, the maximum concentration corresponded to a diameter of 6.5 mm and a temperature of 20 °C.

3.3. Optimal operating conditions

In order to achieve the optimal conditions of a balanced EVOO, we aimed to maximize the content in total HPLC phenols and total LOX volatiles

TABLE 5. Optimal conditions for the maximum of the main responses and prediction for some usual operating conditions

Individual response				
	Maximum value	Diameter (mm)	Temperature (°C)	Time (min)
Total HPLC phenols (mg/kg tyrosol)	813.5	4.50	40.00	--
DPPH(μmol/kg)	2795	4.50	40.00	--
Total LOX volatiles (mg/kg)	12.71	6.50	20.00	--
Responses prediction				
Diameter (mm)	Temperature (°C)	Total HPLC phenols (mg/kg tyrosol)	Total LOX volatiles (mg/kg)	DPPH (μmol/kg)
4.5	20	406	11.2	1282
4.5	25	425	10.0	1512
5.5	20	372	12.0	1040
5.5	25	391	10.8	1270
5.5	30	465	9.6	1599
6.5	20	337	12.7	798
6.5	25	356	11.5	1028
6.5	30	430	10.4	1357
6.5	40	745	8.0	2310

and, by extension, the antioxidant activity given its direct dependence with the content of total phenolic compounds (Figure 2). Table 5 shows the optimal values obtained from the derived mathematical models using the Design-Expert software. It can be observed that the optimal conditions are at the contour limits. As can be determined from the models in Table 3, and is seen in Figure 2 and Table 5, the antioxidant activity is closely linked to the total phenol content in such a way that as these were increased the antioxidant activity also increased. In contrast, the variation in total LOX volatiles was completely opposite to that of total phenols, according to the findings of Gómez-Rico *et al.* (2009) and Inarejos-García *et al.* (2011).

Therefore, obtaining balanced olive oils only depends on what is considered a balanced oil and on the operating conditions that are set to obtain the desired content in its different components. In Table 5, the total phenol content, total LOX volatiles and antioxidant activity for different operating conditions were calculated using the models in Table 3. In order to obtain an extra virgin olive oil which is balanced and of high quality from the Picual variety, it should be elaborated with a malaxation temperature between 20 and 25 °C and preferably with a hammer-crusher hole diameter of 6.5 mm. Thus, for a hammer-crusher hole diameter of 6.5 mm 337 and 356 mg/kg total HPLC phenols were obtained for malaxation temperatures of 20 and 25 °C, respectively and, likewise, 12.7 and 11.5 mg/kg total LOX volatiles. These oils will be fragrant, healthy and, if they do not have defects, of high quality.

When the malaxation temperature is increased healthier but less fragrant oils were obtained and, on the contrary, less healthy but more fragrant oils were obtained at lower temperatures.

4. CONCLUSIONS

Temperature is the factor that has the major influence on the phenolic compounds and antioxidant activity; both of them increased as temperature increased. A good correlation between antioxidant activity and phenolic compounds was observed.

Temperature also has the major influence on the volatile compound content, thus when temperature increased from 20 to 40 °C, total volatiles decreased by 36%. The total volatile compounds increased with the hammer-crusher hole diameter.

In order to obtain an extra virgin olive oil which is balanced and of high quality from the Picual variety, the elaboration should be carried out with malaxation temperature between 20 and 25 °C and preferably with a hammer-crusher hole diameter of 6.5 mm. Thus, for a hole diameter of 6.5 mm 337 and 356 mg/kg total HPLC phenols were obtained for malaxation temperatures of 20 and 25 °C, respectively and, likewise, 12.7 and 11.5 mg/kg total LOX volatiles. These oils will be fragrant and nutritionally healthy.

ACKNOWLEDGMENT

This work is part of the Research Project of Excellence P11-AGR-7726. We wish to thank the Department of Economy, Innovation and Science

of the Andalusian Regional Government and the Spanish Ministry of Science and Innovation for the financial help provided.

REFERENCES

- Angerosa F, Basti C. 2001. Olive oil volatile compounds from the lipoxygenase pathway in relation to fruit ripeness. *Ital. J. Food Sci.* **13**, 421-428.
- Angerosa F, Mostallino R, Basti C, Vito R. 2000. Virgin olive oil odour notes: their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chem.* **68**, 283-287. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00189-2)
- Angerosa F, Servili M, Selvaggini R, Taticchi A, Esposto S, Montedoro G. 2004. Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *J. Chromatogr. A* **1054**, 17-31. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.07.093>
- Beauchamp GK, Keast RSJ, Morel D, Lin J, Pika J, Han Q, Lee CH, Smith AB, Breslin PAS. 2005. Phytochemistry: Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature* **437**, 45-46. <https://doi.org/10.1038/437045a>
- Ben Brahim S, Marrakchi F, Gargouri B, Bouaziz M. 2015. Optimization of malaxing conditions using CaCO₃ as a coadjuvant: A method to increase yield and quality of extra virgin olive oil cv. Chemlali. *LWT-Food Sci. Technol.* **63**, 243-252. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.013>
- Box GEP, Hunter JS, Hunter WG. 2005. *Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery, 2nd Edition*. John Wiley & Sons Inc., New Jersey, USA.
- Cicerale S, Lucas LJ, Keast RSJ. 2012. Antimicrobial, antioxidant and anti-inflammatory phenolic activities in extra virgin olive oil. *Curr. Opin. Biotechnol.* **23**, 129-135. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.09.006>
- Clodoveo ML, Hbaieb RH, Kotti F, Mugnozza GS, Gargouri M. 2014. Mechanical Strategies to Increase Nutritional and Sensory Quality of Virgin Olive Oil by Modulating the Endogenous Enzyme Activities. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **13**, 135-154. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12054>
- De Torres A, Espinola F, Moya M, Castro E. 2016. Composition of secoiridoid derivatives from Pical virgin olive oil using response surface methodology with regard to malaxation conditions, fruit ripening, and irrigation management. *Eur. Food Res. Technol.* **242**, 1709-1718. <https://doi.org/10.1007/s00217-016-2670-8>
- Espinola F, Moya M, Fernández DG, Castro E. 2009. Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjuvant extractant. *J. Food Eng.* **92**, 112-118. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.038>
- Espinola F, Moya M, Fernández DG, Castro E. 2011. Modelling of virgin olive oil extraction using response surface methodology. *Int. J. Food Sci. Technol.* **46**, 2576-2583. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02786.x>
- Franco MN, Galeano-Díaz T, Sánchez J, De Miguel C, Martín-Vertedor D. 2014. Antioxidant capacity of the phenolic fraction and its effect on the oxidative stability of olive oil varieties grown in the southwest of Spain. *Grasas Aceites* **65**, e004. <https://doi.org/10.3989/gya.051513>
- Fregapane G, Salvador MD. 2013. Production of superior quality extra virgin olive oil modulating the content and profile of its minor components. *Food Res. Int.* **54**, 1907-1914. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.022>
- Gómez-Rico A, Inarejos-García AM, Salvador MD, Fregapane G. 2009. Effect of malaxation conditions on phenol and volatile profiles in olive paste and the corresponding virgin olive oils (*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra). *J. Agric. Food Chem.* **57**, 3587-3595. <https://doi.org/10.1021/jf803505w>
- Gómez-Rico A, Salvador MD, La Greca M, Fregapane G. 2006. Phenolic and volatile compounds of extra virgin olive oil (*Olea europaea* L. Cv. Cornicabra) with regard to fruit ripening and irrigation management. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 7130-7136. <https://doi.org/10.1021/jf060798r>
- Inarejos-García AM, Fregapane G, Salvador MD. 2011. Effect of crushing on olive paste and virgin olive oil minor components. *Eur. Food Res. Technol.* **232**, 441-451. <https://doi.org/10.1007/s00217-010-1406-4>
- Kalua CM, Allen MS, Bedgood DR, Bishop AG, Prenzler PD, Robards K. 2007. Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chem.* **100**, 273-286. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.09.059>
- Kalua CM, Bedgood DR, Bishop AG, Prenzler PD. 2006. Changes in volatile and phenolic compounds with malaxation time and temperature during virgin olive oil production. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 7641-7651. <https://doi.org/10.1021/jf061122z>
- Luna G, Morales MT, Aparicio R. 2006. Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chem.* **98**, 243-252. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.05.069>
- Ranalli A, Contento S, Schiavone C, Simone N. 2001. Malaxing temperature affects volatile and phenol composition as well as other analytical features of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **103**, 228-238. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200104\)103:4<228::AID-EJLT228>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200104)103:4<228::AID-EJLT228>3.0.CO;2-7)
- Ranalli A, Pollastri L, Contento S, Iannucci E, Lucera L. 2003. Effect of olive paste kneading process time on the overall quality of virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **105**, 57-67. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200390018>
- Rodis PS, Karathanos VT, Mantzavinou A. 2002. Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 596-601. <https://doi.org/10.1021/jf010864j>
- Romero N, Saavedra J, Tapia F, Sepúlveda B, Aparicio R. 2016. Influence of agroclimatic parameters on phenolic and volatile compounds of Chilean virgin olive oils and characterization based on geographical origin, cultivar and ripening stage. *J. Sci. Food Agric.* **96**, 583-592. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7127>
- Salas JJ, Sánchez J. 1999. The decrease of virgin olive oil flavor produced by high malaxation temperature is due to inactivation of Hydroperoxide lyase. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 809-812. <https://doi.org/10.1021/jf981261j>
- Sanchez J, Salas JJ. 2003. Biogénesis del aroma del aceite de oliva, in Aparicio R, Harwood J. (Eds.) *Manual del Aceite de Oliva*. AMV Ediciones y Mundi-Prensa, Madrid (Spain), pp. 89-107.
- Scotece M, Conde J, Abella V, Lopez V, Pino J, Lago F, Smith AB, Gómez-Reino JJ, Gualillo O. 2015. New drugs from ancient natural foods. Oleocanthal, the natural occurring spicy compound of olive oil: a brief history. *Drug Discov. Today* **20**, 406-410. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.017>
- Servili M, Selvaggini R, Esposto S, Taticchi A, Montedoro G, Morozzi G. 2004. Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *J. Chromatogr. A* **1054**, 113-127. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.08.070>
- Tripoli E, Giammanco M, Tabacchi G, Di Majo D, Giammanco S, La Guardia M. 2005. The phenolic compounds of olive oil: structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr. Res. Rev.* **18**, 98-112. <https://doi.org/10.1079/NRR200495>
- Vázquez-Roncero A, Janer del Valle C, Janer del Valle ML. 1973. Determinación de los polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas Aceites* **24**, 350-357.
- Vekiari SA, Koutsafakis A. 2002. The effect of different processing stages of olive fruit on the extracted olive oil polyphenol content. *Grasas Aceites* **53**, 304-308. <https://doi.org/10.3989/gya.2002.v53.i3.321>
- Zribi A, Gargouri B, Jabeur H, Rebaï A, Abdelhedi R, Bouaziz M. 2013. Enrichment of pan-frying refined oils with olive leaf phenolic-rich extract to extend the usage life. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **115**, 1443-1453. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201300037>

ARTÍCULO 2

Título: Characterization of olive oils from superintensive crops with different ripening degree, irrigation management, and cultivar: (Arbequina, Koroneiki and Arbosana)

Autores: Alfonso M. Vidal; Sonia Alcalá; Antonia de Torres; Manuel Moya; Francisco Espínola

Publicación: European Journal of Lipid Science and Technology (2019), 121 (4), 1800360

Cuartil: Q2 (Food Science & Technology)

Índice de impacto (JCR 2018): 1,852

Índice de impacto (5 años): 2,207

doi: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejlt.201800360>

Characterization of Olive Oils from Superintensive Crops with Different Ripening Degree, Irrigation Management, and Cultivar: (Arbequina, Koroneiki, and Arbosana)

Alfonso M. Vidal,* Sonia Alcalá, Antonia de Torres, Manuel Moya, and Francisco Espínola

Olive fruit maturation depends directly on the moment of olive harvest. In addition, the composition of extra virgin olive oil changes depending on the ripening degree of the fruit harvested. Likewise, using different olive cultivars in the extraction, the olive oil obtained has different quality and composition. Superintensive crops own special characteristics such as more trees per hectare than traditional crops. This improves the production of olives by surface; being superintensive more profitable than the traditional cultivar. Three different olive cultivars: Arbequina, Koroneiki, and Arbosana, and from superintensive crops with different irrigation management are used for the extraction. Olive oils are extracted at the laboratory with the Abencor system. Monounsaturated fatty acid (MUFA) content is increased by increasing the maturity index. The highest content of phenolic compounds is obtained from rainfed Koroneiki, with approximately 1 g kg^{-1} . The maximum quantity of total lipoxygenase pathway volatile compounds is 28 mg kg^{-1} , obtained in irrigated Arbequina olives. According to the results obtained, the optimum time of harvest is with a maturity index of approximately 2, when the content of oil, phenols, and MUFA reach their maximum. In addition, higher contents of minor components are obtained for rainfed than irrigated crops.

Practical Applications: Determining the optimal stage for harvest the fruit of the olive tree is the main practical application or potential use. Additionally, to predict, approximately, the composition of an olive oil that may have according to some agronomic factors, such as the cultivar used, irrigation management, or the stage of maturation of the olive fruit.

1. Introduction

Virgin olive oil (VOO) is considered a healthy fat owing to its high content of monounsaturated fatty acids (MUFA) and polyunsaturated fatty acids (PUFA), which are beneficial for human health.^[1] Therefore, it is an important element of the Mediterranean diet and widespread oil worldwide.^[2] Volatile and phenolic compounds are responsible for the desirable flavor of extra virgin olive oils (EVOO); therefore, these compounds mainly determine the degree of consumer preference for this highly regarded product.^[3–5] The phenolic and volatile compounds of olive oil are found in the fruit. Thus, variations in the chemical and biochemical composition of olive fruits have a great influence on the resultant oil. Many factors may affect the chemical composition of olive fruits, such as environmental and agronomic factors.^[6]


The agronomic factors, such as cultivation, olive maturation, and irrigation management, as well as the technological factors related to the production process, particularly the stage of malaxation of the olive paste, temperature, time, and dosage of coadjuvant, affect the content of the compounds present in VOO.^[6–9] Some changes in olive are related to its maturation stage, which results in differences in

the composition of olive oils, as well as differences in the phenolic and volatile compounds. Phenolic compounds are directly related to the stability of olive oils owing to their antioxidant properties.^[10] VOO phenolic composition considerably depends on the olive cultivar and ripening degree.^[11] Chemical reactions and activities of enzymes, such as glycosidases, phenol oxidases, and phenol polymerases, are responsible to these differences.^[12]

The Arbequina olive cultivar can easily adapt to high-density cultivation systems and new environmental conditions; besides, its soft taste is highly appreciated. This cultivar is characterized

A. M. Vidal, Dr. S. Alcalá, Prof. A. de Torres, Prof. M. Moya, Prof F. Espínola

Department of Chemical, Environmental, and Materials Engineering
Centre for Advanced Studies in Energy and Environment (CEAEMA)
Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3)
University of Jaén
Campus Las Lagunillas, Edif. B-3, 23071 Jaén, Spain
E-mail: amvidal@ujaen.es

 The ORCID identification number(s) for the author(s) of this article can be found under <https://doi.org/10.1002/ejlt.201800360>.

DOI: 10.1002/ejlt.201800360

by its small size, precocity, high oil yield, good oil quality, and other agronomic characteristics, such as branch flexibility and easy fruit abscission.^[13–15]

The fatty acids (FA) of olive oil showed a significant increase in palmitic acid, stearic acid, linoleic acid, and PUFA contents and a decrease in oleic acid, MUFA contents, and MUFA:PUFA ratio with the delay in harvesting, irrespective of the cultivar.^[16]

The malaxation stage is effective to remove the emulsions formed during the crushing process and facilitate adequate coalescence from olive paste. The coalescence of the droplets into large oil drops could be facilitated by different factors, such as the malaxation time and temperature of the mixer.^[17–19]

In this study, we aimed to evaluate the contents of minor compounds, such as FA, phenolic, and volatile compounds, during the maturation of olives and to predict the optimum stage for harvest.

2. Experimental Section

2.1. Plant Material

Olive fruits (*Olea europaea* L.) were picked up by hand from superintensive crops of El Carpio (Córdoba, Spain). The olive samples were collected in a random way, from different trees and from different rows to obtain a representative sample, from an experimental crop, with different cultivars alternated with each other. The crop had about 500 olive trees of each cultivar, approximately. Between October and December of 2015, 17 samples were harvested. Each sample is composed of approximately 5 kg of olives. Two samples were collected each week, of the same cultivar but with different irrigation management, irrigated, or rainfed. Each sample was from of irrigated and rainfed crops, different cultivars of olive trees: Arbequina, Koroneiki, and Arbosana; and crops with different ripening degrees. To obtain samples with different maturity index (MI), the samples were obtained by alternating between cultivars. MI is a value determined from 100 olives randomly selected from each olive sample. This parameter is a function of fruit color of skin and pulp. The MI was determined according to Uceda, Frías.^[20]

For the Arbosana cultivar, only two irrigated samples were obtained because the olive trees were harvested, and there was no time to harvest more samples. The moisture content was determined by drying the milled paste at 105 °C, and the oil content was determined using the Soxhlet method.

2.2. Olive Oil Extraction

Olive oils were obtained using an Abencor centrifugal system (Abencor analyser, MC2 Ingeniería y Sistemas S.L., Seville, Spain) under laboratory-scale conditions, as previously described by Espínola, Moya, Fernández, Castro.^[21] The extraction conditions for all trials were as follows: malaxation temperature, 30 °C; malaxation time, 60 min; and crusher hole diameter, 5.5 mm. For each sample, five oil samples were obtained. The oils obtained were decanted in a graduated tube for at least 3 h, paper filtered, and stored in amber glass bottles at –18 °C under nitrogen atmosphere until their analyses.

2.3. Analysis of Quality Parameters

The free acidity, peroxide index, and extinction coefficients (K_{232} and K_{270}) were determined for all oil samples, as quality criteria according to EEC.^[22]

2.4. Determination of Volatile Compounds

The determination of volatile compounds were quantified by following the method previously described by Vidal, Alcalá, de Torres, Moya, Espínola.^[23]

2.5. Determination of Phenolic Compounds

Phenolic compounds present in VOO were determined using high-performance liquid chromatography (HPLC), as proposed by the International Olive Council.^[24] A liquid chromatograph (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) was used. A BDS Hypersil C18 column (Thermo Scientific, USA) with a particle size of 5 μm, column size of 25 cm, and internal diameter of 4.6 mm was used. The mobile phase was a ternary gradient composed of orthophosphoric acid-water to 0.2% (A), methanol (B), and acetonitrile (C). The flow rate was 1 mL min⁻¹. The oven temperature was set at 30 °C, and the injection volume was 20 μL. The UV detector provided a signal at a wavelength of 280 nm. The phenolic compounds were quantified via addition of syringic acid as an internal standard and tyrosol as an external standard. The results obtained were expressed as mg of tyrosol per kg of oil. The phenolic compounds were identified through comparison with the analytical standards.

2.6. Determination of Fatty Acids

Determination of FA was performed according to EEC.^[22] The analysis was carried out using a gas chromatograph, model 7890B (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). A capillary column HP-88 (length, 60 m; internal diameter, 0.25 mm; coating, 0.2 μm; Agilent Technologies, CA, USA) was used for chromatographic separation. The carrier gas was helium at a flow rate of 20 cm s⁻¹. The injector temperature was 250 °C. The sample (1 μL) was injected with a 1:100 split mode. The oven temperature was set at 100 °C for 5 min, then increased with a ramp of at 4 °C min⁻¹ to 240 °C and held at 240 °C for 30 min until the end. The FID temperature was 260 °C. A mixture of standard FA was supplied by Supelco (Bellefonte, PN, USA) and used to identify the FA.

2.7. Statistical Analysis

The results were statistically analyzed using the Statgraphics Centurion XVII software (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). This software computed the means and Fisher's least significant differences (Fisher's LSD) for each response analyzed. Several homogeneous groups were identified and designated with different letters. There were no statistically significant differences among those groups that share the same

letter. The method used to discriminate between means is Fisher's minimum significant difference procedure (LSD). A p -value <0.05 was considered statistically significant.

3. Results and Discussion

The samples were characterized and classified as described in Table 1. The results of MI, contents of moisture, oil, and solids in all olive samples are shown in Table 1. The samples had MI ranging between 0 and 3. The quality parameters of all samples were within the limits of EVOO, according to EEC.^[25] Table 1 shows an increase in the oil content with the increase in the MI of the olive samples, suggesting that samples from rainfed crops had a higher percentage of oil than those from irrigated crops. This might be attributed to the higher proportion of moisture present in the irrigated samples than that in the rainfed ones. In contrast, the content of moisture and solids did not follow a definite trend, probably owing to the climatic changes, such as the alternating rain that occurred during olive crop harvest. Expectedly, an increase in oil content was observed when the MI increased.

3.1. Evaluation of Volatile Compounds

The results of individual and total LOX volatile compounds are shown in Table S2, Supporting Information. Samples were classified into rainfed and irrigated crops. The total volatile content is given by the sum of all volatile compounds in the LOX pathway. In general, total LOX volatiles underwent slight

variations throughout the different stages of maturation. Irrigated samples exhibited more total LOX volatiles than rainfed samples. The maximum quantity of total LOX volatiles (28.44 mg kg^{-1}) was found in AI2. The lowest concentration of total LOX volatiles (6.01 mg kg^{-1}) was present in KR2. For the Arbequina cultivar, the total LOX volatile compounds tended to increase when the MI approached 1, and then slightly decreased or remained constant. For the Koroneiki rainfed sample, a decrease of these compounds was observed when increasing the MI. It was a different behavior from the other samples. For the Arbosana rainfed sample, only a small increase in total LOX volatile compound content was observed with the increase in MI. For the irrigated sample no significant differences was observed. It is noteworthy that the content of (*E*)-2-hexenal (sensory attribute of apple green) in the Arbequina cultivar samples was enormous (23.90 mg kg^{-1}), which quadrupled its content in the Koroneiki samples. Our results are consistent with those obtained by Cherfaoui, Cecchi, Keciri, Boudriche,^[26] showing that the contents of volatile compounds and (*E*)-2-hexenal increased, reaching a maximum concentration when the color of olive fruit skin changed from purple to black. By increasing the MI, the content of linoleic and linolenic FA decreased, whereas the volatile compounds of the LOX pathway increased. This might be attributed to the consumption of these two FA, used as substrates for the LOX enzyme present in the olive pulp.^[27]

Figure S1, Supporting Information shows the means and 95% Fisher's LSD values of the content of trans-2-hexenal, the most important volatile compound in EVOO, for all oil samples. The values framed by an ellipse belong to the same cultivar and using the same irrigation management. Samples from irrigated crops

Table 1. Compositional characteristics and maturity index of the processed olives*.

Cultivar	Irrigation management	Samples	Maturity index [MI]	Moisture [%]	Oil [%]	Solids [%]
Arbequina	Rainfed	AR1	0.20	53.72 ± 1.13^a	15.89 ± 0.49^a	30.39 ± 0.68^a
		AR2	1.31	55.88 ± 0.38^b	17.78 ± 0.1^b	26.34 ± 0.39^b
		AR3	2.56	54.96 ± 0.78^b	20.05 ± 0.59^c	24.99 ± 0.81^c
	Irrigated	AI1	0.16	60.93 ± 0.7^c	12.36 ± 0.25^d	$26.71 \pm 0.63^{b,d}$
		AI2	1.11	$61.78 \pm 0.43^{c,d}$	15.13 ± 0.19^e	23.08 ± 0.47^e
		AI3	2.52	$61.96 \pm 0.28^{d,e}$	16.19 ± 0.28^a	21.85 ± 0.23^f
Koroneiki	Rainfed	KR1	0.16	$53.11 \pm 0.85^{a,f}$	16.06 ± 0.18^a	30.82 ± 0.81^a
		KR2	1.68	$53.45 \pm 0.56^{a,f}$	21.73 ± 0.15^f	24.82 ± 0.59^c
		KR3	2.05	52.60 ± 0.59^f	20.41 ± 0.19^c	$26.99 \pm 0.62^{b,d}$
	Irrigated	KI1	0.07	59.91 ± 0.78^g	11.65 ± 0.29^g	28.44 ± 0.83^g
		KI2	0.67	59.03 ± 0.4^g	16.25 ± 0.17^a	24.71 ± 0.53^c
		KI3	2.3	$53.29 \pm 0.56^{a,f}$	19.38 ± 0.34^h	27.33 ± 0.87^d
Arbosana	Rainfed	OR1	0.15	55.38 ± 0.87^b	17.23 ± 0.38^i	27.39 ± 0.65^d
		OR2	0.95	59.89 ± 0.64^g	15.92 ± 0.38^a	$24.19 \pm 0.54^{c,h}$
		OR3	2.11	54.99 ± 0.41^b	21.64 ± 0.17^f	$23.38 \pm 0.54^{e,h}$
	Irrigated	OI1	0.07	63.19 ± 0.32^h	12.67 ± 0.1^d	$24.14 \pm 0.38^{c,h}$
		OI2	0.58	$62.8 \pm 0.54^{e,h}$	14.53 ± 0.3^j	$22.67 \pm 0.58^{e,f}$
		Fisher's LSD			0.94	0.42

* Means of five replicates \pm SD. The letters represent different groups. There were no statistically significant differences among those groups that share the same letter. The method used to discriminate between the means was Fisher's least significant difference (LSD).

exhibited higher values than those of the rainfed ones among the same cultivar. In addition, samples from the same cultivar had similar trends throughout the collection time. *Trans*-2-hexenal have a trend similar than total LOX volatile compounds due to is the most abundant volatile compound. For the Arbequina cultivar, this compound underwent a large increase until AI2 and AR2 samples, and then decreases slightly until AI3 and AR3 samples. For the Koroneiki variety, a slight increase was observed in irrigated sample. On the contrary, there were no significant changes in rainfed sample. No significant variations were detected for the Arbosana cultivar, except for a slight decrease in AR2 sample.

3.2. Evaluation of Phenolic Compounds

The results of individual and total phenolic compound contents are shown in Table S3, Supporting Information. For each cultivar, the total content was determined based on the sum of all phenolic compounds present in the olive oil. The phenolic compounds exhibited different characteristics throughout the time of olive harvest. KR3 contained higher content of phenolic compounds than the other cultivars ($994.76 \text{ mg kg}^{-1}$). However, AI1 had the lowest concentration of phenolic compounds (157 mg kg^{-1}) among all samples. As observed in Figure S2, Supporting Information in general, the total phenol content increases as the MI increases. These results are in line with the findings of Hachicha Hbaieb, Kotti, Valli, Bendini, Toschi, Gargouri,^[11] and Lukić, Žanetić, Jukić Špika, Lukić, Koprivnjak, Brkić Bubola.^[28] It is noteworthy that the maximum content of total phenols was in a MI intermediate for the Arbosana rainfed and Arbequina irrigated, and then phenol content began to decrease when increase the MI.

Analysis of individual phenolic compounds could highlight the beneficial contribution of each sample to human health. Hydroxytyrosol, which has been shown to exhibit a great antioxidant capacity, was found in low amounts in the Arbequina cultivar with low MI value; however, increasing the MI resulted in loss of hydroxytyrosol content. In contrast, the content of the most abundant compounds, 3,4-DHPEA-EDA (oleacein) and p-HPEA-EDA (oleocanthal) increased as MI increased, similar to the total phenol content.

Figure S3, Supporting Information shows the means and 95% Fisher's LSD values of the contents of p-HPEA-EDA (oleocanthal) for all oil samples. The values framed by an ellipse belong to the same cultivar and using the same irrigation management. Oleocanthal is a secoiridoid compound and is very important due to have beneficial properties for human health. For Arbequina irrigated and Arbosana rainfed the maximum content of total phenols was in AI2 and OR2, respectively; then phenol content began to decrease when increase the MI to AI3 and OR3. For all the others samples, the content of this compound increases as MI increases, reaching in some cases to remain constant until the end of MI studied. This behavior is similar to that of the total content of phenols. This demonstrates the great weight of the secoiridoid compounds in the total composition of phenols.

3.3. Evaluation of Fatty Acids

The results obtained from analysis of FA contents are shown in Table S4, Supporting Information. In addition, the sum of

saturated fatty acids (SFA), MUFA, PUFA, and $C_{18:1}/C_{18:2}$ ratio, as well as the relationship between MUFA and PUFA were calculated. The results obtained were within the limits specified by EEC.^[25] In a global analysis of both cultivars, Koroneiki has the lowest SFA content between the cultivars analyzed. Koroneiki has the higher MUFA content, although it has a lower PUFA content than the other cultivars analyzed. On the contrary, Arbequina cultivar has the lowest MUFA content, but it has a higher PUFA content than the other cultivars analyzed.

For the Arbequina cultivar, the highest $C_{18:1}/C_{18:2}$ ratio was found in the irrigated sample with the highest MI value. An increase in MUFA was also observed with the increase in MI. For the Koroneiki cultivar, the highest $C_{18:1}/C_{18:2}$ ratio coincided with that of the Arbequina cultivar, and increased with increasing the MI and irrigation. For the Arbosana cultivar, the highest $C_{18:1}/C_{18:2}$ ratio was found in the rainfed sample with the highest MI; moreover, the irrigated sample followed the same trend but there was no sample with a high MI. Koroneiki irrigated possesses the highest $C_{18:1}/C_{18:2}$ ratio. MUFA content increased with increasing the MI, whereas SFA content decreased. These results are consistent with those reported by Poiana, Mincione^[29] and Fuentes de Mendoza, De Miguel Gordillo, Marín Expósito, Sánchez Casas, Martínez Cano, Martín Vertedor, Franco Baltasar^[30] using different cultivars.

Therefore, it could be concluded that the $C_{18:1}/C_{18:2}$ ratio increased with increasing the MI of samples. In addition, there was a great proportion of SFA at low MI. By increasing the MI of samples, the proportion of MUFA increased, and therefore, the MUFA/PUFA ratio increased. A high $C_{18:1}/C_{18:2}$ ratio is considered an advantage since it is a stability parameter, indicating oxidative stability.^[31]

Figure S4, Supporting Information shows the means and 95% Fisher's LSD values of the contents of a) oleic, b) linoleic, and c) linolenic acids for all oil samples. Oleic acid is the most abundant FA in EVOO, whereas linoleic and linolenic acids are two essential PUFA. All samples had a significant increase in the content of oleic acid when increase the MI, except KR2 and AR2 that decrease with respect KR1 and AR1, respectively. In addition, its content was varied according to the cultivar used. Koroneiki cultivar possessed a content of oleic acid higher than the others cultivars analyzed. In contrast, the contents of linoleic and linolenic acids decreased with the increase in MI. This could be attributed to the continuous changes in FA contents over time and according to the environmental conditions and cultivar.^[32] All samples had a significant decrease in the content of linoleic acid, except AR2 and KR2 samples that increase their content. Also, between KR1 and KR3, and OI1 and OI2 had no significant differences. Relating to the linolenic acid content, it is noteworthy a great decrease in its content between samples 2 and 3.

4. Conclusions

The composition of VOO varied according to the cultivar, fruit ripening stage, and irrigation management (rainfed or irrigated). The results obtained of the characterization of the olive oil samples demonstrated that each cultivar possesses singular characteristics in its composition.

For the volatile compounds, Arbequina olives from irrigated crops showed the maximum total LOX volatile content (28.44 mg kg⁻¹), whereas Koroneiki rainfed crops had the lowest concentration (6.01 mg kg⁻¹). Overall, the content of phenolic compounds was higher in the rainfed samples, with the maximum content present in the Koroneiki cultivar (994.76 mg kg⁻¹). For FA, Koroneiki possess the highest MUFA content and the lowest SFA content. MUFA content tended to increase with increasing the MI of fruits, which is considered advantageous for VOO composition.

Therefore, we concluded that it would be better to harvest the fruits at a MI of approximately two from rainfed crops, when the phenolic compound, MUFA, and oil contents are expected to reach the maximum values and the fruits are still on the tree before falling to the ground, which keeps their properties intact.

Abbreviations

3,4-DHPEA-EA, aldehyde and hydroxylic forms of oleuropein aglycone; 3,4-DHPEA-EDA (oleacein), dialdehyde form of decarboxymethyl oleuropein aglycone; EVOO, extra virgin olive oil; FA, fatty acids; LSD, least significant difference; MI, maturity index; MUFA, monounsaturated fatty acid; p-HPEA-EA, aldehyde and hydroxylic forms of ligstroside aglycone; p-HPEA-EDA (oleocanthal), dialdehyde form of decarboxymethyl ligstroside aglycone; PUFA, polyunsaturated fatty acid; SFA, saturated fatty acid; VOO, virgin olive oil.

Supporting Information

Supporting Information is available from the Wiley Online Library or from the author.

Acknowledgements

The authors are grateful to the Department of Economy, Innovation and Science of the Andalusian Regional Government for the financial help provided through Research Project of Excellence PI11-AGR-7726. The authors would also like to acknowledge *Todolivo* S.L. and all their staff for their kindness and attention. The technical and human support provided by CICT of Universidad de Jaén (UJA, MINECO, Junta de Andalucía, FEDER) is also gratefully acknowledged.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Keywords

composition progress, extra virgin olive oil, irrigation, maturity index, super high density orchards

Received: August 21, 2018

Revised: December 29, 2018

Published online: February 26, 2019

[1] E. N. Frankel, *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 785.

- [2] F. Visioli, E. Bernardini, *Curr. Pharm. Des.* **2011**, *17*, 786.
- [3] F. Angerosa, M. Servili, R. Selvaggini, A. Taticchi, S. Esposto, G. Montedoro, *J. Chromatogr. A* **2004**, *1054*, 17.
- [4] A. Gómez-Rico, G. Fregapane, M. D. Salvador, *Food Res. Int.* **2008**, *41*, 433.
- [5] A. Genovese, N. Caporaso, V. Villani, A. Paduano, R. Sacchi, *Food Chem.* **2015**, *181*, 284.
- [6] C. M. Kalua, M. S. Allen, D. R. Bedgood, Jr, A. G. Bishop, P. D. Prenzler, *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8054.
- [7] N. Romero, J. Saavedra, F. Tapia, B. Sepúlveda, R. Aparicio, *J. Sci. Food Agric.* **2015**, *96*, 583.
- [8] A. de Torres, F. Espínola, M. Moya, E. Castro, *Eur. Food Res. Technol.* **2016**, *242*, 1709.
- [9] A. de Torres, F. Espínola, M. Moya, S. Alcalá, A. M. Vidal, E. Castro, *LWT – Food Sci. Technol.* **2018**, *90*, 22.
- [10] M. N. Franco, T. Galeano-Díaz, J. Sánchez, C. De Miguel, D. Martín-Vertedor, *Grasas Aceites* **2014**, *65*, 1, e004.
- [11] R. Hachicha Hbaieb, F. Kotti, E. Valli, A. Bendini, T. G. Toschi, M. Gargouri, *J. Food Compos. Anal.* **2017**, *62*, 43.
- [12] K. Yousfi, R. M. Cert, J. M. García, *Eur. Food Res. Technol.* **2006**, *223*, 117.
- [13] M. M. Torres, P. Pierantozzi, M. E. Cáceres, P. Labombarda, G. Fontanazza, D. M. Maestri, *J. Sci. Food Agric.* **2009**, *89*, 523.
- [14] D. P. Rondanini, D. N. Castro, P. S. Searles, M. C. Rousseaux, *Grasas Aceites* **2011**, *62*, 399.
- [15] K. Yousfi, C. M. Weiland, J. M. García, *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 4743.
- [16] B. Alowaiesh, Z. Singh, Z. Fang, S. G. Kailis, *Sci. Hortic.* **2018**, *234*, 74.
- [17] A. Gómez-Rico, A. M. Inarejos-García, M. D. Salvador, G. Fregapane, *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3587.
- [18] M. L. Clodoveo, *Trends Food Sci. Tech.* **2012**, *25*, 13.
- [19] A. Tamborrino, G. Squeo, A. Leone, V. M. Paradiso, R. Romaniello, C. Summo, A. Pasqualone, P. Catalano, B. Bianchi, F. Caponio, *J. Food Eng.* **2017**, *205*, 34.
- [20] M. Uceda, L. Frías, Proceeding of the 2nd International Meeting of Olive Oil, Córdoba, Spain. **1975**, pp. 125–128.
- [21] F. Espínola, M. Moya, D. G. Fernández, E. Castro, *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 2576.
- [22] EEC: European Commission Regulation 2568/1991. **1991**, *L248*, 1–83.
- [23] A. M. Vidal, S. Alcalá, A. de Torres, M. Moya, F. Espínola, *LWT – Food Sci. Technol.* **2018**, *98*, 31.
- [24] IOC: Determination of biophenols in olive oils by HPLC. COI/T.20/Doc No 29/Rev 1. **2017**.
- [25] EEC: European Commission Regulation 2095/2016, amending Regulation (EEC) No 2568/91. **2016**, *L326*, 1–6.
- [26] M. Cherfaoui, T. Cecchi, S. Keciri, L. Boudriche, *Int. J. Food Prop.* **2018**, *21*, 36.
- [27] J. J. Salas, M. Williams, J. L. Harwood, J. Sánchez, *JAOCs J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, *76*, 1163.
- [28] I. Lukić, M. Žanetić, M. Jukić Špika, M. Lukić, O. Koprivnjak, K. Brkić Bubola, *Food Chem.* **2017**, *232*, 610.
- [29] M. Poiana, A. Mincione, *Grasas Aceites* **2004**, *55*, 282.
- [30] M. Fuentes de Mendoza, C. De Miguel Gordillo, J. Marín Expósito, J. Sánchez Casas, M. Martínez Cano, D. Martín Vertedor, M. N. Franco Baltasar, *Food Chem.* **2013**, *141*, 2575.
- [31] E. Stefanoudaki, A. Koutsaftakis, F. Kotsifaki, *Acta Hort.* **1999**, *474*, 671.
- [32] D. P. Rondanini, D. N. Castro, P. S. Searles, M. C. Rousseaux, *Eur. J. Agron.* **2014**, *52*, 237.

ARTÍCULO 3

Título: Elaboration of virgin olive oils rich in the bioactive compounds oleocanthal and oleacein. Proposal for separation at pilot plan level

Autores: Alfonso M. Vidal; Sonia Alcalá; María Teresa Ocaña; Antonia de Torres; Francisco Espínola; Manuel Moya

Publicación: (Enviado) Food Chemistry (2019)

Cuartil: Q1 (Food Science & Technology)

Índice de impacto (JCR 2018): 5,399

Índice de impacto (5 años): 5,488

Elaboration of virgin olive oils rich in the bioactive compounds oleocanthal and oleacein. Proposal for separation at pilot plan level

Alfonso M. Vidal^a, Sonia Alcalá^a, María Teresa Ocaña^b, Antonia De Torres^a, Francisco Espínola^a, Manuel Moya^a, ✉

^a Centre for Advanced Studies in Energy and Environment (CEAEMA). Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3). Department of Chemical, Environmental, and Materials Engineering. University of Jaen, 23071 Jaen, Spain.

^b Department of Didactic of Sciences. University of Jaen, 23071 Jaen, Spain.

✉ Corresponding author: mmoya@ujaen.es

Abstract

Oleocanthal and oleacein are bioactive compounds with proven activities in the treatment of various diseases. For alimentary use, the oils must be aromatic and healthy, without being overly pungent or bitter.

By applying response surface methodology, oils of the Arbequina, Arbosana, and Koroneiki cultivars of super-intensive olive trees have been elaborated, under both irrigation and rainfed conditions.

Rainfed Arbequina olives, contained both volatile and phenolic compounds (18.5 and 514.4 mg/kg, respectively; with 249.3 mg/kg of oleacein and 92.3 mg/kg of oleocanthal).

The Koroneiki cultivar was found to have a low content of volatile compounds and a high content of phenolic compounds. The factors that maximized the content of phenolic compounds (1307.2 mg/kg) were a 4.5 mm sieve, and malaxation at 40 °C for 30 min. At this maximum, oils contained 500.0 mg/kg of oleacein and 174.3 mg/kg of oleocanthal.

Keywords

Total phenols, oleocanthal, oleacein, volatile compounds, extra virgin olive oil, response surface methodology

Chemical compounds

Oleocanthal (PubChem CID: 11652416)

Oleacein (PubChem CID: 18684078)

DPPH (PubChem CID: 2735032)

Abbreviations

AC: Antioxidant capacity (DPPH), $\mu\text{mol Trolox/kg oil}$

DPE: Dry phenolic extracts

ER: Extraction ratio, $\text{g oil/100 g solids}$

EVOO: Extra virgin olive oil

EthAc: Ethyl acetate

EtOH: Ethanol

FCPC: Fast centrifugal partitioning chromatography

Hex: Hexane

MI: Maturity index

MP: Mobile phase

OC: Oleacein content, mg/kg

OLCT: Oleocanthal

OLCN: Oleacein

OR: Oil/solids ratio in olives, $\text{g oil/100 g solids}$

RDI: Regulated deficit irrigation

RSM: Response surface methodology

SP: Stationary phase

VOO: Virgin olive oil

W: Water

1. Introduction

The olive tree (*Olea europaea* L.) is one of the most important crops in Mediterranean countries, especially in Spain, Italy, and Greece. Olive oil is a genuine fruit juice, with excellent nutritional, sensory, and functional qualities, obtained from the fruit of olive trees. The benefits of olive oil to human health have been associated with its well-balanced fatty acid composition, of which oleic acid is the major component, and the presence of minor biomolecules, such as vitamins and natural antioxidants (Benito et al., 2013). Biophenols in VOOs are beneficial in the treatment of inflammation, cardiovascular diseases, cancer, atherosclerosis, microbial activity, and cellular oxidative stress (Tripoli, Giammanco, Tabacchi, Di Majo, Giammanco & La Guardia, 2005, Rigacci & Stefani, 2016, Presti et al., 2017, Lopes de Souza, Marcadenti & Portal, 2017, Gorzynik et al., 2018).

Scientific interest in phenolic compounds in foods has recently increased, due to their possible beneficial implications for human health (Fratoddi, Rapa, Testa, Venditti, Scaramuzzo & Vinci, 2018). The high concentration of phenolic compounds in olive oils may contribute to the health impacts of the Mediterranean diet. Phenolic compounds have key fundamental chemical and antioxidant properties. They have been reported to significantly prevent the oxidation of olive oil because they possess antioxidant capacity (Franco, Galeano-Díaz, Sánchez, De Miguel & Martín-Vertedor, 2014).

According to Miho et al. (2018), a remarkable variation in phenolic compounds was found in a set of monovarietal VOOs. Genotype was the main factor that contributed to this variability, with a total variance between 83 and 97%. Phenols of the secoiridoids group were the most abundant among each of the monovarietal VOOs and were majorly responsible for the healthy characteristics of the oils. Differences in the phenolic profiles of the VOOs allowed the detection of two independent pathways for the metabolism of oleuropein and ligstroside, through participation of enzymes such as dimethyl-terases and β -glucosidases. According to European Union Regulations (EEC, 2012), polyphenols in olive oil contribute to the protection of blood lipids against oxidative damage.

Oils rich in oleocanthal facilitate the treatment of Alzheimer's disease by improving cognitive function in patients (Batarseh & Kaddoumi, 2018). Oleocanthal has therapeutic properties in the treatment of cancer, inflammation, and neurodegenerative diseases (Scotece et al., 2015), and has cardiovascular benefits (Agrawal et al., 2017). Oleacein is beneficial for the treatment of hypertensivity (Filipek, Czerwińska, Kiss, Polański & Naruszewicz, 2017), and due to its antioxidant and anti-inflammatory capacity, it is useful in the treatment of inflammatory diseases such as atherosclerosis (Filipek, Czerwińska, Kiss, Wrzosek & Naruszewicz, 2015).

Regulated deficit irrigation (RDI) involves a temporary and controlled water deficit during a specific phenological stage. RDI is commonly used for several types of fruit trees in order to reduce the amount of water applied, with minimal or no reduction in fruit production (Grijalva-Contreras, Macías-Duarte, Martínez-Díaz, Robles-Contreras, Valenzuela-Ruiz & Nuñez-Ramírez, 2013). One of the most significant changes that is currently occurring in olive tree cultivation is the expansion of irrigated orchards. Although it is well-known that lack of water decreases yield and fruit size, there is evidence that controlling the degree of water deficit by supplying reduced volumes of irrigation water has limited negative effects on oil yield. Strategies using RDI have been proposed to optimize water use in olive growing (Servili et al., 2007).

In general, olive oils from crops with deficit irrigation treatment have higher contents of phenolic compounds and stability than those of the irrigated ones (Motilva, Tovar, Romero, Alegre & Girona, 2000, García, Morales-Sillero, Pérez-Rubio, Diaz-Espejo, Montero & Fernández, 2017).

Deficit irrigation of olive trees appears to be beneficial not only for its well-known positive effects on water use efficiency, but also for optimizing VOO quality. The changes in VOO phenolic and volatile composition induced by manipulating tree water statuses during fruit development imply that irrigation can play a key role in improving the nutritional and sensory quality of VOO. Appropriate volumes of irrigation water can be used to optimize the phenolic and volatile compound concentrations in VOO. In addition, optimization of the sensory characteristics of

VOO appears to be critical for meeting consumer demands and marketing strategies. The responses of different cultivars to irrigation were generally consistent among studies.

Our study provides further evidence of the direct effects of deficit irrigation regimes on qualitative parameters of olive oil, specifically the volatile and phenolic composition of VOO. Currently, the concept of quality is mainly based on the sensory and health-related properties of VOO, which are closely related to the concentration and composition of the volatile and phenolic fractions of the oil, respectively (Servili et al., 2007).

Given the beneficial effects that oleacein and oleocanthal have on health and in the treatment of some diseases, synthesis procedures have been developed using various organic compounds (Smith, Sperry & Han, 2007, English & Williams, 2009, Vougianniopoulou et al., 2014, Valli, Peviani, Porta, D'Alfonso, Zanoni & Vidari, 2013, Costanzo, Bonacci, Cariati, Nardi, Oliverio & Procopio, 2018). Recently, technologies have been developed to extract oleacein and oleocanthal as natural products from olive oils. Wen, Jiang, Zhu, Yi, Li & Yong (2015), proposed an extraction of oleocanthal by mixing olive oil with water and starch, using a propane-dimethyl ether mixture, and subcritical extraction with absolute ethanol. Adhami et al. (2015), proposed a method for obtaining oleocanthal, hydroxytyrosol, and tyrosol based on the use of high-performance countercurrent chromatography (HPCCC) with a solvent mixture of hexane and methanol. Angelis et al. (2017), used liquid-liquid extraction and chromatographic techniques to obtain phenolic compounds from oils. Similar to Angelis et al. (2017), Ortega Vidal, Vidal Castro, Espínola Lozano, Moya Vilar, Salido Ruiz & Altarejos Caballero (2019), proposed obtainment of oleocanthal and oleacein from olive oil by fast centrifugal partition chromatography (FCPC), and subsequent semi-preparative high-performance liquid chromatography (HPLC). These authors have proposed the process of scaling up the extraction process of obtainment of oleocanthal and oleacein on a semi-industrial scale.

The objective of this work was to obtain healthy EVOOs with high sensor quality and/or high antioxidant capacity and phenolic content (oleacein and oleocanthal),

through analysis of olive cultivars, agronomic factors (e.g. levels of irrigation and maturation status), and operating conditions, for use in foods and as potential sources of oleocanthal and oleacein.

2. Materials and Methods

2.1 Raw materials

Olives (*Olea europaea L.*) were harvested by hand from super-intensive rainfed and irrigated crops in El Carpio (Córdoba, Spain). Different cultivars of olive trees: Arbequina, Koroneiki, and Arbosana, with differing degrees of ripening were harvested. Between October and December 2017, 17 samples were collected of approximately 10 kg of olives each. Two samples were collected each week, having the same cultivar but different irrigation management, irrigated versus rainfed. To ensure variation in maturity index (MI) was significant amongst samples from the same cultivar of olives, the collection of samples between the different cultivars studied was alternated. The last olive sample for the cv. Arbosana irrigated, was not possible to collect from the trees because it had already been transported to the oil mill. The maturity index (MI) values were determined according to a method by Uceda and Frías, that was developed for olives of the cv. Picual, reported by Espínola, Moya, Fernández & Castro (2009). The olives were harvested with degrees of maturation between 0 and 3 (all green olives), with some being intensely green and others starting to ripen, but not reaching the "envero" (olive color change) MI = 3.5. The moisture content was determined using a stove at 105 °C until constant weighing, and the oil content was determined by the Soxhlet method. All samples of olives were divided into three portions that were analyzed individually.

Table 1 lists each of the olive samples collected along with a key, their maturity index, degree of irrigation, moisture, oil content in dry basis, and relationship between oil content and solids. The values shown are the average values of the analyses along with their standard deviations. The error propagation theory was applied to calculate non-initial data errors.

2.2 Olive oil extraction

Olive oils were obtained using a small oil mill (Abencor centrifugal system) that operates using a discontinuous process, allowing a high level of control over the process variables (Espínola, Moya, Fernández & Castro, 2011). The milled oils were decanted into test tubes, allowed to sit for at least three hours to ensure phase separation, paper filtered, and then stored in an inert atmosphere at -18 °C in opaque glass jars until analysis. The extraction yield was determined as the difference between the oil contained in the olive paste minus the oil retained in the pomace, expressed as the percentage of oil obtained from the total oil in the starting olives (extraction efficacy).

2.3 Analytical methods

The free acidity, peroxide index, and extinction coefficient K_{270} , which were used as quality criteria, were determined for each of the oil samples according to the standardized method of the European Union (EEC, 1991).

A method proposed by the International Olive Council (COI/T.20/Doc No 29/Rev 1, 2017) was used to determine the phenolic compounds present in the VOOs via high-performance liquid chromatography (HPLC). The phenolic compounds were identified through comparison with analytical standards and expressed in mg/kg of oil. The antioxidant capacity was determined as a DPPH free radical scavenging capacity and expressed in $\mu\text{mol Trolox/kg oil}$. To determine the influence of each factor on the contents of the volatile compounds in the oils, only those compounds which are part of the lipoxygenase route (LOX pathway) were determined, quantified in total, and expressed in mg/kg of oil. All analytical methods used have been described previously (Vidal, Alcalá, de Torres, Moya & Espínola, 2018).

2.4 Experimental design and statistical analysis

For the design of the experiments carried out for each sample of olives, and the subsequent analyses of their results, statistical software "Design Expert" v8.0.7.1 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA) was used. By means of the statistical design of experiments (SDE), an experimental series was designed and applied to each

sample of olives individually. A three-factor Box-Behnken design, with 5 central and 12 factorial points, was carried out, and the experimental results were analyzed using response surface methodology (RSM). According to Ferreira et al. (2007), the Box-Behnken design is slightly more efficient than the central composite design, and much more efficient than the full three-level factorial design. Application of RSM facilitates the evaluation of the results and generates reliability of the conclusions. In total, 289 tests were carried out, with all tests resulting in oil obtainment and subsequent analysis. The three design factors tested were the sieve hole diameter of the hammer mill (hole diameter), and the temperature and time of malaxation. The ranges of variation in these factors were between 4.5 and 6.5 mm, 20 and 40 °C, and 30 and 90 min, respectively. Values were defined as coded factors (-1, +1), for the lower and upper limits, respectively, and 0 for the central point. Execution of the tests was carried out randomly to eliminate repetition errors.

Applying RSM, the experimental results were correlated to Equation 1:

$$Y = \beta_0 + \beta_1A + \beta_2B + \beta_3C + \beta_{12}AB + \beta_{13}AC + \beta_{23}BC + \beta_{11}A^2 + \beta_{22}B^2 + \beta_{33}C^2 \pm SD \quad (1)$$

where Y is the response, A is the hole diameter, B is the temperature, and C is the time, in coded factors, and SD is the standard deviation. Equation 1 was applied to all oils obtained and all analyzed parameters (responses). By the analysis of variance (ANOVA), the validity of the obtained models was determined. The statistics used were the p-value of the model (p-value model), the lack of fit of the model to the responses (lack of fit), the coefficient of determination (R^2), the standard deviation of the results predicted by the model (SD), and the coefficient of variation or relative error as a percentage (CV).

For each oil sample, 13 models were determined, which allowed a relationship between the responses from the factors of operation and the cultivar and degree of maturation of the olives to be established. The responses adjusted to the models were extraction efficacy, acidity, peroxide index, and K_{270} , acting as quality criteria; phenolic alcohols (tyrosol + hydroxytyrosol), flavonoids (luteolin + apigenin), lignans (acetoxypinoresinol + pinoresinol), oleacein, oleocanthal, secoiridoids (total secoiridoids: olocanthal + oleacein + p-HPEA-EA + 3,4-DHPEA-EA), total

phenols, antioxidant capacity (DPPH), and total LOX (all the compounds of the LOX pathway). A total of 221 models were obtained, allowing evaluation of extraction yield, quality of the oils, content of the minor compounds (mainly the secoiridoids oleacein and oleocanthal), and antioxidant capacity. All models were valid (p-value model <0.01 and lack of fit >0.1). For all models, non-significant terms were eliminated (p-value >0.1) and SD, R², and CV were indicated.

3. Results and Discussion

As seen in Table 1, for the characterization of the 17 olive samples used, the moisture contents are approximately 7% higher for the irrigated olives than for the rainfed ones, under similar maturity index (MI) and climate conditions. Conversely, the contents of oil on a dry basis, as an oil/solid ratio (OR), are higher for rainfed olives (Table 1 and Figure 1). The standard deviation shown in Table 1, and the error corresponding to the whiskers of the bars in Figure 1, were determined by applying the error propagation theory. In all cases, advancement of maturation led to an increase in the total oil content. However, it should be noted that the olives maintained their green color and had not yet begun the color change signifying the end of lipogenesis.

For each processed olive sample, 17 oils were obtained, with 12 responses determined, plus extraction efficacy. In total, 221 results were processed with the Design Expert software, enabling 13 models per sample to be obtained. For the 17 olive samples and oils analyzed, 3757 results were obtained, and were grouped into 221 models. All models were significant and had no “lack of fit”. All non-significant terms were eliminated according to ANOVA. Table 2a, provides an example result from a KR2 olive sample. Table 2b shows the models obtained for this sample, along with standard deviations and statistical parameters. All models presented good R² and CV values, showing they reproduce the experimental results to a close approximation, with small, acceptable errors. As exemplified by Table 2b, a table of models was generated for each of the olive samples.

The software used allowed: determination of the values of the factors that made one or more simultaneous responses maximum or minimum, more weight to be

added to one or more responses, and limitation or fixing of the range of variation of the factors. To do this, Design Expert creates an objective function (called desirability) that is the factor that will be optimized. The results of the operation are the values of the factors that allow the responses to be determined, which must comply with the imposed conditions. By grouping the models by olive sample type and setting an optimum response, the value of the response and the rest of the responses that define the characteristics of the oil based on olive type can be determined. Based on the factors desired, being obtaining more oil, higher quality oil, or oil containing more phenols and/or more volatiles, the cultivar of olives, their state of maturation, and the technological factors required for their elaboration should be prefixed. This is further discussed in terms of the specific models obtained for the olive samples.

3.1. Extraction efficacy

The first response factor to be optimized was extraction efficacy, with the objective of determining the best operating conditions that enable maximum oil obtainment. Based on experimental results, it was determined that the most important factor for maximum oil obtainment was the time of malaxation, which must be long (90 min). Low influence factors were found to be the malaxation temperature (values between 25 and 32 °C are recommended), although an increase in temperature slightly increased the yield, and the hole diameter, whose optimum value range was between 5.5 and 6 mm. Prefixing the factors that enable maximum extraction efficacy impose characteristics on the oils that the models predict, of which the quality parameters and content of the minority components are fixed.

The extraction efficacy (g oil/100 g total oil in the olives) can be transformed into the extraction ratio (ER) (g oil/100 g solids in the olives), by multiplying the former by the ratio of the oil (OR) in the corresponding olive sample. Figure 1 shows the maximum ER and standard deviation for each olive sample (solid line), expressed as the amount of oil extracted per 100 g of solids. Additionally, this figure shows the close relationship between OR and ER, with an increase in one leading to an increase in the other. Therefore, both the OR and ER increase with maturity index, decrease with olive moisture, and increase from irrigated to

rained. By adjusting the data shown in Figure 1 by least squares, the line shown in Equation 2 is obtained, with units of g oil/100 g solids.

$$ER = -8.38 + 0.890 \cdot OR \pm 2.21 \quad (2)$$

This equation adjusts the maximum extraction yield of each of the olive samples well, providing an $R^2 = 0.975$. Equation 2 indicates, that as long as difficult pastes are not formed, extraction is independent of olive cultivar and the state of olive maturity. According to Equation 2, oil can only be extracted ($ER > 0$) when it has a minimum quantity of 9.42 g oil/100 g solids in olives (8.61% dry weight). Additionally, the slope represents the maximum extraction yield that can be obtained using malaxation and centrifugation in a single stage. This maximum is 89.0% of the total olive oil, which indicates that the remaining 11.0% is lost in the pomace. For the example olive sample KR2, the minimum oil in the pomace was 2.68% (on a wet basis) or 7.68% (on a dry basis), which is similar to the value indicated by the ordinate of Equation 2. In our work, the extraction maximum was 8 percentage points lower than the predicted maximum, having an extraction efficacy of 80.57%. To increase the extraction of olive oil, decanters with high centrifugal fields, which are technologically and economically limited, or technological coadjuvants can be used to facilitate the operation (Ben Brahim, Marrakchi, Gargouri & Bouaziz, 2015, Squeo, Silletti, Summo, Paradiso, Pasqualone & Caponio, 2016, Tamborrino et al., 2017, Moya, Alcalá, Ocaña, Vidal & Espínola, 2018). At present, new technologies are being developed which, acting on the process of malaxation, allow increased extraction yields and stability of oils. Thus, the use of high pressure, electric pulses, microwaves, and ultrasound are being investigated (Clodoveo & Hachicha Hbaieb, 2013, Andreou et al., 2017).

In terms of quality parameters, under operating conditions, no appreciable influence was observed regarding technological factors, the cultivar of olives, or their state of maturation. Only temperature, at its upper limit, showed a slight increase in peroxide content and K_{270} . For quality purposes, all oils obtained meet the criteria of extra virgin olive oil (EVOO) according to EEC (2016).

3.2. Minority compounds and antioxidant capacity

In the production of extra virgin olive oil, high extraction yields and high quality are pursued. Almost more important than quantity is the quality of the oil, an oil's most important quality lies in its content of minority compounds. These compounds are responsible for an oil's pungent and bitter flavor, and fragrance (Miho et al., 2018). Oleocanthal (p-HPEA-EDA) is responsible for the pungent attribute of oils, while the bitter attribute is due to oleacein (3,4-DHPEA-EDA) together with 3,4-DHPEA-EA and p-HPEA-EA (Servili et al., 2013). Olive oil has the right proportion of fatty acids for a healthy diet. Its phenol content signifies it as a healthy food (EEC, 2012), and its antioxidant capacity and prevention of certain diseases make it a favorable dietary product.

Using models for total phenolic compounds, the factors that maximized their content in oils were determined for each of the olive samples. Almost entirely, the maximum content of total phenols corresponded to extreme values of the factors. These values were the smallest hole diameter (4.5 mm), the highest malaxation temperature (40 °C), and the shortest time (30 min of malaxation). Regarding the agronomic factors, it was observed that in the rainfed oils the content of total phenols was greater than that in the irrigated oils, with increases observed with fruit ripening. The exception was the cv. Arbosana from dry land, that showed a maximum maturity index of 0.95, which suggested that this cultivar matures at a slower rate than that of the other cultivars studied.

The maxima total phenols obtained for the olives of the cv. Arbequina were 293.7 ±8.2 and 653.0 ±16.3 mg/kg for irrigated and rainfed olives, respectively. The contents of oleacein were 99.7 ±3.7 and 371.2 ±13.8 mg/kg and oleocanthal were 61.5 ±1.6 and 104.0 ±1.8 mg/kg, respectively. For the cv. Koroneiki, the maxima total phenols were 641.4 ±14.8 and 1307.2 ±21.5 mg/kg for irrigated and rainfed olives, respectively. The contents of oleacein were 290.5 ±4.8 and 500.0 ±7.1 mg/kg and oleocanthal were 129.15 ±2.9 and 174.3 ±5.2 mg/kg, respectively. It is noteworthy that the content of phenolic compounds in the oils of the cv. Koroneiki, specifically the rainfed olives, was high, making it suitable for use as a source of the bioactive compounds, oleocanthal and oleacein. For the cv. Arbosana, the maxima

total phenolic compounds were 370.4 ± 12.8 and 983.8 ± 19.4 mg/kg for irrigated and rainfed olives, respectively. The contents of oleacein were 108.3 ± 5.4 and 541.8 ± 6.8 mg/kg and oleocanthal were 68.3 ± 1.7 and 186.2 ± 3.4 mg/kg, respectively. In summary, the cv. Arbequina had the lowest content of phenols and secoiridoids, oleacein and oleocanthal, the cv. Koroneiki had the highest content of phenols, and the cv. Arbosana also contained high levels of the secoiridoids of interest.

Regarding antioxidant capacity, the models predict that the factors that maximize this response correspond to the same factors that maximize the total content of phenolic compounds. Correspondingly, the antioxidant capacity of the oils increased with fruit ripening, and from irrigation to rainfed olives. This is exemplified by the greater antioxidant capacity of oils from the rainfed cv. Koroneiki of olives (3774.3 ± 62.2 $\mu\text{mol Trolox/kg}$). Despite the correspondence between these factors, there was no clear relationship between antioxidant capacity and total phenol content, suggesting that some of the phenolic compounds were not antioxidants, or their capacities were very low compared to those of other compounds.

We maximized for groups of phenolic compounds that are high in content in oils (e.g. lignans and secoiridoids). For phenolic alcohols and flavonoids, only their dependence on the study factors was considered. These factors were not optimized, so the compounds were only quantified at the optima of other responses. Thus, the maximum for lignans was determined for short time values (30 min), low temperatures (20 °C), and medium-high hole diameters (5.5–6 mm), although the last two factors had a small to insignificant influence. The secoiridoid group of phenolic compounds, being the most important in oils, was optimized as a whole and individually for its two most important compounds, oleacein and oleocanthal. The maximum for secoiridoids (oleacein and oleocanthal) was determined in oils obtained with small sieves (hole diameters of 4.5 mm), although this factor was not significant, and above all, low malaxation times and high temperatures. Figure 2 shows the content of secoiridoids, oleacein and oleocanthal, with their standard deviations, calculated for the values of the factors that maximized the content of the secoiridoids in the oils. Additionally, it can be

seen that the content of phenols increases with maturation of the olives (except for the cv. Arbosana which has a greater MI), and in the rainfed crops. The cv. Koroneiki olives had the highest content of secoiridoids and oleacein, 1059.4 ± 36.8 and 554.8 ± 7.1 mg/kg, respectively. For oleocanthal, the maximum was obtained for the rainfed cv. Arbosana. However, it is thought that this result is inaccurate because neither the amounts of secoiridoids nor oleacein were greater for the cv. Arbosana than for the cv. Koroneiki; therefore, the value obtained was assumed as the maximum for the rainfed cv. Koroneiki, 167.4 ± 5.2 mg/kg. The antioxidant capacity was correlated to the content of secoiridoids and oleacein, and it was determined that the best adjustment, and thus the highest antioxidant capacity, corresponded to oleacein. Equation 3 ($R^2 = 0.958$) shows the linearization of the antioxidant capacity (AC) versus the oleacein content (OC) of the oils.

$$AC = -108.5 + 5.85 \cdot OC \pm 228.4 \quad (3)$$

Ramos-Escudero, Morales & Asuero (2015), indicated that the AC of olive oil is related to the content of phenolic compounds, especially secoiridoids in their dialdehydic forms. Generally, the antioxidant capacity of phenols is concentrated in the secoiridoid group, mainly in oleacein (Czerwińska, Kiss & Naruszewicz, 2012).

Equivalently, the oils were also optimized with respect to their total volatile content of the lipoxygenase pathway, with maxima corresponding to low hole diameters and malaxation times, although these factors were not very significant, and very low temperatures. For volatile compounds, the maxima did not change appreciably with ripening, and only for the irrigated cv. Arbequina was there an increase with MI. For the three cultivars studied, the maxima corresponded to irrigated olives. Figure 3 shows the contents of total volatile compounds of the LOX pathway, the maxima responses, and the contents of total phenolic compounds, determined for optimal responses of the factors. As can be seen in Figure 3, the cv. Arbequina of irrigated olives is rich in volatile compounds and poor in phenolic compounds (total LOX 35.0 ± 0.6 , oleacein 89.2 ± 3.7 , oleocanthal 62.2 ± 1.6 , and total phenols 231.5 ± 8.2 mg/kg). Conversely, for the rainfed olives, a decrease in the former, and an increase in the latter compounds, made the oils more balanced (total LOX 18.5 ± 0.6 , oleacein 249.3 ± 13.8 , oleocanthal 92.3 ± 1.8 , and total phenols

514.4 ±16.3 mg/kg). Similar results occurred with olives of the cv. Arbosana, with the difference that irrigation had on the volatile compounds being smaller, and the phenolic compounds being larger. The cv. Koroneiki was rich in phenolic and poor in volatile compounds, so the most balanced oils were irrigated (total LOX 10.4 ±0.3, oleacein 172.7 ±4.8, oleocanthal 73.0 ±2.9, and total phenols 464.4 ±14.8 mg/kg), although the content of volatile compounds in this cultivar was lower than that in the other cultivars when rainfed. The oils of the rainfed cv. Koroneiki were the richest in phenolic compounds (total LOX 7.4 ±0.2, oleacein 366.5 ±7.1, oleocanthal 55.7 ±5.2, and total phenols 764.2 ±21.5 mg/kg). The data presented corresponds to the values of the factors that maximized the content of volatile compounds.

Figure 4 shows a scaling proposal for the oleocanthal and oleacein extraction method that we developed in the laboratory. The olive oil was subjected to extraction with an ethanol-water mixture (EtOH-W 4:1). The extractor phase was dried under vacuum, and the dry phenolic extract (DPE) was recovered. Using fast centrifugal partitioning chromatography (FCPC), the individual DPE components were separated. A mixture of hexane-ethyl acetate (Hex-EthAc 2:3) was used as the mobile phase, and a stationary-phase mixture of ethanol-water (EtOH-W 2:3) was used. The different phenolic compounds were separated by their affinities with each phase and recovered according to their elution times.

4. Conclusion

In the production of oils, the objectives are to obtain maximum industrial yield, maximum volatile compounds, and/or maximum phenolic compounds based on the final destination of the oils. In this study, development of highly aromatic oils, aromatic and healthy oils (balanced between sensory evaluation and phenolic content), and oils with high phenolic content were proposed. The first group of oils corresponds to olive oils from the irrigated Arbequina cultivar which were elaborated with a hole diameter of 4.5 mm, malaxation time of 30 min, and temperature of 20 °C. These oils contained very few phenolic compounds (231.5 mg/kg) but were high in volatile compounds of the LOX pathway (35.0 mg/kg). These oils are very unstable and deteriorate very quickly, which is why they are

recommended to be consumed raw and soon after their elaboration. Balanced oils are of the Arbequina and Arbosana rainfed cultivars, which had highly acceptable contents of volatile (18.5 mg/kg) and phenolic compounds (514.4 mg/kg). The oils from the Koroneiki rainfed cultivar, were produced with an orifice diameter of 4.5 mm, malaxation time of 30 min, and temperature of 40 °C, and had a low content of volatile compounds (5.7 mg/kg) and a high content of phenols (1307.2 mg/kg). These oils contained 3.0 mg/kg of phenolic alcohols, 16.4 mg/kg of flavonoids, 63.0 mg/kg of lignans, and 990.1 mg/kg of secoiridoids (500.0 and 174.3 mg/kg of oleacein and oleocanthal, respectively). They are very stable oils that can be consumed throughout the year, without being altered. This cultivar lends itself for use in frying, for its healthy characteristics in the prevention and/or treatment of diseases, or for the separation of its phenolic components, especially oleocanthal and oleacein, which could be used in pharmaceuticals or as food additives.

References

- Adhami, H., Zehl, M., Dangl, C., Dorfmeister, D., Stadler, M., Urban, E., Hewitson, P., Ignatova, S., & Krenn, L. (2015). Preparative isolation of oleocanthal, tyrosol, and hydroxytyrosol from olive oil by HPLC. *Food Chemistry*, 170, 154-159, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.079>.
- Agrawal, K., Melliou, E., Li, X., Pedersen, T. L., Wang, S. C., Magiatis, P., Newman, J. W., & Holt, R. R. (2017). Oleocanthal-rich extra virgin olive oil demonstrates acute anti-platelet effects in healthy men in a randomized trial. *Journal of Functional Foods*, 36, 84-93, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.06.046>.
- Andreou, V., Dimopoulos, G., Alexandrakis, Z., Katsaros, G., Oikonomou, D., Toepfl, S., Heinz, V., & Taoukis, P. (2017). Shelf-life evaluation of virgin olive oil extracted from olives subjected to nonthermal pretreatments for yield increase. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 40, 52-57, doi:<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.09.009>.
- Angelis, A., Hamzaoui, M., Aligiannis, N., Nikou, T., Michailidis, D., Gerolimos, P., Termentzi, A., Hubert, J., Halabalaki, M., Renault, J., & Skaltsounis, A. (2017). An integrated process for the recovery of high added-value compounds from olive oil using solid support free liquid-liquid extraction and chromatography techniques. *Journal of Chromatography A*, 1491, 126-136, doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.02.046>.

- Batarseh, Y. S., & Kaddoumi, A. (2018). Oleocanthal-rich extra-virgin olive oil enhances donepezil effect by reducing amyloid- β load and related toxicity in a mouse model of Alzheimer's disease. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 55, 113-123, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.12.006>.
- Ben Brahim, S., Marrakchi, F., Gargouri, B., & Bouaziz, M. (2015). Optimization of malaxing conditions using CaCO₃ as a coadjuvant: A method to increase yield and quality of extra virgin olive oil cv. Chemlali. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 243-252, doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.013>.
- Benito, M., Lasa, J. M., Gracia, P., Oria, R., Abenoza, M., Varona, L., & Sánchez-Gimeno, A. C. (2013). Olive oil quality and ripening in super-high-density Arbequina orchard. *Journal of the science of food and agriculture*, 93(9), 2207-2220, doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.6028>.
- Clodoveo, M. L., & Hachicha Hbaieb, R. (2013). Beyond the traditional virgin olive oil extraction systems: Searching innovative and sustainable plant engineering solutions. *Food Research International*, 54(2), 1926-1933, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.06.014>.
- Costanzo, P., Bonacci, S., Cariati, L., Nardi, M., Oliverio, M., & Procopio, A. (2018). Simple and efficient sustainable semi-synthesis of oleacein [2-(3,4-hydroxyphenyl) ethyl (3S,4E)-4-formyl-3-(2-oxoethyl)hex-4-enoate] as potential additive for edible oils. *Food Chemistry*, 245, 410-414, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.10.097>.
- Czerwińska, M., Kiss, A. K., & Naruszewicz, M. (2012). A comparison of antioxidant activities of oleuropein and its dialdehydic derivative from olive oil, oleacein. *Food Chemistry*, 131(3), 940-947, doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.082>.
- English, B. J., & Williams, R. M. (2009). Synthesis of (\pm)-oleocanthal via a tandem intramolecular Michael cyclization–HWE olefination. *Tetrahedron Letters*, 50(23), 2713-2715, doi:<https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2009.03.145>.
- Espínola, F., Moya, M., Fernández, D. G., & Castro, E. (2011). Modelling of virgin olive oil extraction using response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(12), 2576-2583, doi:<https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02786.x>.
- Espínola, F., Moya, M., Fernández, D. G., & Castro, E. (2009). Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjuvant extractant. *Journal of Food Engineering*, 92(1), 112-118, doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.10.038>.
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. M., Brandão, G. C., da Silva, E. G. P., Portugal, L. A., dos Reis, P. S., Souza, A. S., & dos Santos, W. N. L. (2007). Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical

- methods. *Analytica Chimica Acta*, 597(2), 179-186, doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.07.011>.
- Filipek, A., Czerwińska, M. E., Kiss, A. K., Polański, J. A., & Naruszewicz, M. (2017). Oleacein may inhibit destabilization of carotid plaques from hypertensive patients. Impact on high mobility group protein-1. *Phytomedicine*, 32, 68-73, doi:<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2017.06.004>.
- Filipek, A., Czerwińska, M. E., Kiss, A. K., Wrzosek, M., & Naruszewicz, M. (2015). Oleacein enhances anti-inflammatory activity of human macrophages by increasing CD163 receptor expression. *Phytomedicine*, 22(14), 1255-1261, doi:<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.10.005>.
- Franco, M. N., Galeano-Díaz, T., Sánchez, J., De Miguel, C., & Martín-Vertedor, D. (2014). Antioxidant capacity of the phenolic fraction and its effect on the oxidative stability of olive oil varieties grown in the southwest of Spain. *Grasas y Aceites*, 65(1), doi:<http://dx.doi.org/10.3989/gya.051513>.
- Fratoddi, I., Rapa, M., Testa, G., Venditti, I., Scaramuzzo, F. A., & Vinci, G. (2018). Response surface methodology for the optimization of phenolic compounds extraction from extra virgin olive oil with functionalized gold nanoparticles. *Microchemical Journal*, 138, 430-437, doi:<https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.01.043>.
- García, J. M., Morales-Sillero, A., Pérez-Rubio, A. G., Diaz-Espejo, A., Montero, A., & Fernández, J. E. (2017). Virgin olive oil quality of hedgerow 'Arbequina' olive trees under deficit irrigation. *Journal of the science of food and agriculture*, 97(3), 1018-1026, doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.7828>.
- Gorzynik, M., PrzychodzeÅ, P., Cappello, F., Kuban-Jankowska, A., Gammazza, A., Knap, N., Wozniak, M., & Gorska, M. (2018). Potential Health Benefits of Olive Oil and Plant Polyphenols. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (3), 686, doi:<https://doi.org/10.3390/ijms19030686>.
- Grijalva-Contreras, R., Macías-Duarte, R., Martínez-Díaz, G., Robles-Contreras, F., Valenzuela-Ruiz, M. d. J., & Nuñez-Ramírez, F. (2013). Effect of Regulated Deficit Irrigation on Productivity, Quality and Water Use in Olive cv "Manzanilla". *American Journal of Plant Science*, 4, 109-113, doi:<https://doi.org/10.4236/ajps.2013.4.12A3013>.
- Lopes de Souza, A., Marcadenti, A., & Portal, V. (2017). Effects of Olive Oil Phenolic Compounds on Inflammation in the Prevention and Treatment of Coronary Artery Disease. *Nutrients*, 9(10), 1087, doi:<https://doi.org/10.3390/nu9101087>.
- Miho, H., Díez, C. M., Mena-Bravo, A., Sánchez de Medina, V., Moral, J., Melliou, E., Magiatis, P., Rallo, L., Barranco, D., & Priego-Capote, F. (2018). Cultivar influence on variability in olive oil phenolic profiles determined through an extensive

germplasm survey. *Food Chemistry*, 266, 192-199,
doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.06.002>.

Motilva, M. J., Tovar, M. J., Romero, M. P., Alegre, S., & Girona, J. (2000). Influence of regulated deficit irrigation strategies applied to olive trees (Arbequina cultivar) on oil yield and oil composition during the fruit ripening period. *Journal of the science of food and agriculture*, 80(14), 2037-2043,
doi:[https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200011\)80:143.O.CO;2-0](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200011)80:143.O.CO;2-0).

Moya, M., Alcalá, S., Ocaña, M. T., Vidal, A., & Espínola, F. (2018). Oil mill coadjuvants: Aggregation due to moisture and action on olive-pomace oils. *Journal of Food Engineering*, 236, 51-59,
doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.013>.

Ortega Vidal, J., Vidal Castro, A., Espínola Lozano, F., Moya Vilar, M., Salido Ruiz, S., & Altarejos Caballero, J. (2019). Aislamiento de oleocantal y oleaceína a partir de aceite de oliva. *XIX Simposium Científico-Técnico Expoliva. Jaén, 2019*.

Presti, G., Guarrasi, V., Gulotta, E., Provenzano, F., Provenzano, A., Giuliano, S., Monfreda, M., Mangione, M., Passantino, R., San Biagio, P., Costa, M., & Giacomazza, D. (2017). Bioactive compounds from extra virgin olive oils: Correlation between phenolic content and oxidative stress cell protection. *Biophysical chemistry*, 230, 109-116,
doi:<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2017.09.002>.

Ramos-Escudero, F., Morales, M. T., & 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,
doi:<https://doi.org/10.1080/10942912.2013.809542>.

Rigacci, S., & Stefani, M. (2016). Nutraceutical Properties of Olive Oil Polyphenols. An Itinerary from Cultured Cells through Animal Models to Humans. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(6), 843,
doi:<https://doi.org/10.3390/ijms17060843>.

Scotece, M., Conde, J., Abella, V., Lopez, V., Pino, J., Lago, F., Smith, A. B., Gómez-Reino, J. J., & Gualillo, O. (2015). New drugs from ancient natural foods. Oleocantal, the natural occurring spicy compound of olive oil: A brief history. *Drug discovery today*, 20(4), 406-410,
doi:<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.10.017>.

Servili, M., Sordini, B., Esposto, S., Urbani, S., Veneziani, G., Di Maio, I., Selvaggini, R., & Taticchi, A. (2013). Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants*, 3, 1-23,
doi:<https://doi.org/10.3390/antiox3010001>.

Servili, M., Esposto, S., Lodolini, E., Selvaggini, R., Taticchi, A., Urbani, S., Montedoro, G., Serravalle, M., & Gucci, R. (2007). Irrigation Effects on Quality, Phenolic

- Composition, and Selected Volatiles of Virgin Olive Oils Cv. Leccino. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(16), 6609-6618, doi:https://doi.org/10.1021/jf070599n.
- Smith, A. B., Sperry, J. B., & Han, Q. (2007). Syntheses of (-)-Oleocanthal, a Natural NSAID Found in Extra Virgin Olive Oil, the (-)-Deacetoxy-Oleuropein Aglycone, and Related Analogues. *The Journal of organic chemistry*, 72(18), 6891-6900, doi:https://doi.org/10.1021/jo071146k.
- Squeo, G., Silletti, R., Summo, C., Paradiso, V. M., Pasqualone, A., & Caponio, F. (2016). Influence of calcium carbonate on extraction yield and quality of extra virgin oil from olive (*Olea europaea* L. cv. Coratina). *Food Chemistry*, 209(Supplement C), 65-71, doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.028.
- Tamborrino, A., Squeo, G., Leone, A., Paradiso, V. M., Romaniello, R., Summo, C., Pasqualone, A., Catalano, P., Bianchi, B., & Caponio, F. (2017). Industrial trials on coadjuvants in olive oil extraction process: Effect on rheological properties, energy consumption, oil yield and olive oil characteristics. *Journal of Food Engineering*, 205, 34-46, doi:https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2017.02.019.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & 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, doi:https://doi.org/10.1079/NRR200495.
- Valli, M., Peviani, E. G., Porta, A., D'Alfonso, A., Zanoni, G., & Vidari, G. (2013). A Concise and Efficient Total Synthesis of Oleocanthal. *European Journal of Organic Chemistry*, 2013(20), 4332-4336, doi:https://doi.org/10.1002/ejoc.201300324.
- Vidal, A. M., Alcalá, S., de Torres, A., Moya, M., & Espínola, F. (2018). Industrial production of a balanced virgin olive oil. *LWT - Food Science and Technology*, 97, 588-596, doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.054.
- Vougogiannopoulou, K., Lemus, C., Halabalaki, M., Pergola, C., Werz, O., Smith, A. B. 3rd, Michel, S., Skaltsounis, L., & Deguin, B. (2014). One-Step Semisynthesis of Oleacein and the Determination as a 5-Lipoxygenase Inhibitor. *Journal of Natural Products*, 77(3), 441-445, doi:https://doi.org/10.1021/np401010x.
- Wen, J., Jiang, Y., Zhu, A., Yi, H., Li, L., & Yong, X. (2015). Method for extracting oleocanthal from olive oil. Patent: CN103483196 (A), China.

Table 1. Characterization of the olives used in this study, with standard deviations*

Key	Variety	Irrigation	MI	Moisture, %	Oil (dry base), %	OR, % **
AI1	Arbequina	Irrigated	0.16	60.93 ±0.70	31.63 ±0.64	46.27 ±1.61
AI2	Arbequina	Irrigated	1.11	61.78 ±0.43	39.60 ±0.67	65.55 ±1.75
AI3	Arbequina	Irrigated	2.52	61.96 ±0.28	42.56 ±0.56	74.08 ±1.51
AR1	Arbequina	Rainfed	0.2	53.72 ±1.13	34.34 ±0.39	52.29 ±2.08
AR2	Arbequina	Rainfed	1.31	55.88 ±0.38	40.29 ±0.40	67.48 ±1.25
AR3	Arbequina	Rainfed	2.56	54.96 ±0.78	44.51 ±1.29	80.21 ±3.82
KI1	Koroneiki	Irrigated	0.07	59.91 ±1.04	29.06 ±0.47	40.96 ±1.55
KI2	Koroneiki	Irrigated	0.67	59.03 ±0.40	39.68 ±0.75	65.78 ±1.91
KI3	Koroneiki	Irrigated	2.3	53.29 ±0.56	41.48 ±1.19	70.90 ±3.16
KR1	Koroneiki	Rainfed	0.16	53.11 ±0.85	34.26 ±0.61	52.10 ±1.95
KR2	Koroneiki	Rainfed	1.68	53.45 ±0.56	43.06 ±0.67	75.61 ±2.21
KR3	Koroneiki	Rainfed	2.05	52.60 ±0.59	46.68 ±0.67	87.53 ±2.39
OI1	Arbosana	Irrigated	0.07	63.19 ±0.32	34.41 ±0.49	52.46 ±1.16
OI2	Arbosana	Irrigated	0.58	62.80 ±0.54	39.06 ±0.93	64.09 ±2.35
OR1	Arbosana	Rainfed	0.15	55.38 ±0.87	38.61 ±0.60	62.90 ±2.20
OR2	Arbosana	Rainfed	0.95	59.89 ±0.64	39.70 ±0.80	65.83 ±2.24
OR3	Arbosana	Rainfed	2.11	54.99 ±0.41	48.07 ±0.74	92.56 ±2.35

* Average of four analyses and use of error propagation theory for indirect results

** Oil/solids ratio of olives (OR), for 100 g of solids

Table 2a. Results of the analysis carried out on oils obtained from the KR2 olive sample

Diameter, mm	Temperature, °C	Time, min	Extraction efficacy, %	Acidity, %	Peroxide index, mEq O ₂ /kg	K ₂₇₀	Phenolic alcohols, mg/kg	Flavonoids, mg/kg	Lignans, mg/kg	Oleacein, mg/kg	Oleocanthal, mg/kg	Secoiridoids, mg/kg	Total phenols, mg/kg	DPPH, μmol Trolox/kg	Total LOX, mg/kg
5.5	30	60	77.13	0.137	2.80	0.169	3.61	26.76	104.37	340.45	109.34	601.97	837.84	2461.6	6.37
5.5	20	90	79.83	0.120	2.76	0.156	4.17	33.79	97.75	261.42	77.13	450.62	706.14	1718.5	6.64
4.5	30	90	80.53	0.133	3.03	0.168	2.56	20.43	78.09	302.04	130.77	620.75	813.83	2054.6	5.71
6.5	30	90	76.88	0.132	3.03	0.158	2.69	27.31	85.76	350.10	143.28	695.79	936.16	2218.7	5.93
6.5	40	60	77.64	0.159	3.12	0.182	2.86	27.71	113.77	430.54	175.28	920.77	1145.89	2855.4	5.24
5.5	20	30	75.58	0.130	1.95	0.171	3.97	35.47	117.01	318.90	50.11	446.89	720.01	1995.0	6.46
6.5	20	60	76.86	0.127	2.09	0.158	3.32	35.98	112.02	288.16	68.55	461.75	730.65	2121.9	6.52
5.5	40	90	80.46	0.152	2.10	0.127	3.48	18.44	64.44	391.64	178.97	902.31	1080.24	3146.1	4.34
4.5	40	60	77.09	0.160	2.42	0.205	2.87	25.17	84.74	425.24	171.20	894.98	1092.82	3211.5	5.12
5.5	40	30	77.58	0.160	2.64	0.212	4.96	29.77	109.47	463.67	128.35	803.43	1062.05	3071.6	5.57
6.5	30	30	75.44	0.137	2.64	0.167	4.02	39.33	127.13	394.89	103.46	637.18	949.11	2368.7	6.58
4.5	30	30	74.76	0.138	2.80	0.183	3.91	32.04	114.88	377.31	98.36	599.34	854.50	2589.7	5.93
5.5	30	60	79.45	0.138	2.95	0.177	3.57	28.12	107.68	368.15	124.18	648.09	904.15	2580.7	5.89
4.5	20	60	77.68	0.138	2.58	0.173	3.67	29.11	100.44	317.36	77.02	490.47	738.21	2205.3	6.52
5.5	30	60	77.72	0.140	3.01	0.170	3.44	32.56	99.08	364.78	119.18	659.77	910.20	2591.0	5.92
5.5	30	60	78.85	0.138	3.00	0.185	2.91	28.35	100.70	360.98	124.14	641.06	883.83	2515.7	6.07
5.5	30	60	78.22	0.139	2.90	0.189	3.15	28.16	104.82	373.67	134.75	673.33	913.49	2545.1	5.80

Table 2b. Models obtained (in coded factors) and statistics for the responses from Table 2a (KR2 olive sample)

Response	Models	R²	CV, %
Extraction efficacy	$78.69 - 0.14A + 1.31C - 1.60AC - 1.32A^2 \pm 0.54$	0.921	0.69
Acidity	$0.138 + 0.016B - 0.003C + 0.005B^2 - 0.003C^2 \pm 0.001$	0.990	0.99
Peroxide index	$2.91 - 0.04A + 0.11B + 0.16C + 0.20AB - 0.24BC - 0.45B^2 \pm 0.07$	0.973	2.70
K ₂₇₀	$0.170 - 0.008A + 0.015B - 0.007C + 0.009B^2 \pm 0.004$	0.951	2.06
Phenolic alcohols	$3.31 - 0.31B - 0.68C - 1.26BC \pm 0.19$	0.937	5.36
Flavonoids	$29.85 + 2.95A - 3.43B - 5.31C - 3.87BC \pm 1.77$	0.930	6.00
Lignans	$102.50 + 5.43A - 7.79B - 19.01C - 8.85BC - 3.48B^2 \pm 2.72$	0.982	2.72
Oleacein	$358.19 + 10.23A + 70.66B - 31.20C \pm 10.79$	0.968	2.97
Oleocanthal	$122.79 - 0.76A + 50.49B + 13.45C + 3.14AB - 2.97AC - 8.53C^2 \pm 1.78$	0.999	1.55
Secoiridoids	$641.92 + 221.79B + 42.31B^2 \pm 27.24$	0.972	4.21
Total phenols	$893.43 + 51.10A + 179.04B + 28.58AB \pm 15.13$	0.990	1.68
DPPH	$2565.34 - 62.06A + 464.26B - 177.10C + 96.28AC - 236.21C^2 \pm 86.35$	0.968	3.53
Total LOX	$6.07 - 0.73B - 0.30C - 0.35BC - 0.27B^2 \pm 0.18$	0.940	3.05

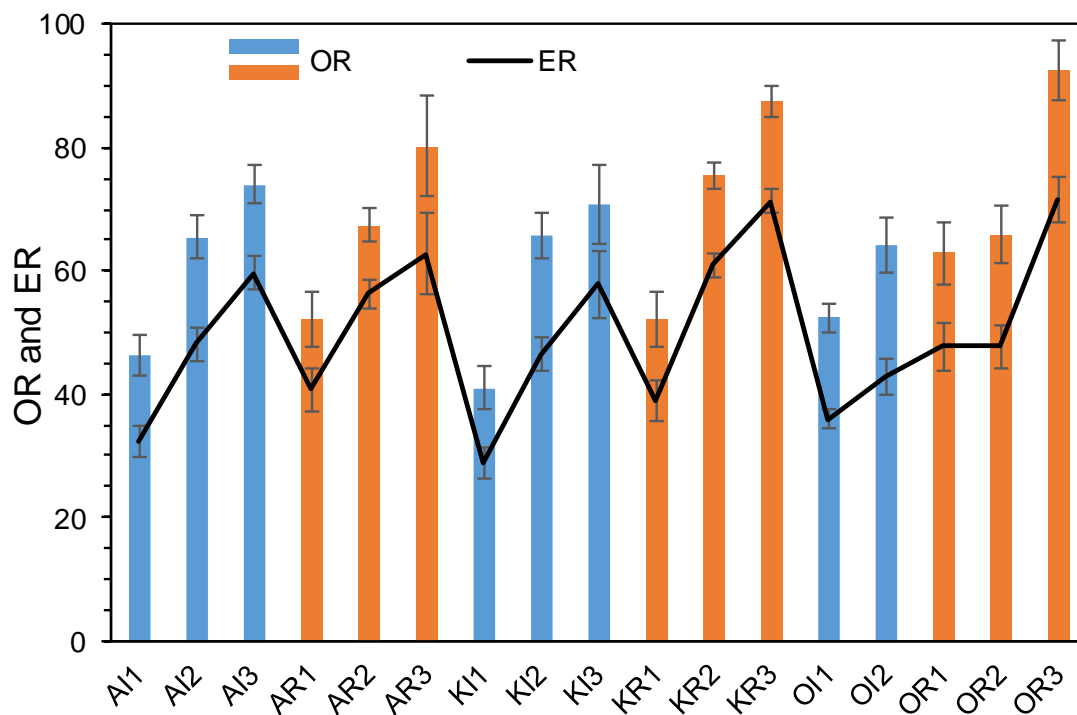


Figure 1. Relationship between the oil content of olive samples and the maximum extraction efficacy, in g of oil/100 g of solids. The whiskers indicate the standard deviation of the results shown

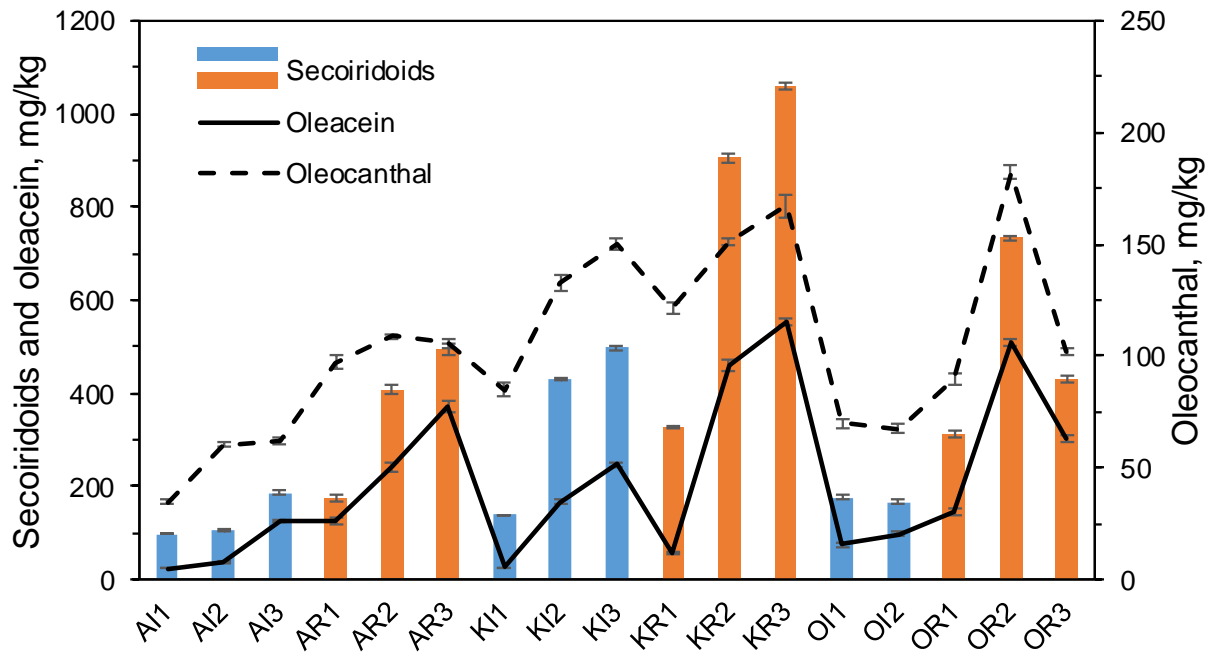


Figure 2. Content of secoiridoids, oleacein and oleocanthal, in the oils obtained from different olive samples (optimized for maximum secoiridoids)

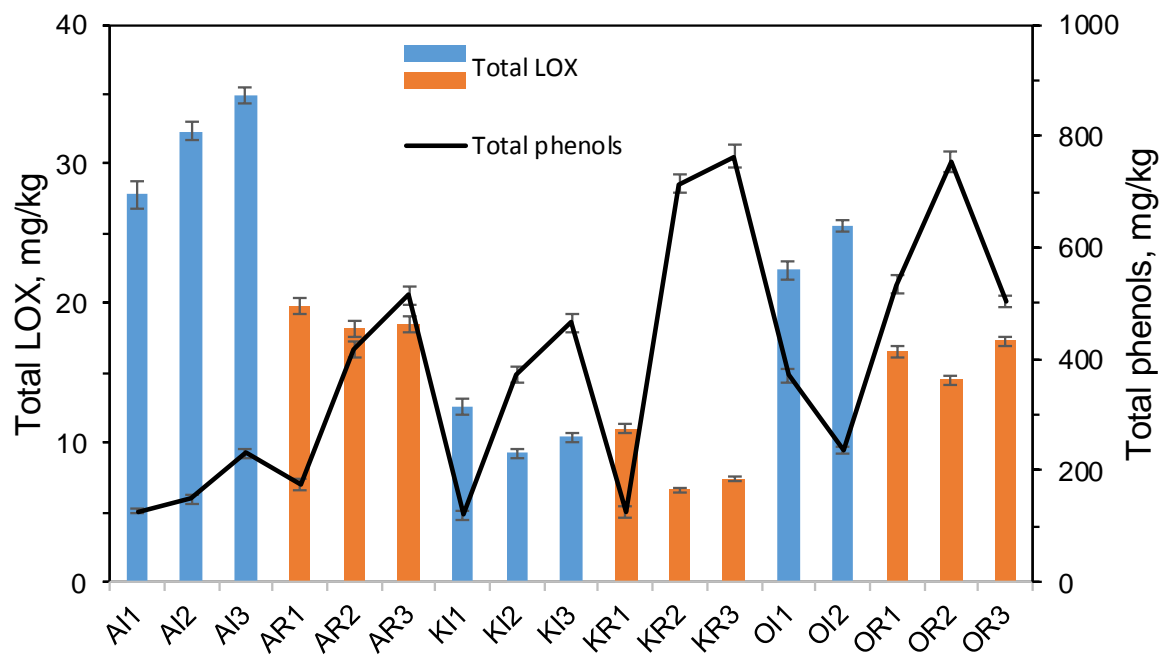
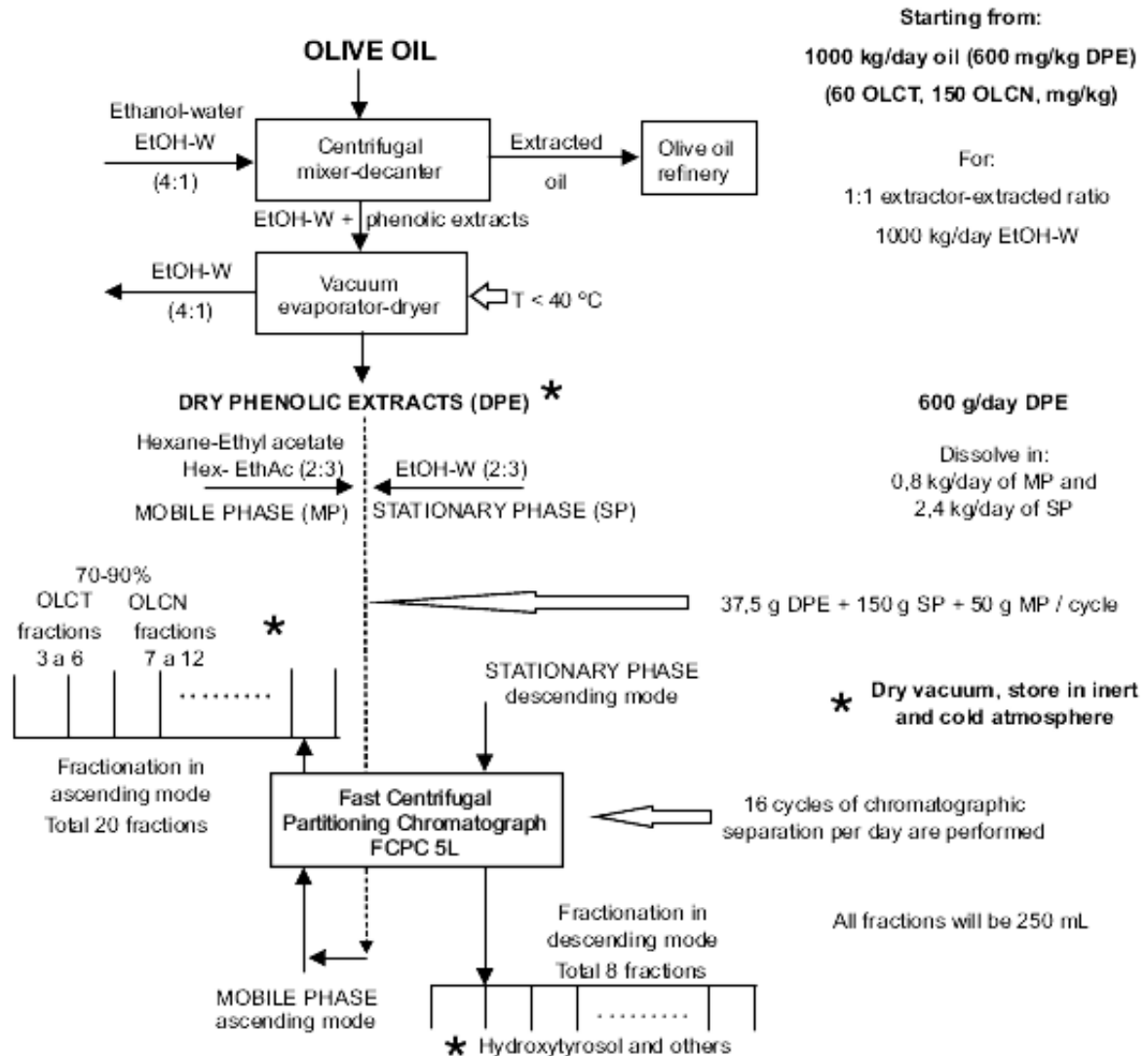


Figure 3. Content of total volatile (total LOX) and phenolic compounds in oils (optimized for maximum volatile compounds)

EXTRACTION OF OLEOCANTHAL (OLCT) AND OLEACEIN (OLCN)



According to the calculations, approximately 48 g/day of OLCT and 120 g/day of OLCN will be obtained, assuming a yield of 80% and for the oil indicated above. The composition of the oil can vary and the results too.

Depending on the richness of OLCT and OLCN, it will be necessary to subject the fractions in a semipreparative column in a reverse phase. Industrially wealth can be increased even could be modified compositions and flow rates of the phases. For DPEs, the dryer must be continuous. For the fractions of phenols the dryer must be discontinuous and individual, for each fraction of 250 mL.

Figure 4. Scaling proposal for the extraction of oleocanthal and oleacein from virgin olive oil

ARTÍCULO 4

Título: Fresh and aromatic virgin olive oil obtained from Arbequina, Koroneiki, and Arbosana cultivars

Autores: Alfonso M. Vidal; Sonia Alcalá; Antonia de Torres; Manuel Moya; Juan Manuel Espínola, Francisco Espínola

Publicación: (Enviado) Food Science & Nutrition (2019) (Open access)

Cuartil: Q2 (Food Science & Technology)

Índice de impacto (JCR 2018): 1,747

Índice de impacto (5 años): 1,630

Fresh and aromatic virgin olive oil obtained from Arbequina, Koroneiki, and Arbosana cultivars

Alfonso M. Vidal, Sonia Alcalá, Antonia De Torres, Manuel Moya, Juan Manuel Espínola, Francisco Espínola*

Dept. Chemical, Environmental and Materials Engineering, Universidad de Jaén, Paraje Las Lagunillas, Edif. B-3, 23071 Jaén, Spain.

* Corresponding author. Tel.: + 34 953 212948
E-mail address: fespino@ujaen.es (F. Espínola).

Abstract

A wide range of mathematical models were obtained for the extraction EVOO through the evaluation of three factors: diameter of the grid holes of the hammer-crusher, malaxation temperature, and malaxation time. Olives from superintensive crops of the Arbequina, Koroneiki, and Arbosana cultivars grown under rainfed or irrigated conditions and at different stages ripening were used. A Box-Behnken design was used to obtain the oils from each olive sample, a total of 289 oil samples. 12 responses were analyzed for each of the oil samples, and 204 mathematical models have been obtained.

The malaxation temperature was found to be the factor with the most influence on the total content of lipoxygenase (LOX) pathway volatile compounds; as the temperature was increased, the amount of volatile compounds decreased. EVOO from irrigated crops had the highest content of LOX pathway volatile compounds. The content of photosynthetic pigments increased when the malaxing temperature was increased. Olive samples with a lower ripening degree and from rainfed crops had the highest contents of photosynthetic compounds. Comparing the three cultivars analyzed, the Arbequina cultivar had the highest content, 34.94 mg/kg. The Koroneiki cultivar had the highest contents of chlorophylls, at 60.13 mg/kg, and carotenoids, at 23.50 mg/kg.

Keywords

Super-high-density orchard; aroma; color; flavor; response surface methodology

Abbreviations

EVOO: extra virgin olive oil

LOX: Lipoxygenase

MI: maturity index

RSM: Response Surface Methodology

SDE: Statistical Design of Experiments

VOO: virgin olive oil

1. Introduction

Spain, and particularly, the Spanish province of Jaén, is one of the great world powers in the production of virgin olive oil (VOO). Spanish olive oil production represents approximately 45% of the world total. Furthermore, due to its great extension, olive culture represents one of the principal economic sectors in Jaén. VOO is a fat that is known worldwide for its benefits to human health. The olive oil consumption in the Mediterranean diet is associated with the prevention of several diseases and low mortality from cardiovascular disease (Covas, Fitó, & de la Torre, 2015).

Furthermore, consumers greatly appreciate extra virgin olive oil (EVOO) for its aromatic characteristics and intense color. The specific flavor of EVOO defines its quality and uniqueness (Reboredo-Rodríguez, González-Barreiro, Cancho-Grande, & Simal-Gándara, 2012). Consumers demand EVOO with a balanced composition. To achieve a balanced final product, several studies to optimize the extraction conditions and agronomic factors have been conducted (Vidal, Alcalá, Ocaña, de Torres, Espínola, Moya, 2018; Vidal, Alcalá, de Torres, Moya, & Espínola, 2018a; Lukić, Krapac, Horvat, Godena, Kosić, & Brkić Bubola, 2018).

The first aspects of olive oil that the consumer detects are its color and smell, which are important attributes in terms of the perception of foods. Chlorophylls and carotenoids are the main pigments responsible for the color of green olives, and these photosynthetic pigments are present in olive oil (Rallo, Díez, Morales-Sillero, Miho, Priego-Capote, & Rallo, 2018). Therefore, olive oil produced from green olives with a low degree of maturation will take on a green color, while more mature purple olives impart a golden color. The volatile compounds present in VOO play an important role in the perception of the odor of VOO. The volatile C6 and C5 aldehydes, alcohols, and esters in VOO are mainly produced via the lipoxygenase (LOX) pathway; the formation of these compounds begins due to cell disruption during the crushing of the olives and continues throughout the extraction process (Angerosa, Servili, Selvaggini, Taticchi, Esposto, & Montedoro, 2004; Sánchez-Ortiz, Pérez, & Sanz, 2013). More than 180 different aroma compounds have been identified in olive oils (Kalua, Allen, Bedgood Jr, Bishop,

Prenzler, & Robards, 2007), but only a small fraction of the large number of volatile compounds present in olive oil actually contribute to its overall aroma. In addition, these compounds are responsible for the positive attributes of olive oils, and are indicators of a high-quality EVOO (Cevik, Ozkan, & Kiralan, 2016). Phenolic compounds play an important role in the intensity of the release of certain aroma compounds during the consumption of EVOO. These compounds interact with certain volatile compounds; the resulting complexes probably reduce their volatility during the organoleptic perception of olive oil (Genovese, Yang, Linforth, Sacchi, & Fisk, 2018).

During olive oil production, many factors influence the extraction process and product quality. The cultivar of olives used is one of the most important factors, and significantly influences the volatile compound composition. Growing the same olive cultivar in different locations results in oils with different volatile profiles (Kalua et al., 2007). In addition to the cultivar, the irrigation management, stage of maturity, and conditions used in the extraction process are other principal factors. The malaxation time and temperature are among the main technological variables during the extraction process. Modifying the EVOO extraction conditions can change the oil composition (Cevik, Aydin, Sermet, Ozkan, & Karacabey, 2017). The agronomic practices are also a relevant factor. Traditionally, olive trees have been grown under rainfed conditions. However, new crops are adapted to irrigation techniques, increasing the total production of VOO (Fregapane & Salvador, 2013).

The objective of this work was to determine the optimum extraction conditions in terms of maximizing the content of volatile compounds and pigments in the oil using a Response Surface Methodology approach. The obtained mathematical models allow mathematical optimization, producing a virgin olive oil that is desirable to consumers. Mathematical models were developed for agronomic factors, namely, the use of irrigation or rainfeeding and the ripening time of the olives, for the Arbequina, Koroneiki, and Arbosana cultivars.

2. Materials and Methods

2.1 Raw material

Olive fruits (*Olea europaea* L.) were picked by hand from super-intensive crops located in El Carpio (Córdoba, Spain) between October and December 2015. In total, 17 samples of olives were collected. Each sample was composed of approximately 10 kg of olives. The olives were harvested at different ripening degrees from olive trees of the Arbequina, Koroneiki, and Arbosana cultivars that had been either irrigated or rainfed. The maturity index (MI) or ripening degree was determined according to the method of Uceda & Frías as described in Espínola, Moya, Fernández, & Castro (2009). The olives were harvested with maturity indices between 0 and 3 to prevent the fruits from falling onto the ground. The oil content was analyzed by the Soxhlet method, and the moisture content was determined by drying at 105 °C. All measurements were carried out quadruplicate, and the results are presented in Table 1.

2.2 Olive oil extraction

Olive oils were obtained using an Abencor centrifugal system (Abencor analyser, MC2 Ingeniería y Sistemas S.L., Seville, Spain) under laboratory-scale conditions, as previously described by Espínola, Moya, Fernández, & Castro (2011). The obtained olive oils were decanted in a graduated tube for at least three hours, filtered using paper, and stored in amber glass bottles at -18 °C under a nitrogen atmosphere until their analyses.

2.3 Analysis of photosynthetic pigments: chlorophylls and carotenoids

The composition of the pigments was determined following the procedure proposed by Minguez-Mosquera, Rejano-Navarro, Gandul-Rojas, Sanchez-Gómez, & Garrido-Fernandez (1991). The absorbance was measured using a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer; a wavelength of 470 nm was used for the carotenoid pigments and 670 nm for the chlorophyllic pigments. The pigment concentration of the samples is expressed as mg of pigment per kg of oil.

2.4 Analysis of volatile compounds

The procedure for the determination of the volatile compounds was similar to that used by Vidal, Alcalá, de Torres, Moya, & Espínola (2018b). The volatile compounds were analyzed by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID). Two grams of the sample was placed in a 20 mL amber glass vial tightly capped with a polytetrafluoroethylene (PTFE)/silicone septum and a magnetic cap. The vial was heated to 40 °C for 10 min to allow the volatile compounds to reach equilibrium in the headspace. Subsequently, the SPME needle was inserted through the septum, and the fiber was exposed for 40 min. The SPME fiber (2 cm length and 50/30 µm film thickness) was purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA) and was composed of Carboxen/DVB/polydimethylsiloxane (PDMS). The fiber had been previously conditioned following the instructions of the manufacturer.

GC-FID analysis was performed using a gas chromatograph (model 7890B, Agilent Technologies, CA, USA) equipped with a split/splitless injector and a flame ionization detector. The volatile compounds adsorbed on the fiber were desorbed in the injector port for 1 min in splitless mode. A DB-WAXetr polyethylene glycol capillary column (30 m length, 0.25 mm internal diameter, 0.25 µm coating) (Agilent Technologies, USA) was used for the chromatographic separation. The carrier gas was helium at a flow rate of 1 mL/min. The injector temperature was 260 °C, and that of the detector was 280 °C. The oven temperature was initially set to 40 °C, and was held at this temperature for 10 min. Subsequently, the temperature was increased to 160 °C with a temperature ramp of 3 °C/min, followed by a ramp of 15 °C/min to 200 °C; the sample was then held at 200 °C for 5 min.

The chromatographic peaks were quantified using the internal standard method. 4-Methyl-2-pentanol was used as the internal standard, and all the compounds were used as external standards. The results are expressed as mg of standard compound per kg of oil.

2.5 Experimental design and statistical analysis

The Statistical Design of Experiments (SDE) and Response Surface Methodology (RSM) statistical tools were used for planning the methodology and data analysis. The optimal experimental strategy was used to obtain the most information with the minimum cost. RSM facilitates the evaluation of results and generates reliable conclusions (Box, Hunter, & Hunter, 2008). Different experimental designs can be used with RSM; in this case, a Box-Behnken design was used for the optimization of three factors: the diameter of the grid holes of the hammer-crusher, the malaxation temperature, and the malaxation time, with 17 runs including five central points. The extraction conditions were a crusher hole diameter of 4.5, 5.5, or 6.5 mm; a malaxation temperature of 20, 30, or 40 °C; and a malaxation time of 30, 60, or 90 min. Table 2 shows the values of the factors.

The experimental results were analyzed using the software Design-Expert v. 8.0.7.1 (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA). The coefficient of determination (R^2), the lack of fit, and the Fisher value (F-value) were obtained from the analysis of variance (ANOVA) and were used to determine the adequacy of the proposed model. Equation 1, a quadratic model, was used for each response studied.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 D + \beta_2 T + \beta_3 t + \beta_{12} D T + \beta_{13} D t + \beta_{23} T t + \beta_{11} D^2 + \beta_{22} T^2 + \beta_{33} t^2 \pm SD \quad (\text{Eq. 1})$$

where D is the grid hole diameter of the crusher (mm), T is the malaxation temperature (°C), and t is the malaxation time (min). Y is the predicted response and was correlated with the set of coefficients (β): the intercept (β_0), linear ($\beta_1, \beta_2, \beta_3$), interaction ($\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$), and quadratic ($\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$). The p-value was established as 5% ($p\text{-value} \leq 0.05$). SD is the standard deviation.

3. Results and Discussion

Table 1 shows the results of the characterization of the samples. The samples had MI values ranging from 0 to 3. As expected, the oil content increased with increasing MI of the olive samples. Samples from rainfed crops produced a higher percentage of olive oil than irrigated ones, probably due to the higher proportion

of moisture present in the irrigated samples. On the other hand, the irregular rainfall that occurred during the olive crop harvest due to climate change was probably the reason that the moisture and solids content did not follow a linear trend.

Considering the number of olive samples in Table 1 and the runs of each sample, a total of 289 oils were obtained and 12 responses, including volatile compounds and photosynthetic pigments, were analyzed for each oil. The tables and figures presented in this paper are only an example of the results obtained.

As an example, the experimental values corresponding to a sample of the Arbequina cultivar (irrigated and MI=1.11) obtained from the twelve responses studied for each olive sample are shown in Table 3. Seventeen similar tables were produced in this work. These results were processed using the Design Expert software, and mathematical models were obtained. These mathematical models can help to predict the optimal values of the technological factors to maximize each response within the range of factors studied. Table 4 shows the proposed models in terms of the actual factors with the statistical parameters and optimal values of the technological factors to obtain maximum response values for a sample of the Arbequina cultivar (irrigated, MI=1.11). Seventeen tables similar to Table 4 were produced in this work.

Table 5 shows the maximum values for each of the volatile compound and pigment responses for all samples. Finally, Table 6 shows the optimal values of the technological factors related to the extraction for two important responses: the total volatile compound and chlorophyll contents.

3.1 LOX pathway volatile compounds

Among the agronomic factors studied, the stage of maturation had only a small effect on the total volatile compounds, probably because the maturation stages studied were very similar (Table 5). However, the differences between the oils obtained from irrigated and rainfed olives were significant, as were those among the oils derived from different cultivars. Similar differences were reported by Gómez-Rico, Fregapane, & Salvador (2008) in a study involving the Arbequina,

Cornicabra, Morisca, Picolimon, Picudo, and Picual cultivars. Olive oils originating from irrigated crops had a higher content of volatile compounds than those from rainfed crops for a given cultivar. Comparing the three cultivars, the irrigated Arbequina (MI = 1.11) sample had the highest content of volatile compounds at 34.94 mg/kg; the sample with the lowest content was the rainfed Koroneiki sample (MI = 1.68) at 6.77 mg/kg, which was five times smaller. According to the results obtained by García, Morales-Sillero, Pérez-Rubio, Diaz-Espejo, Montero, & Fernández (2016), the oils from irrigated orchards had higher contents of (*E*)-2-hexenal, the major volatile compound, than oils from rainfed orchards.

According to Fregapane, Gómez-Rico, & Salvador (2010), the volatile compounds most affected by irrigation are (*E*)-2-hexenal, (*Z*)-3-hexenol, and hexanol. The increase in the amount of water supplied to the olive trees significantly increases the contents of these volatile compounds. It is noteworthy that the (*E*)-2-hexenal content of the Arbequina cultivar samples was very high (29.39 mg/kg for the irrigated sample with MI=1.11), compared with that of the Koroneiki samples (4.37 mg/kg for the irrigated sample with MI=0.67); these compounds are very important contributors to the delicate green perception of EVOO. Our results are similar those obtained by Cherfaoui, Cecchi, Keciri, & Boudriche (2018), which showed that the contents of volatile compounds and (*E*)-2-hexenal increased with maturity, reaching a maximum concentration when the color of the olive fruit skin changed from purple to black. As the MI increased, the contents of linoleic and linolenic FA decreased, whereas the contents of volatile compounds from the LOX pathway increased. This could be attributed to the consumption of these two FA, which are used as substrates for the LOX enzyme present in the olive pulp (Salas, Williams, Harwood, & Sánchez, 1999).

In terms of the technological factors, the malaxation temperature had the greatest influence on the total content of LOX pathway volatile compounds; as the temperature increased, the volatile compound contents decreased. Thus, low temperatures are required to obtain the highest content of volatile compounds (Figure 1 to 3). This enzymatic pool is sensitive to its environmental conditions; the temperature in particular can affect the level and the activity of the enzymes involved in the LOX pathway (Angerosa, 2002). According to the mathematical

models obtained, 20 °C (the lower limit of the range studied) was the optimum working temperature for most of the samples (Table 6). However, Ridolfi, Terenziani, Patumi, & Fontanazza (2002) studied the kinetic constants of the olive LOX enzyme and reported that the maximum LOX activity was recorded at 30 °C. Also, in agreement with the results of Angerosa, Mostallino, Basti, & Vito (2001) and Kalua et al. (2007), we observed that increased malaxing temperature increased the content of hexanol and (*E*)-2-hexenol (Table 4), which is considered to impart a highly unpleasant odor.

Different authors have reported widely different conclusions regarding the effect of malaxing time on the volatile compound content, with some saying that the malaxing time should be short, while others recommend increasing malaxing time. The malaxing time influences the activity of the enzymes and the vaporized compounds in the ambient atmosphere (Clodoveo, Hbaieb, Kotti, Mugnozza, & Gargouri, 2014). The recommendations for malaxing time differ because the interactions with malaxing temperature have not been sufficiently studied. At low temperatures, the content of volatile compounds increases with increasing time, while at high temperatures it decreases, as shown in Figure 1 and 3. Thus, to obtain the highest content of volatile compounds at low temperature, a long malaxing time of 90 min was required (upper limit of the range studied), as shown for most of the samples in Table 6. However, the malaxing time was not a significant factor in four mathematical models.

Just as the malaxing time had little influence on the mathematical models, as seen in the perturbation graphs of Figures 1 to 3, the diameter of the crusher holes did not appear in eight of the models. In the models in which it did appear, the maximum volatile compound content was obtained using the upper limit size, 6.5 mm, in some cases and the smallest size, 4.5 mm, in others. This would seem to indicate that the diameter did not have a significant influence on the volatile content of the olive oils.

According to Cevik et al. (2016) to obtain the maximum quantity of (*E*)-2-hexenal, a lower temperature and long malaxation time should be used. We do not agree

with the results obtained by Lukić et al. (2018), which indicated that (*E*)-2-hexenal and 1-penten-3-one content increased with higher malaxation temperatures.

3.2 Photosynthetic pigments

Table 5 shows that the maximum values of the chlorophyll and carotenoid contents predicted by the models. In addition to being responsible for the color of olive oil, these natural pigments also play an important role in the oxidative stability of the oil (Criado, Romero, Casanovas, & Motilva, 2008). The sample with the highest content of chlorophylls was the Koroneiki rainfed sample, and that with the lowest content was the Arbequina irrigated sample. The sample with the highest content of carotenoids was the Koroneiki rainfed sample, while the Arbequina sample had the lowest carotenoid content. García et al. (2016) reported that EVOO produced from rainfed crops exhibited a higher level of photosynthetic pigments than EVOO from irrigated crops. Samples with lower MIs had a higher content of these photosynthetic compounds. During the ripening process, the chlorophyll and carotenoid contents decreased, which was similar to the results observed by Benito et al. (2013). To obtain olive oils with a green color, i.e., with a high chlorophyll content, green or less mature olives should be used in the extraction. In addition, the rainfed samples contained more chlorophylls than the irrigated ones. These results also coincided with those obtained by Benito et al. (2013) and Lazzerini, Cifelli, & Domenici (2017).

The decrease in the chlorophyll and carotenoid contents during the ripening process is due to the involvement of an enzymatic system in the degradation of chlorophylls during the maturation of olive fruits, as described by Vergara-Domínguez, Ríos, Gandul-Rojas, & Roca (2016). The ripeness stage of the olives at harvesting was correlated to the amount of pigments in the resulting EVOOs. Interestingly, a decrease in the ratio of chlorophyll derivatives to carotenoids in the olive oils was observed with increasing maturity of the olives at harvesting (Lazzerini et al., 2017).

In terms of the technological factors, in general, the adjustment of the mathematical models for both photosynthetic pigments was good, and the three

factors studied had a great influence on the contents of chlorophylls and carotenoids, as can be seen in the perturbation graph in Figure 4. Basically, to obtain a high content of photosynthetic compounds, a malaxation temperature of 40 °C, a malaxation time of 90 minutes, and a hammer-crusher grid hole diameter of 4.5 mm should be used. The same conditions were obtained for the Arbequina, Koroneiki, and Arbosana cultivars. The temperature and malaxation time had a great influence; when both were increased, the chlorophyll content of the resulting oil increased. On the contrary, the diameter had less influence, with increasing diameter decreasing the pigments content.

Our models are different from those obtained by Brahim, Marrakchi, Gargouri, & Bouaziz (2015) using the same methodology (RSM); their model did not indicate an influence of the temperature on the chlorophyll content, probably due to the fact that they used a different cultivar, Chemlali, at a different Maturity Index, 4.7.

4. Conclusion

The results of this study suggest that the samples harvested from irrigated crops had the highest total content of LOX pathway volatile compounds. Comparing the three cultivars analyzed, the Arbequina cultivar had the highest content of these compounds. Samples harvested from rainfed crops had a higher content of photosynthetic pigments than irrigated samples. The Koroneiki cultivar had the highest content of chlorophylls and carotenoids. Therefore, it is not possible to optimize the irrigation management strategy to obtain an olive oil that is both rich in volatile compounds and high in photosynthetic pigments. Olive samples with a lower ripening degree had the highest contents of these photosynthetic compounds, as well as of the total LOX pathway volatile compounds. The maturation stage had only a small influence, probably because the maturation stages studied were very similar.

The malaxation temperature was the factor that had the greatest influence on the total LOX pathway volatile compounds. Lower malaxation temperature resulted in a higher quantity of volatile compounds. On the other hand, the chlorophyll content increased with increasing temperature and malaxation time. Therefore, it

is not possible to optimize the malaxing temperature to obtain an olive oil that is both rich in volatile compounds and high in photosynthetic pigments.

References

- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., & Montedoro, G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: Occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, *1054*(1-2), 17-31.
- 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*(9), 639-660.
- Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., & Vito, R. (2001). Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chemistry*, *72*(1), 19-28.
- Ben Brahim, S., Marrakchi, F., Gargouri, B., & Bouaziz, M. (2015). Optimization of malaxing conditions using CaCO₃ as a coadjuvant: A method to increase yield and quality of extra virgin olive oil cv. Chemlali. *LWT - Food Science and Technology*, *63*(1), 243-252.
- Benito, M., Lasa, J. M., Gracia, P., Oria, R., Abenoza, M., Varona, L., & Sánchez-Gimeno, A. C. (2013). Olive oil quality and ripening in super-high-density Arbequina orchard. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(9), 2207-2220.
- Box, G. E., Hunter, J. S., & Hunter, W. G. (2008). *Estadística para investigadores: diseño, innovación y descubrimiento*. Barcelona: Ed. Reverté.
- Cevik, S., Ozkan, G., & Kiralan, M. (2016). *Optimization of Malaxation Process using Major Aroma Compounds in Virgin Olive Oil*. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, *59*, e16160356.
- Cevik, S., Aydin, S., Sermet, O. S., Ozkan, G., & Karacabey, E. (2017). Optimization of Olive Oil Extraction Process by Response Surface Methodology. *Akademik Gida*, *15*, 337-343.
- Cherfaoui, M., Cecchi, T., Keciri, S., & Boudriche, L. (2018). Volatile compounds of Algerian extra-virgin olive oils: Effects of cultivar and ripening stage. *International Journal of Food Properties*, *21*(1), 36-49.
- Clodoveo, M. L., Hbaieb, R. H., Kotti, F., Mugnozza, G. S., & Gargouri, M. (2014). Mechanical strategies to increase nutritional and sensory quality of virgin olive oil by modulating the endogenous enzyme activities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, *13*(2), 135-154.

- Covas, M., Fitó, M., & de la Torre, R. (2015). 2 - Minor Bioactive Olive Oil Components and Health: Key Data for Their Role in Providing Health Benefits in Humans. In D. Boskou, *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*(pp. 31-52). AOCS Press.
- Criado, M., Romero, M., Casanovas, M., & Motilva, M. (2008). Pigment profile and colour of monovarietal virgin olive oils from Arbequina cultivar obtained during two consecutive crop seasons. *Food Chemistry*, *110*(4), 873-880.
- Espínola, F., Moya, M., Fernández, D. G., & Castro, E. (2011). Modelling of virgin olive oil extraction using response surface methodology. *International Journal of Food Science and Technology*, *46*(12), 2576-2583.
- Espínola, F., Moya, M., Fernández, D. G., & Castro, E. (2009). Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjuvant extractant. *Journal of Food Engineering*, *92*(1), 112-118.
- Fregapane, G., & Salvador, M. D. (2013). Production of superior quality extra virgin olive oil modulating the content and profile of its minor components. *Food Research International*, *54*(2), 1907-1914.
- Fregapane, G., Gómez-Rico, A., & Salvador, M. D. (2010). Chapter 6 - Influence of Irrigation Management and Ripening on Virgin Olive Oil Quality and Composition. San Diego, Ed. Academic Press, 51-58.
- García, J., Morales-Sillero, A., Pérez-Rubio, A.,G., Diaz-Espejo, A., Montero, A., & Fernández, J.,E. (2016). Virgin olive oil quality of hedgerow 'Arbequina' olive trees under deficit irrigation: Oil quality from deficit irrigated olive hedgerow. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *97*(3),1018-1026.
- Genovese, A., Yang, N., Linforth, R., Sacchi, R., & Fisk, I. (2018). The role of phenolic compounds on olive oil aroma release. *Food Research International*, *112*, 319-327.
- Gómez-Rico, A., Fregapane, G., & Salvador, M. D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, *41*(4), 433-440.
- Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood Jr, D. R., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, *100*(1), 273-286.
- Lazzerini, C., Cifelli, M., & Domenici, V. (2017). Pigments in extra virgin olive oils produced in different mediterranean countries in 2014: Near UV-vis spectroscopy versus HPLC-DAD. *LWT- Food Science and Technology*, *84*, 586-594.
- Lukić, I., Krapac, M., Horvat, I., Godena, S., Kosić, U., & Brkić Bubola, K. (2018). Three-factor approach for balancing the concentrations of phenols and volatiles

in virgin olive oil from a late-ripening olive cultivar. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 194-202.

- Minguez-Mosquera, I. M., Rejano-Navarro, L., Gandul-Rojas, B., Sanchez-Gómez, A. H., & Garrido-Fernandez, J. (1991). Color-pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68(5), 332-336.
- Rallo, L., Díez, C. M., Morales-Sillero, A., Miho, H., Priego-Capote, F., & Rallo, P. (2018). Quality of olives: A focus on agricultural preharvest factors. *Scientia Horticulturae*, 233, 491-509.
- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2012). Dynamic headspace/GC-MS to control the aroma fingerprint of extra-virgin olive oil from the same and different olive varieties. *Food Control*, 25(2), 684-695.
- Ridolfi, M., Terenziani, S. F., Patumi, M. F., & 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.
- Salas, J. J., Williams, M., Harwood, J. L., & Sánchez, J. (1999). Lipoxygenase activity in olive (*Olea europaea*) fruit. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(10), 1163-1168.
- Sánchez-Ortiz, A., Pérez, A. G., & Sanz, C. (2013). Synthesis of aroma compounds of virgin olive oil: Significance of the cleavage of polyunsaturated fatty acid hydroperoxides during the oil extraction process. *Food Research International*, 54(2), 1972-1978.
- Vergara-Domínguez, H., Ríos, J. J., Gandul-Rojas, B., & Roca, M. (2016). Chlorophyll catabolism in olive fruits (var. Arbequina and Hojiblanca) during maturation. *Food Chemistry*, 212, 604-611.
- Vidal, A., Alcalá, S., Ocaña, M., de Torres, A., Espínola, F., Moya, M. (2018). Modeling of volatile and phenolic compounds and optimization of the process conditions for obtaining balanced extra virgin olive oils. *Grasas y Aceites*, 69(2).
- Vidal, A. M., Alcalá, S., de Torres, A., Moya, M., & Espínola, F. (2018a). Industrial production of a balanced virgin olive oil. *LWT- Food Science and Technology*, 97, 588-596.
- Vidal, A. M., Alcalá, S., de Torres, A., Moya, M., & Espínola, F. (2018b). Use of talc in oil mills: Influence on the quality and content of minor compounds in olive oils. *LWT- Food Science and Technology*, 98, 31-38.

Table 1. Compositional characteristics and maturity index of the processed olives *

Variety	Irrigation management	Maturity Index (MI)	Moisture (%)	Oil (%)	Solids (%)
Arbequina		0.20	53.72±1.13	15.89±0.49	30.39±0.68
	Rainfed	1.31	55.88±0.38	17.78±0.10	26.34±0.39
		2.56	54.96±0.78	20.05±0.59	24.99±0.81
		0.16	60.93±0.70	12.36±0.25	26.71±0.63
	Irrigated	1.11	61.78±0.43	15.13±0.19	23.08±0.47
		2.52	61.96±0.28	16.19±0.28	21.85±0.23
0.16		53.11±0.85	16.06±0.18	30.82±0.81	
Koroneiki	Rainfed	1.68	53.45±0.56	21.73±0.15	24.82±0.59
		2.05	52.60±0.59	20.41±0.19	26.99±0.62
		0.07	59.91±0.78	11.65±0.29	28.44±0.83
	Irrigated	0.67	59.03±0.40	16.25±0.17	24.71±0.53
		2.30	53.29±0.56	19.38±0.34	27.33±0.87
		0.15	55.38±0.87	17.23±0.38	27.39±0.65
Arbosana	Rainfed	0.95	59.89±0.64	15.92±0.38	24.19±0.54
		2.11	54.99±0.41	21.64±0.17	23.38±0.54
		0.07	63.19±0.32	12.67±0.10	24.14±0.38
	Irrigated	0.58	62.80±0.54	14.53±0.30	22.67±0.58

* Means of four replicates ± Standard Deviation

Table 2. Actual factors of the experimental design (coded factors)

Run	Diameter (mm)	Temperature (°C)	Time (min)
1	5.5 (0)	30 (0)	60 (0)
2	5.5 (0)	20 (-1)	90 (+1)
3	4.5 (-1)	30 (0)	90 (+1)
4	6.5 (+1)	30 (0)	90 (+1)
5	6.5 (+1)	40 (+1)	60 (0)
6	5.5 (0)	20 (-1)	30 (-1)
7	6.5 (+1)	20 (-1)	60 (0)
8	5.5 (0)	40 (+1)	90 (+1)
9	4.5 (-1)	40 (+1)	60 (0)
10	5.5 (0)	40 (+1)	30 (-1)
11	6.5 (+1)	30 (0)	30 (-1)
12	4.5 (-1)	30 (0)	30 (-1)
13	5.5 (0)	30 (0)	60 (0)
14	4.5 (-1)	20 (-1)	60 (0)
15	5.5 (0)	30 (0)	60 (0)
16	5.5 (0)	30 (0)	60 (0)
17	5.5 (0)	30 (0)	60 (0)

Table 3. Experimental results for the irrigated Arbequina cultivar (MI = 1.11)

Run	LOX pathway volatile compounds (mg/kg)										Pigments (mg/kg)		
	(<i>E</i>)-2-Hexenal	Hexanal	(<i>Z</i>)-3-Hexenol	Hexanol	(<i>E</i>)-2-Hexenol	(<i>Z</i>)-2-Pentenol	1-Penten-3-ol	1-Penten-3-ona	(<i>Z</i>)-3-Hexenyl acetate	TOTAL	Chlorophylls	Carotenoids	
1	23.27	1.24	0.73	0.34	0.34	0.52	0.35	0.55	0.52	27.87	5.07	4.38	
2	28.48	2.10	0.77	0.49	0.32	0.56	0.43	0.62	0.43	34.19	4.60	4.61	
3	23.89	1.82	0.58	0.41	0.38	0.64	0.45	0.62	0.60	29.39	5.88	4.80	
4	19.82	1.75	1.10	0.78	0.63	0.58	0.37	0.52	0.47	26.03	5.02	4.09	
5	15.81	0.97	1.09	0.51	0.67	0.53	0.33	0.47	0.33	20.70	7.22	4.58	
6	26.49	1.84	0.74	0.61	0.21	0.53	0.38	0.69	0.44	31.93	2.83	3.36	
7	29.16	2.05	1.19	0.30	0.40	0.54	0.38	0.64	0.29	34.96	3.36	3.55	
8	14.58	0.94	0.77	0.62	0.53	0.53	0.33	0.45	0.47	19.22	4.02	5.01	
9	19.36	0.80	0.55	0.33	0.37	0.52	0.35	0.50	0.32	23.10	8.28	5.53	
10	21.14	0.83	0.78	0.46	0.36	0.55	0.39	0.57	0.48	25.55	5.39	4.45	
11	25.23	0.96	1.09	0.49	0.41	0.51	0.33	0.58	0.31	29.92	3.76	3.44	
12	24.77	0.96	0.52	0.46	0.21	0.56	0.40	0.66	0.46	29.01	5.50	4.86	
13	24.88	1.28	0.71	0.43	0.34	0.53	0.36	0.55	0.50	29.58	4.20	4.00	
14	26.23	1.93	0.65	0.56	0.21	0.61	0.49	0.73	0.57	31.98	4.18	4.26	
15	23.86	0.91	0.72	0.35	0.35	0.52	0.35	0.54	0.50	28.11	4.94	4.08	
16	24.13	1.27	0.71	0.32	0.37	0.55	0.37	0.58	0.45	28.76	5.90	4.59	
17	23.35	1.14	0.66	0.43	0.36	0.54	0.35	0.56	0.51	27.90	6.36	4.86	

Table 3. Experimental results for the irrigated Arbequina cultivar (MI = 1.11)

Run	LOX pathway volatile compounds (mg/kg)										Pigments (mg/kg)		
	(E)-2-Hexenal	Hexanal	(Z)-3-Hexenol	Hexanol	(E)-2-Hexenol	(Z)-2-Pentenol	1-Penten-3-ol	1-Penten-3-ona	(Z)-3-Hexenyl acetate	TOTAL	Chlorophylls	Carotenoids	
1	23.27	1.24	0.73	0.34	0.34	0.52	0.35	0.55	0.52	27.87	5.07	4.38	
2	28.48	2.10	0.77	0.49	0.32	0.56	0.43	0.62	0.43	34.19	4.60	4.61	
3	23.89	1.82	0.58	0.41	0.38	0.64	0.45	0.62	0.60	29.39	5.88	4.80	
4	19.82	1.75	1.10	0.78	0.63	0.58	0.37	0.52	0.47	26.03	5.02	4.09	
5	15.81	0.97	1.09	0.51	0.67	0.53	0.33	0.47	0.33	20.70	7.22	4.58	
6	26.49	1.84	0.74	0.61	0.21	0.53	0.38	0.69	0.44	31.93	2.83	3.36	
7	29.16	2.05	1.19	0.30	0.40	0.54	0.38	0.64	0.29	34.96	3.36	3.55	
8	14.58	0.94	0.77	0.62	0.53	0.53	0.33	0.45	0.47	19.22	4.02	5.01	
9	19.36	0.80	0.55	0.33	0.37	0.52	0.35	0.50	0.32	23.10	8.28	5.53	
10	21.14	0.83	0.78	0.46	0.36	0.55	0.39	0.57	0.48	25.55	5.39	4.45	
11	25.23	0.96	1.09	0.49	0.41	0.51	0.33	0.58	0.31	29.92	3.76	3.44	
12	24.77	0.96	0.52	0.46	0.21	0.56	0.40	0.66	0.46	29.01	5.50	4.86	
13	24.88	1.28	0.71	0.43	0.34	0.53	0.36	0.55	0.50	29.58	4.20	4.00	
14	26.23	1.93	0.65	0.56	0.21	0.61	0.49	0.73	0.57	31.98	4.18	4.26	
15	23.86	0.91	0.72	0.35	0.35	0.52	0.35	0.54	0.50	28.11	4.94	4.08	
16	24.13	1.27	0.71	0.32	0.37	0.55	0.37	0.58	0.45	28.76	5.90	4.59	
17	23.35	1.14	0.66	0.43	0.36	0.54	0.35	0.56	0.51	27.90	6.36	4.86	

Table 4. Proposed models in terms of actual factors with statistical parameters and optimal values of the technological factors for the response maximum values. Irrigated Arbequina cultivar sample (MI=1.1.1)

Response	Model	p-value	R ²	Std. Dev.	Maximum value (mg/kg)	Diameter (mm)	Temperature (°C)	Time (min)
<i>LOX pathway volatile compounds</i>								
(E)-2-Hexenal (mg/kg)	-8.40659 +6.60071 C +0.82591 T +0.37599 T -0.16216 C T -0.037733 C t -7.12392E-003 T t	< 0.0001	0.967	0.91	29.38	6.46	20.01	41.34
Hexenal (mg/kg)	+2.48071 -0.054697 T +8.33412E-003 t	< 0.0001	0.841	0.20	2.11	In range	20.26	88.51
(Z)-3-Hexenol (mg/kg)	+3.08037 -0.93728 C -0.034263 T +0.10994C ² +5.39239E-004 T ²	< 0.0001	0.982	0.03	1.16	6.50	20.00	In range
Hexanol (mg/kg)	+3.84316 -0.45507 C -0.074054 T -0.040652 t +0.010792 C T +2.84504E-003 C t +2.36590E-004 T t +1.58944E-004 T ²	0.0101	0.813	0.07	0.81	6.41	37.65	89.94
(E)-2-Hexenol (mg/kg)	+1.53012 -0.59260 C -8.73777E-003 T +1.02216E-003 t +2.72897E-003 C T +5.89056E-005 T t +0.057106 C ²	< 0.0001	0.987	0.02	0.71	6.49	37.62	86.61
(Z)-2-Penteno (mg/kg)	+0.54949	-	--	0.03	0.55	In range	In range	In range
1-Penten-3-ol (mg/kg)	+1.97746 -0.45045 C -0.017442 T +8.37659E-004 t +2.27508E-003 C T +0.031505 C ²	< 0.0001	0.988	0.01	0.52	4.50	20.00	90.00
1-Penten-3-one (mg/kg)	+1.12554 -0.038191 C -8.73974E-003 T -1.23479E-003 t	< 0.0001	0.895	0.03	0.73	4.61	20.34	31.62
(Z)-3-Hexenyl acetate (mg/kg)	+0.45091	-	--	0.09	0.45	In range	In range	In range
TOTAL (mg/kg)	+1.17056 +5.93420 C +0.61295 T +0.37933 t -0.13440 C T -0.035620 C t -7.16508E-003 T t	< 0.0001	0.978	0.81	34.94	6.50	20.00	90.00
<i>Pigments</i>								
Chlorophylls (mg/kg)	+1.82489 -0.56004 C +0.17092 T +0.023937 t	0.0002	0.803	0.70	8.30	4.50	40.00	90.00
Carotenoids (mg/kg)	+4.95986 -0.47317 C +0.047383 T +0.010006 t	0.0001	0.792	0.29	5.54	4.50	39.91	81.92

Table 5. Maximum value for volatile compounds and pigments response

Cultivar	Irrigation Management	Maturity Index (MI)	LOX pathway volatile compounds										Pigments		
			(E)-2-Hexenal	Hexanal	(Z)-3-Hexenol	Hexanol	(E)-2-Hexenol	(Z)-2-Pentenol	1-Penten-3-ol	1-Penten-3-one	(Z)-3-Hexenyl acetate	TOTAL	Chlorophylls	Carotenoids	
Arboguina		0.20	9.66±0.85	4.24±0.58	0.87±0.04	0.33±0.04	1.18±0.06	0.79±0.05	0.76±0.04	0.71±0.04	0.73±0.09	17.29±1.66	32.24±2.06	13.61±0.66	
	Rainfed	1.31	13.93±0.47	1.56±0.10	0.87±0.03	0.52±0.16	0.63±0.04	0.64±0.01	0.54±0.02	0.71±0.03	0.51±0.06	18.48±0.58	11.23±0.54	6.91±0.29	
		2.56	13.23±0.36	1.53±0.08	0.65±0.05	0.49±0.14	0.64±0.01	0.52±0.03	0.47±0.03	0.70±0.03	0.48±0.07	17.90±0.68	13.65±1.15	5.52±0.30	
		0.16	18.53±1.09	6.87±0.10	1.48±0.08	0.31±0.07	0.59±0.04	0.62±0.08	0.52±0.11	0.53±0.07	0.53±0.08	27.83±0.98	18.42±0.63	9.14±0.38	
	Irrigated	1.11	29.39±0.91	2.10±0.20	1.16±0.03	0.80±0.07	0.67±0.02	0.55±0.03	0.52±0.01	0.74±0.03	0.45±0.09	34.94±0.81	8.30±0.70	5.56±0.29	
		2.52	26.52±0.76	2.05±0.05	0.87±0.02	0.36±0.03	0.67±0.03	0.51±0.01	0.39±0.01	0.58±0.02	0.74±0.09	31.80±1.20	18.27±0.63	9.06±0.39	
Koronelki		0.16	2.85±0.09	2.55±0.40	0.89±0.03	0.27±0.06	0.63±0.02	0.78±0.04	0.64±0.05	0.64±0.04	1.15±0.08	10.03±0.52	60.13±4.06	23.50±1.34	
	Rainfed	1.68	1.84±0.09	0.47±0.04	0.57±0.03	0.79±0.05	0.57±0.03	0.85±0.02	0.59±0.08	0.90±0.05	0.59±0.01	6.77±0.16	50.06±0.91	15.95±0.76	
		2.05	2.17±0.11	0.54±0.01	0.67±0.03	0.54±0.18	0.48±0.07	0.93±0.02	0.90±0.01	0.97±0.03	0.68±0.02	7.53±0.32	49.20±1.61	18.27±1.62	
	Irrigated	0.07	4.22±0.46	3.96±0.61	1.01±0.07	0.47±0.02	0.82±0.03	0.53±0.10	0.47±0.17	0.40±0.07	0.61±0.13	10.66±1.35	42.83±3.59	18.03±1.11	
Arbosana		0.67	4.37±0.24	0.62±0.17	1.17±0.03	0.43±0.07	0.79±0.03	0.62±0.04	0.66±0.03	0.70±0.03	0.49±0.04	9.71±0.40	46.15±1.58	14.38±1.03	
		2.30	5.44±0.24	0.79±0.04	0.83±0.04	0.46±0.08	0.68±0.01	0.74±0.05	0.72±0.04	0.90±0.04	0.91±0.11	10.24±0.64	54.38±1.94	18.15±0.61	
		0.15	11.77±0.29	0.99±0.09	0.68±0.02	0.47±0.05	0.33±0.11	0.63±0.01	0.53±0.02	0.72±0.02	1.00±0.07	16.40±0.33	12.08±0.82	6.96±0.29	
	Rainfed	0.95	10.29±0.34	0.56±0.08	0.63±0.02	0.47±0.10	0.53±0.02	0.55±0.01	0.49±0.03	0.76±0.05	0.41±0.07	14.49±0.60	10.97±0.83	6.65±0.34	
		2.11	11.21±0.29	0.92±0.04	0.69±0.08	0.44±0.09	0.48±0.12	0.56±0.06	0.41±0.03	0.87±0.05	1.84±0.24	17.11±0.31	10.43±0.55	6.60±0.32	
	Irrigated	0.07	17.45±0.62	2.19±0.06	1.14±0.05	0.50±0.14	0.62±0.01	0.57±0.03	0.48±0.02	0.64±0.02	0.48±0.08	22.62±0.72	12.45±0.85	7.10±0.35	
	0.58	16.86±0.54	0.80±0.25	1.17±0.05	0.44±0.12	0.62±0.02	0.57±0.01	0.43±0.03	0.65±0.02	0.49±0.06	22.73±0.43	11.04±0.81	6.63±0.28		

Value ± Standard deviation of the model

Table 6. Optimal values for volatile compound and chlorophylls response

Cultivar	Total LOX pathway volatile compounds						Chlorophylls			
	Irrigation Management	Maturity Index (MI)	Maximum value (mg/kg)	Diameter (mm)	Temperature (°C)	Time (min)	Maximum value (mg/kg)	Diameter (mm)	Temperature (°C)	Time (min)
Arbequina		0.20	17.29±1.66	In range	20.00	In range	32.24±2.06	4.50	40.00	90.00
	Rainfed	1.31	18.48±0.58	In range	25.91	50.47	11.23±0.54	4.50	40.00	90.00
		2.56	17.90±0.68	4.50	25.24	90.00	13.65±1.15	4.50	40.00	90.00
		0.16	27.83±0.98	In range	20.00	90.00	18.42±0.63	4.50	40.00	90.00
	Irrigated	1.11	34.94±0.81	6.50	20.00	90.00	8.30±0.70	4.50	40.00	90.00
		2.52	31.80±1.20	In range	20.00	90.00	18.27±0.63	4.50	40.00	90.00
Koronelki		0.16	10.03±0.52	6.50	20.00	90.00	60.13±4.06	4.50	40.00	90.00
	Rainfed	1.68	6.77±0.16	6.50	20.00	90.00	50.06±0.91	4.50	40.00	90.00
		2.05	7.53±0.32	6.50	20.00	In range	49.20±1.61	4.50	40.00	88.56
		0.07	10.66±1.35	In range	20.00	In range	42.83±3.59	4.50	40.00	90.00
	Irrigated	0.67	9.71±0.40	In range	20.00	30.00	46.15±1.58	In range	40.00	90.00
		2.30	10.24±0.64	In range	21.53	In range	54.38±1.94	4.50	40.00	90.00
Arbosana		0.15	16.40±0.33	In range	22.36	49.77	12.08±0.82	4.50	40.00	90.00
	Rainfed	0.95	14.49±0.60	4.50	20.00	55.97	10.97±0.83	4.50	40.00	89.99
		2.11	17.11±0.31	4.50	26.41	90.00	10.43±0.55	4.50	40.00	90.00
		0.07	22.62±0.72	4.50	20.00	90.00	12.45±0.85	4.50	40.00	90.00
	Irrigated	0.58	22.73±0.43	4.50	20.00	90.00	11.04±0.81	4.50	40.00	90.00

Value ± Standard Deviation of the model

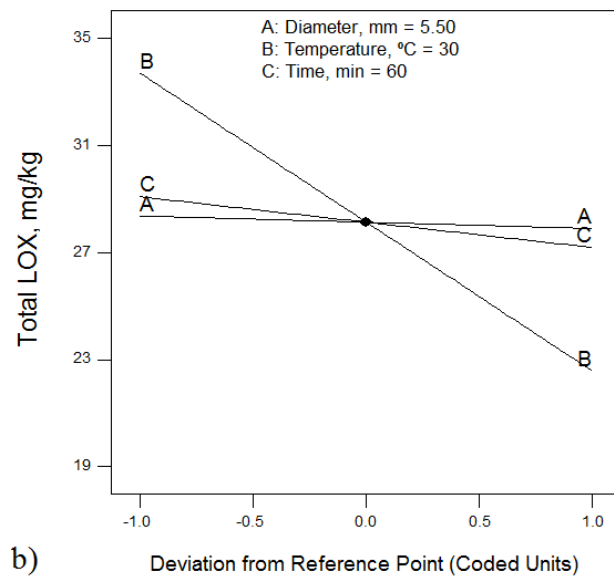
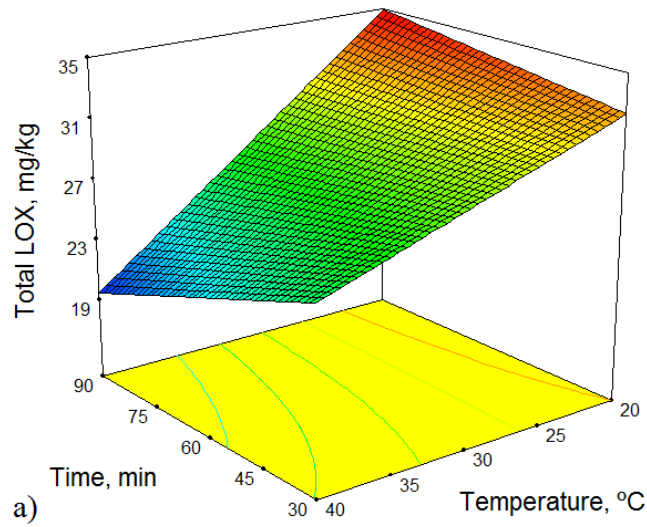


Figure 1. a) Response surface and b) perturbation graphic of the effects of temperature and time on the total LOX volatile content for Arbequina cultivar (irrigated, MI=1.11), for a diameter of 5.5 mm.

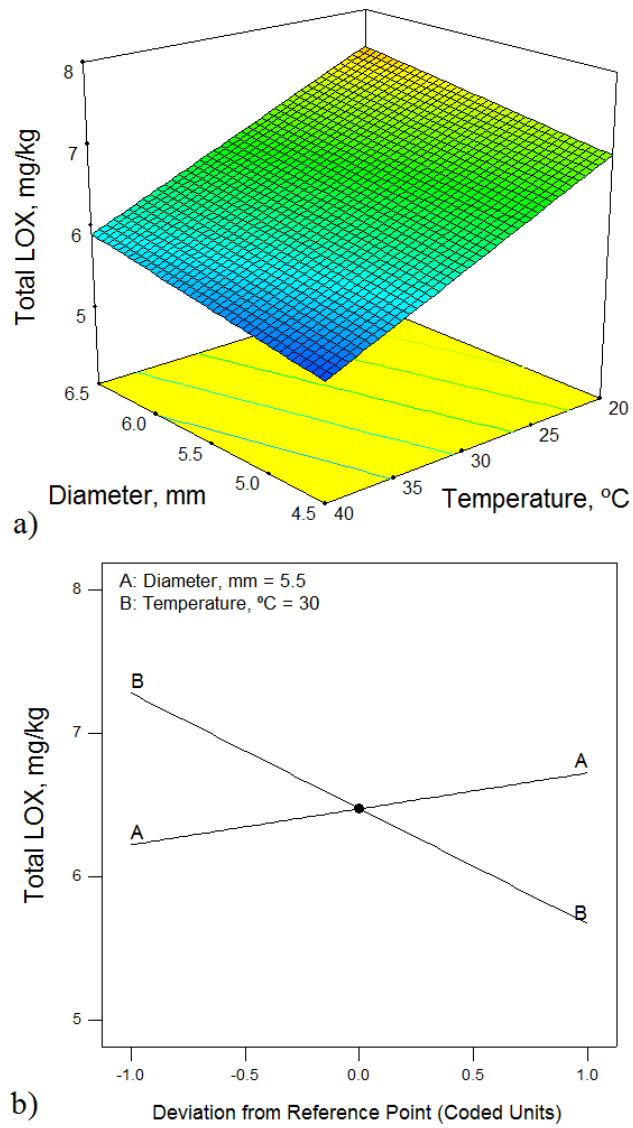


Figure 2. a) Response surface and b) perturbation graphic of the effects of temperature and time on the total LOX volatile content for Koroneiki cultivar (rainfed, MI=2.05), time do not have influence.

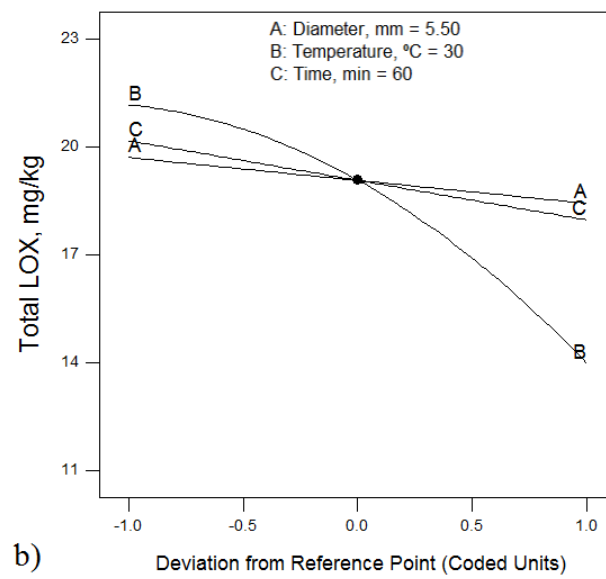
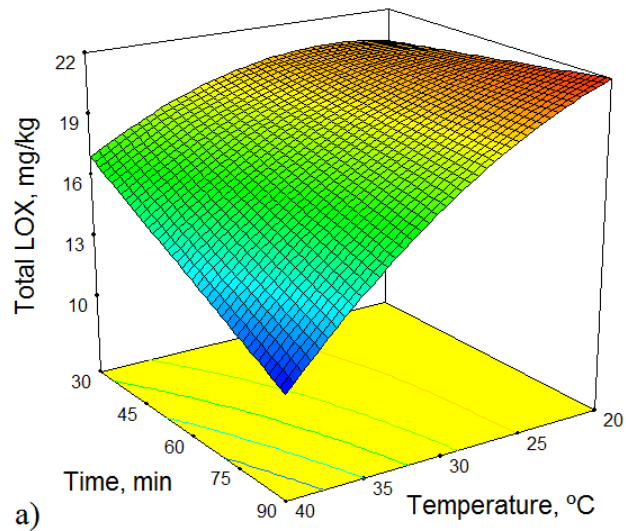


Figure 3. a) Response surface and b) perturbation graphic of the effects of temperature and time on the total LOX volatile content for Arbosana cultivar (irrigated, MI=0.07), for a diameter of 5.5 mm.

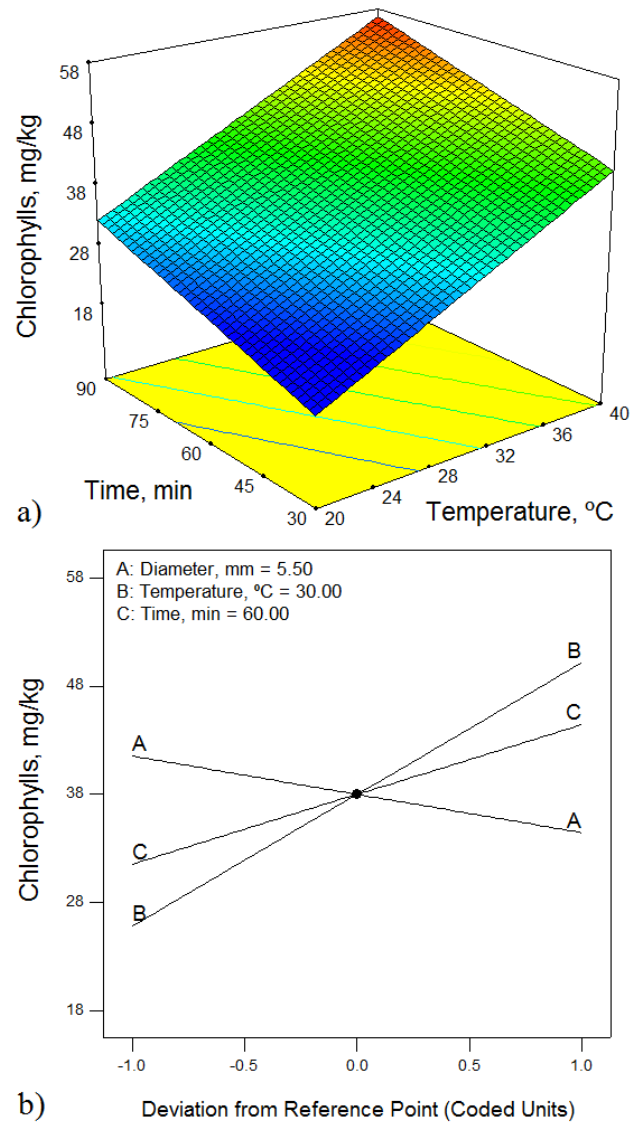


Figure 4. a) Response surface and b) perturbation graphic of the effects of temperature and time on the chlorophyll content for Koroneiki cultivar (rainfed, MI=0.16), for a diameter of 5.5 mm.

ARTÍCULO 5

Título: **Industrial production of a balanced virgin olive oil**

Autores: Alfonso M. Vidal; Sonia Alcalá; Antonia de Torres; Manuel Moya; Francisco Espínola

Publicación: LWT-Food Science and Technology 97, 588–596 (2018)

Cuartil: Q1 (Food Science & Technology)

Índice de impacto (JCR 2018): 3,714

Índice de impacto (5 años): 4,000

doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.054>



Industrial production of a balanced virgin olive oil

Alfonso M. Vidal, Sonia Alcalá, Antonia de Torres, Manuel Moya, Francisco Espínola*

Dept. Chemical, Environmental and Materials Engineering, Universidad de Jaén, Paraje Las Lagunillas, Edif. B-3, 23071 Jaén, Spain



ARTICLE INFO

Keywords:

Virgin olive oil
Extraction yield
Phenolic compounds
Volatile compounds
Response surface methodology
Chemical compounds studied in this article:
Hydroxytyrosol (PubChem CID: 82755)
Tyrosol (PubChem CID: 10393)
Oleocanthal (PubChem CID: 11652416)
Pinoresinol (PubChem CID: 73399)
trans-2-Hexenal (PubChem CID: 5281168)
Hexanal (PubChem CID: 6184)
trans-2-Hexen-1-ol (PubChem CID: 5318042)
1-Penten-3-one (PubChem CID: 15394)

ABSTRACT

The aim of this work is to obtain a balanced commercial virgin olive oil (VOO) using response surface methodology at an industrial level under continuous working conditions. Thus, a factorial design was developed with three factors: sieve size of the hammer mill, temperature, and malaxing time. Forty different responses were modulated, including extraction efficiency, but with special attention to phenolic and volatile compounds because they are responsible for the taste and aroma of VOO. The conditions for malaxing were 22 and 32 °C for 60 and 120 min using 5 and 6 mm sieve sizes.

After modeling the responses, the highest extraction efficiency was obtained at 32 °C and 120 min; similar conditions were necessary to obtain the maximum contents of chlorophyll, carotenoid, and phenolic compounds, but the maximum content of volatile compounds was obtained at 22 °C. Therefore, it has also realized a combined optimization of total phenolics and total volatiles.

1. Introduction

Different groups of compounds present in virgin olive oil (VOO) are responsible for its recognized nutritional and health properties. These include aromatic and phenolic compounds, which are responsible for the taste and aroma of olive oil. Volatile compounds play an important role in consumers' sensory perceptions because they are responsible for the main sensory attributes and originate during olive oil production. Linoleic and linolenic acid are transformed to compounds with six and five carbon atoms via the lipoxygenase (LOX) pathway (Angerosa, Mostallino, Basti, & Vito, 2000; Sánchez & Salas, 2003). The content and composition of volatile compounds are influenced by several technological and agronomic factors; however, enzymatic activity is decisive (Luna, Morales, & Aparicio, 2006).

The phenolic compounds present in olive oil are formed by a complex group of chemical compounds. The composition of these compounds is determined by the production process, variety and maturation of olives, and other agronomic factors (De Torres et al., 2018; Romero, Saavedra, Tapia, Sepúlveda, & Aparicio, 2016; Servili et al., 2004). Numerous health benefits are described in the literature for these compounds (Tripoli et al., 2005; European Commission Regulation 432/2012). The European Commission states that “olive oil polyphenols contribute to the protection of blood lipids from oxidative

stress” (European Commission Regulation 432/2012).

Among the many phenolic compounds present in VOO, the dialdehyde form of decarboxymethyl oleuropein aglycone (3,4-DHPEA-EDA) named oleacein by Hansen et al. (1996) and the dialdehyde form of decarboxymethyl ligstroside aglycone (*p*-HPEA-EDA) named oleocanthal by Beauchamp et al. (2005) are present in the greatest proportions. These compounds originate during olive oil processing from the hydrolysis of oleuropein and ligstroside (Montedoro, Servili, & Baldioli, 2002). Oleocanthal has anti-inflammatory properties that are similar to non-steroidal anti-inflammatory drugs, such as ibuprofen (Beauchamp et al., 2005).

The sieve size of the hammer mill, temperature, and malaxing time are one of the main technological factors that influence the production process of VOO. These parameters can be modified to obtain an excellent quality product. Obtaining a high quantity of volatile compounds determined in the present study, which are highly prized by consumers, is important, but a good profile of healthy phenolic compounds is also desired. In summary, the parameters to elaborate the process can be modified to obtain a balance between volatile phenolic and phenolic compounds.

The main novelty of this work lies in the combined study of the technological variables at an industrial level. Moreover, statistical design of experiments and response surface methodology (RSM) were

* Corresponding author.

E-mail address: fespino@ujaen.es (F. Espínola).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.07.054>

Received 15 February 2018; Received in revised form 24 July 2018; Accepted 25 July 2018

Available online 26 July 2018

0023-6438/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Table 1
Experimental design and compositional characteristics and maturity index of the processed olives (*Olea europaea* L. cv. Picual)^a.

Design points	Factors			Olives			
	Sieve size (mm)	Temperature (°C)	Time (min)	Maturity index	Moisture (%)	Oil (%)	Solids (%)
1	6	32	120	1.74	56.30	20.69	23.01
2	5	32	120	1.78	56.46	20.51	23.03
3	5	32	60	1.85	56.07	20.32	23.61
4	6	32	60	1.87	54.07	20.31	25.62
5	6	22	120	1.68	56.75	20.56	22.69
6	5	22	120	1.80	56.94	19.64	23.42
7	5	22	60	1.90	57.18	20.38	22.44
8	6	22	60	1.92	51.77	17.53	30.71
9 ^b	6	32	120	1.93	55.52	20.71	23.76

^a Means of three replicates: all with variation coefficient < 5%.

^b Circular grid holes.

applied to perform the experimental work and analyze the results (Montgomery, 2012). RSM has been used as an optimization tool for a wide range of food technology issues, but it has seldom been applied specifically to olive oil.

2. Materials and methods

2.1. Olive samples

About 50,000 kg of olive fruits, *Olea europaea* L., from the traditional Picual cultivar were used for these trials over two days. The olives were mechanically harvested in mid-November 2016. Then, the fruits were immediately transported to the processing plant located in Mancha Real (Jaén, Spain). The maturity index of the fruits was determined according to the method described by Espínola, Moya, Fernández, and Castro (2009), which is based on an assessment of the olive skin and pulp color. The moisture content was determined by drying the olive paste at 105 °C, and the oil content was determined using the Soxhlet method, as describe in European Commission Regulation, 2568/1991 and later modifications. Table 1 shows the measured maturity index, moisture, and fat contents, which are considered homogeneous for the nine tests that were performed. However, a small difference can be observed for the olives in assay 8 with respect to the others.

2.2. Industrial olive oil extraction plant

Olive fruits were processed within 24 h of harvesting in a continuous olive oil extraction plant (Model SPI 77, Pieralisi, Italy) working at a constant capability of 2500 kg/h (hammer crusher, mixer with two horizontal vessels of 4000 L, two phase centrifugal decanter with a processing capacity of 2500 kg/h, operating at 2130 × g and vertical centrifuge operating at 9558 × g). To calculate the extraction efficacy, samples of olive paste after crushing and pomace from the decanter were collected at three different times during each test. The efficacy was calculated using Equation (1).

$$\text{Efficacy (\%)} = \frac{F_{\text{paste}} - F_{\text{pomace}}}{F_{\text{paste}}} \times 100 \quad (1)$$

F_{paste} and F_{pomace} are the fat contents of the paste and pomace, respectively.

2.3. Experimental design and statistical analysis

Experiments were designed to obtain excellent VOO and to evaluate the industrial extraction efficacy. A factorial design 2³ was developed to evaluate both the oil extractability and the quality of the olive oil (Table 1). The main aim was to establish a valid model that considered

the influence of three factors: sieve size of the hammer crusher, temperature, and malaxing time. The sieve holes were elliptically shaped, and one or two vessels of the kneader were used to achieve different mixing times. The following parameters were tested: sieve sizes of 5 and 6 mm, malaxing temperatures of 22 and 32 °C, and malaxing times of 60 and 120 min. Finally, an experiment was performed using a grid with 6-mm-diameter circular holes for comparison with the elliptical holes (9th test), as shown in Fig. 1.

The experimental results were analyzed using the Design-Expert v. 8.7.1 software (Stat-Ease, Inc., Minneapolis, MN, USA). The models were determined by evaluating the adequacy of the proposed model by assessing the coefficient of determination (R²), Fisher value (F-value) and lack of fit obtained from the analysis of variance (ANOVA). A linear model was used for each response according to Equation (2).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 S + \beta_2 T + \beta_3 t + \beta_{12} ST + \beta_{13} St + \beta_{23} Tt \pm SD \quad (2)$$

S is the sieve size of the crusher (mm), T is the malaxing temperature (°C), t is the malaxing time (min), and SD is the standard deviation. The predicted response (Y) was correlated with a set of coefficients (β): the intercept (β₀), linear coefficients (β₁, β₂, β₃), and interaction coefficients (β₁₂, β₁₃, β₂₃). The statistical significance of the model and the model coefficients were evaluated at a 5% probability level (p-value < 0.05). The models for each response were expressed in terms of the actual factors, regardless of the statistically insignificant terms.

2.4. Oil quality parameters and pigment composition

Acidity, peroxide index, and spectrophotometric indexes (K₂₃₂ and K₂₇₀) were determined according to the European Union standard methods described in European Commission Regulation, 2568/1991 with subsequent amendments. A Shimadzu UV-1800 ultraviolet–visible spectrophotometer was used to determine the spectrophotometric



Fig. 1. Image of the sieves with circular and elliptical holes.

Table 2
Responses of oil extraction efficacy, quality parameters and sensory analysis.

Design points	Efficacy (%)	Acidity (%)	Peroxides (mEq O ₂ /kg)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	Chlorophylls (mg/kg)	Carotenoids (mg/kg)	Total Phenols HPLC (mg/kg)	DPPH (μmol trolox/kg)	Total Volatiles LOX (mg/kg)	Fruity	Bitter	Pungent
1	88.9	0.15	3.38	1.27	0.12	49.6	29.3	338	992	8.93	6.0	3.6	4.3
2	88.8	0.14	2.98	1.24	0.11	32.5	13.1	310	735	11.0	5.4	3.3	3.9
3	80.9	0.15	2.87	1.20	0.10	22.9	10.8	244	526	12.0	5.4	3.0	3.9
4	82.0	0.14	3.12	1.19	0.09	21.8	10.3	292	623	11.4	5.6	3.2	4.0
5	80.3	0.11	3.28	1.10	0.08	13.2	7.9	198	487	11.5	6.0	3.4	3.6
6	80.9	0.10	3.13	1.09	0.07	13.8	8.2	204	368	12.2	5.6	3.4	3.8
7	81.3	0.11	2.54	1.07	0.08	12.5	8.1	181	236	12.0	5.2	3.2	3.4
8	74.4	0.12	2.90	1.18	0.08	13.0	7.9	216	344	11.2	5.6	3.4	4.1
9 ^a	86.9	0.14	2.38	1.32	0.11	31.7	13.2	398	1249	11.1	4.4	3.5	4.0

The values that appear crossed out have been deleted to obtain the mathematical model.

^a Circular grid holes.

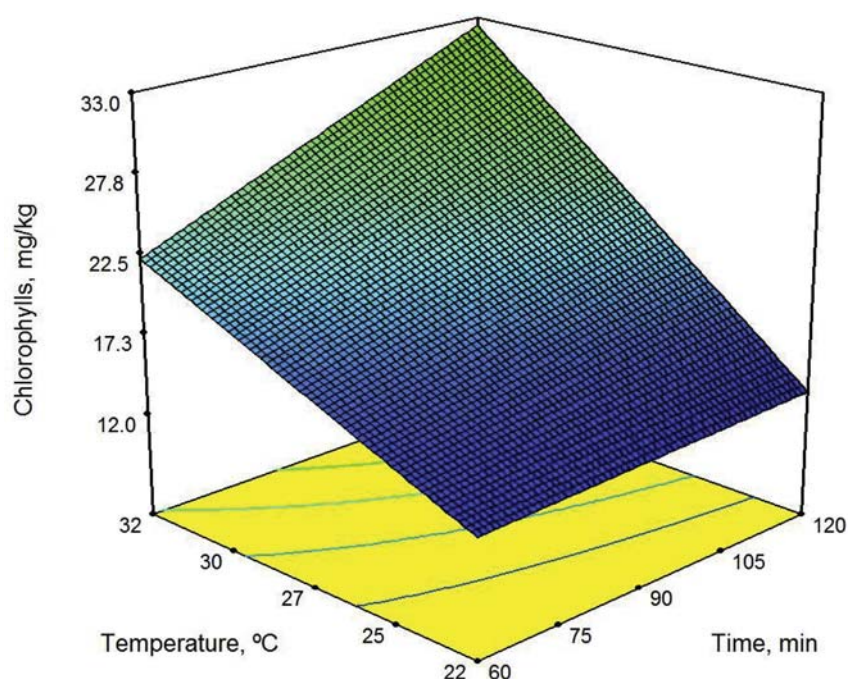


Fig. 2. Response surface of the effects of time and temperature on the chlorophyll content in the obtained oils.

indexes.

Chlorophylls and carotenoids were measured in the oil samples following the procedure proposed by Minguéz-Mosquera, Rejano-Navarro, Gandul-Rojas, Sanchez-Gomez, and Garrido-Fernandez (1991). Absorbance was measured using a Shimadzu UV-1800 ultraviolet–visible spectrophotometer. The absorbance at 670 nm was used to determine the chlorophyll pigments and that at 470 nm was used to measure the carotenoid pigments in the olive oil using cyclohexane as a solvent. The pigment concentration in the samples is expressed as milligram of pigment per kilogram of oil.

2.5. Volatile compounds

Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography with a flame ionization detector (GC-FID) were used to determine the profile of the volatile compounds in the oil samples. Oil (2 g) was placed in a 20-mL amber glass vial tightly capped with a polytetrafluoroethylene/silicone septum and a magnetic cap. The vial was heated to 40 °C for 10 min so that the volatile compounds could reach equilibrium in the headspace. Then, an SPME needle was inserted through the septum and the fiber was exposed for 40 min. The SPME

fiber (2-cm long and 50/30-μm thick) was purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA) and was composed of carboxen/divinylbenzene/polydimethylsiloxane. The fiber was conditioned following the supplier's instructions.

GC-FID analysis was conducted on a model 7890B (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The gas chromatograph was equipped with a split/splitless injector and an FID. The volatile compounds adsorbed on the fiber were desorbed into the injector port for 1 min in splitless mode. The DB-WAXetr polyethylene glycol capillary column (30-m long, 0.25-mm internal diameter, 0.25-μm-thick coating (Agilent Technologies, USA)) was used for chromatographic separation. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. The injection temperature was 260 °C, and the detector temperature was 280 °C. The oven temperature was initially 40 °C for 10 min. Then, the temperature was increased at 3 °C/min to 160 °C and immediately increased with a ramp at 15 °C/min to 200 °C and held for 5 min to the end. Integrations were performed using the Agilent OpenLAB ChemStation C.01.06[61] Software (Agilent Technologies, CA, USA).

Chromatographic peaks were quantified using the internal standard method. 4-Methyl-2-pentanol was used as the internal standard; 39 analytical standards were used as the external standards: acetic acid, 1-

Table 3
Responses for individual phenolic compounds by HPLC (mg/kg).

Design points ^a	1	2	3	4	5	6	7	8	9 ^b
hydroxytyrosol	6.2	6.7	6.6	6.4	6.7	8.8	8.1	8.4	0.0
tyrosol	2.3	2.0	1.8	2.0	1.5	1.6	1.3	1.4	2.1
vanillin	1.7	1.9	1.8	1.4	0.7	1.3	1.2	1.2	1.9
<i>p</i> -coumaric acid	1.7	1.7	1.8	2.1	1.6	2.1	2.0	2.5	1.9
ferulic acid	5.3	4.2	3.2	3.4	1.2	1.3	0.9	1.0	6.7
cinnamic acid	1.6	1.2	1.3	1.8	1.3	1.5	1.2	1.4	1.4
3,4-DHPEA-EDA (oleacein)	88.6	61.0	47.4	64.8	36.3	27.1	25.4	39.8	96.5
3,4-DHPEA-EA	85.3	53.6	32.3	36.9	20.4	22.1	15.9	17.8	124.5
<i>p</i> -HPEA-EDA (oleocanthal)	62.3	62.0	50.5	53.7	41.0	40.0	38.7	41.6	72.5
<i>p</i> -HPEA-EA	17.8	22.5	12.0	15.9	8.9	9.6	7.3	8.8	30.0
Pinoresinol + 1-acetoxypinoresinol	14.1	9.9	11.9	15.1	12.1	9.1	12.0	14.2	10.8
luteolin	7.5	7.5	7.0	7.3	6.4	6.7	6.5	8.2	5.2
apigenin	4.5	5.0	6.4	7.7	6.3	3.8	7.3	7.7	6.3

The values that appear crossed out have been deleted to obtain the mathematical model.

3,4-DHPEA-EDA: dialdehyde form of decarboxymethyl oleuropein aglycone.

p-HPEA-EDA: dialdehyde form of decarboxymethyl ligstroside aglycone.

3,4-DHPEA-EA: aldehyde and hydroxylic form of oleuropein aglycone.

p-HPEA-EA: aldehyde and hydroxylic form of ligstroside aglycone.

^a For values of factors see Table 1.

^b circular grid holes.

penten-3-one, pentan-1-ol, *trans*-2-pentenal, 1-penten-3-ol, pentanal, 2-methyl-1-butanol, hexan-1-ol, hexanal, *cis*-3-hexen-1-ol, heptanal, octane, 1-octen-3-ol, octanal, hexyl acetate, *cis*-3-hexenyl acetate, propionic acid, *trans*,*trans*-2,4-decadienal, butanoic acid, and 2-methylpropan-1-ol were supplied by Fluka (Buchs, Switzerland); *trans*,*trans*-2,4-heptadienal, 4-methylpentan-2-ol, *trans*-2-heptenal, *trans*-2-penten-1-ol, heptan-2-ol, 2-methylbutanal, 3-methyl butanoic acid, 3-methylbutanal, ethyl acetate, 2-methylpropanoic acid, *cis*-3-hexenal, *trans*,*trans*-2,6-nonadienal, ethyl butanoate, and *trans*-2-hexenyl acetate were supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); pentan-3-one and nonanal were supplied by Supelco (Bellefonte, PA, USA); *trans*-2-hexen-1-ol and *cis*-2-penten-1-ol were supplied by SAFC; *trans*-2-hexenal was supplied by Acrös Organics (Geel, Belgium). The results are expressed as milligram of each compound standard per kilogram of oil.

2.6. Phenolic compounds and antioxidant potential

The method proposed by the International Olive Council (COI/T.20/Doc No 29) was used to identify the phenol compounds present in VOOs using high performance liquid chromatography (HPLC). The liquid chromatograph (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) consisted of the following components: an elution pump (model LC-20AD), solvent degasser (model DGU-20A5), refrigerated automatic injector (model SIL-20ACHT), column oven (model CTO-10A5vpC), and diode array detector (model SPD-M20); the LC LabSolutions V.5.42.SP3 software (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) was used. The column was a BDS Hypersil C18 column (Thermo Scientific, USA), the particle size was 5 µm, the column size was 25 cm, and the internal diameter was 4.6 mm. The mobile phase was a ternary gradient made up of 0.2% orthophosphoric acid-water (A), methanol (B), and acetonitrile (C). The elution flow was 1 mL/min. The oven temperature was set at 30 °C, and the injected sample volume was 20 µL. The UV detector provided a signal at 280 nm. The phenolic compounds were quantified by adding syringic acid as an internal standard and tyrosol as an external standard. The results are expressed as milligram of tyrosol per kilogram of oil. The phenolic compounds were identified by comparison with analytical standards.

The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity was used to determine the antioxidant potential. A DPPH stock solution (0.1 mmol/L) was prepared in methanol and further diluted to 1.0 AU at 515 nm prior to use. Then, to a sample of 2 g of oil, an extraction with 4 mL of methanol: water (60:40) was carried out, repeating the extraction one more time. The extracts were combined and

brought to a volume of 10 mL. The measure of antioxidant capacity was made to this extract. Aliquots of the extract (20–2000 mL) were suitably diluted to a volume of 200 mL and added to 1.5 mL aliquots of DPPH solutions in cuvettes, agitated, and stored in the dark for 60 min; then, the absorbance was measured at 515 nm using methanol as a blank. The percentage of the scavenged DPPH radicals was calculated according to Equation (3):

$$\%DPPH_{scavenge} = \frac{[DPPH]_0 - [DPPH]_{sample}}{[DPPH]_0} \times 100 \quad (3)$$

[DPPH]₀ and [DPPH]_{sample} are concentration of the control and sample, respectively. The concentration of DPPH has been calculated by interpolation in a calibration curve, which represents the absorbance against DPPH concentration. Another calibration curve which represents the percentage of inhibition against the Trolox concentration has been used to convert the percentage of inhibition into Trolox concentration. Antioxidant capacity of oil referred to standard concentration was obtained.

2.7. Sensory analysis

Quantitative descriptive sensory analysis of the VOO samples was accomplished by a panel of eight experienced panelists according to the method proposed by the International Olive Council described in European Commission Regulation, 2568/1991 with subsequent amendments, Annex XII. The panel members belong to the Agri-food Laboratory of Granada (Granada, Spain), which is accredited according to the EN ISO/IEC 17,025:2007 standard and recognized by the International Olive Council from December 1, 2016 to November 30, 2017 for sensory analysis of VOOs. Oils were analyzed to determine positive attributes: fruitiness, bitterness, and pungency; the presence of defects was also considered.

3. Results and discussion

3.1. Effect of technological factors on the extraction efficacy, quality parameters, and pigment composition

Table 2 shows the values obtained for the extraction efficiency, and the mathematical model found to predict the extraction efficacy is shown in Table 4; this shows that the extraction efficiency increased with temperature and malaxing time, and no statistical significance with screen size was observed within the studied range (i.e., 5–6 mm).

Table 4

The proposed models (Eq. (2)) in terms of actual factors and statistical parameters. Analysis of Variance (ANOVA) for the fit of experimental data was used.

Response	Model ^a	p-value	R ²	Std. Dev.
Efficacy (%)	58.5775 + 0.5925 T + 0.084,583 t	0.0241	0.7747	2.66
Acidity (%)	0.033 + 0.0035 T	0.0004	0.8909	0.0071
Peroxides (mEq O ₂ /kg)	0.9275 + 0.29 S + 0.005583 t	0.0169	0.8046	0.14
K ₂₃₂	0.857 + 0.0115 T	0.0092	0.7044	0.043
K ₂₇₀	0.107–0.001 T - 0.001 t + 0.000041,667 T t	0.0094	0.9281	0.0061
Chlorophylls (mg/kg)	11.56 + 0.02 T - 0.33,217 t + 0.015,667 T t	0.0002	0.9973	0.56
Carotenoids (mg/kg)	7.84 + 0.005 T - 0.090,833 t + 0.0041,667 T t	0.0012	0.9921	0.25
Total phenolics HPLC (mg/kg)	-12 + 9.625 T	0.0038	0.7770	29.77
DPPH (μmol trolox/kg)	-1552.55 + 145.25 S + 36.025 T + 3.55,417 t	0.0043	0.9517	70.57
Total volatiles LOX pathway (mg/kg)	12.12–0.7 S + 0.14 T + 0.051,833 t - 0.0021,667 T t	0.0160	0.9920	0.071
<i>Phenolic compounds (mg/kg)</i>				
hydroxytyrosol	7.24	0.0175	0.6373	0.66
tyrosol	- 0.1525 + 0.0575 T + 0.00375 t	0.0025	0.9091	0.12
vanillin	1.43–0.3 S + 0.06 T	0.0113	0.8333	0.19
p-coumaric acid	1.9375			0.3
ferulic acid	- 5.408 + 0.259 T + 0.009 t	0.0002	0.9847	0.21
cinnamic acid	1.4125			0.21
3,4-DHPEA-EDA (oleacein)	- 90.544 + 11.32 S + 2.747 T	0.0049	0.9299	5.02
3,4-DHPEA-EA	5.52 + 0.315 T - 0.462 t + 0.024,333 T t	0.0024	0.9874	2.15
p-HPEA-EDA (oleocanthal)	24.675 + 1.85 S + 0.225 T–0.34,983 t + 0.016,167 T t	0.0007	0.9955	1.00
p-HPEA-EA	4.87 + 0.09 T - 0.16,333 t + 0.008333 T t	0.018	0.9004	2.24
Pinoresinol + 1-acetoxypinoresinol	- 2.025 + 3.15 S - 0.03333 t	0.0033	0.8988	0.79
luteolin	7.1375			0.61
apigenin	9.65–0.039,583 t	0.0081	0.7163	0.86
<i>Volatile compounds (mg/kg)</i>				
LOX pathway				
hexanal	1.0015–0.012 T - 0.00125 t	0.0191	0.7946	0.045
hexan-1-ol	0.465			0.044
trans-2-hexenal	6.156–0.86 S + 0.1045 T + 0.033,167 t - 0.00141,667 T t	0.0298	0.9467	0.20
trans-2-hexen-1-ol	0.70,625			0.21
cis-3-hexen-1-ol	1.5625			0.19
cis-3-hexenyl acetate	4.7534–0.253 S - 0.0317 T	0.0053	0.9269	0.08
1-penten-3-ol	0.8275			1.28
1-penten-3-one	0.8025			0.10
cis-2-penten-1-ol	0.4825			0.47
Sugar fermentation				
ethanol	4.76,875			0.96
acetic acid	0.51,125			0.051
Other compounds				
trans-2-pentenal	0.35,375			0.046
pentan-3-one	0.2925			0.042
nonanal	2.8425			0.51
<i>Sensory analysis</i>				
fruity	2.95 + 0.4 S + 0.005 t	0.0038	0.8929	0.11
bitter	2.0125 + 0.175 S + 0.00375 t	0.0451	0.7104	0.12
pungent	3.875			0.28

S is the diameter crusher holes (mm), T is the malaxing temperature (°C), t is the malaxing time (min).

R² is the determination coefficient, Std. Dev. is standard deviation.^a According to coefficients of model (Equation (2)), only significant values are included (p-value < 0.05).

The maximum extraction efficiency was 87.7% at 32 °C and 120 min, and the minimum value was 76.7% at 22 °C and 60 min, representing a difference of 11.0%. The same trend was observed in the literature with respect to temperature and time, but several authors observed an influence by the sieve size. Inarejos-García, Fregapane, and Salvador (2011) used hammer crushers and found a higher oil yield with a 5-mm grid diameter than with larger diameters (6 and 7 mm); however, they used circular holes while we worked with elliptical holes.

Circular grid holes were used at 9th design point. Comparing the extraction efficiency, 86.9%, with the value predicted by the model under the same temperature and time conditions, 87.7%, we conclude that there are no statistically significant differences because the model error, standard deviation, is 2.66%.

Regarding the quality parameters and pigment composition, which are shown in Table 2, we observed slight influences: the malaxing temperature affected the acidity and K₂₃₂ spectrophotometric index, the

sieve size and malaxing time affected the peroxides, and the malaxing temperature and time affected the K₂₇₀ spectrophotometric index (Table 4); all the obtained values were within the limits for extra virgin olive oil according to European Union standards (European Commission Regulation, 1308/2013). Regarding the 9th design point, a significant difference was only observed for the peroxides: 2.38 mEq O₂/kg using circular grid holes versus 3.34 mEq O₂/kg predicted by the model using elliptical grid holes.

The model results for the chlorophyll and carotenoid contents (Table 4) were the same; these values only depended on the temperature and mixing time. The predicted chlorophyll content is shown in Fig. 2; the chlorophyll content increased with both temperature and time, but the temperature provided a stronger influence. Comparing the chlorophylls and carotenoids contents in 9th design point with the values predicted by the models under the same conditions, we can conclude that there are no statistically significant differences.

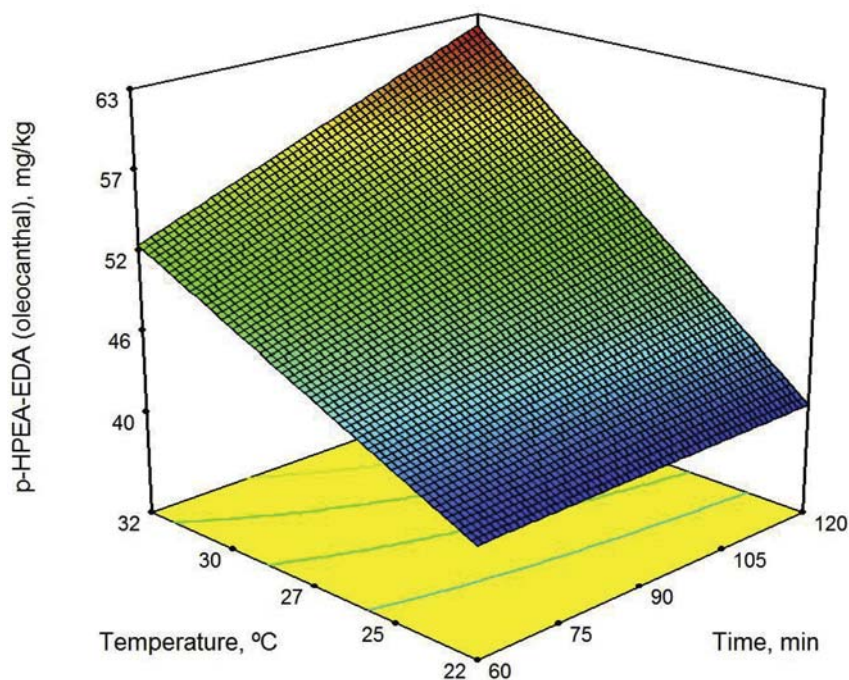


Fig. 3. Response surface of the effects of time and temperature on the oleocanthal content in the obtained oils.

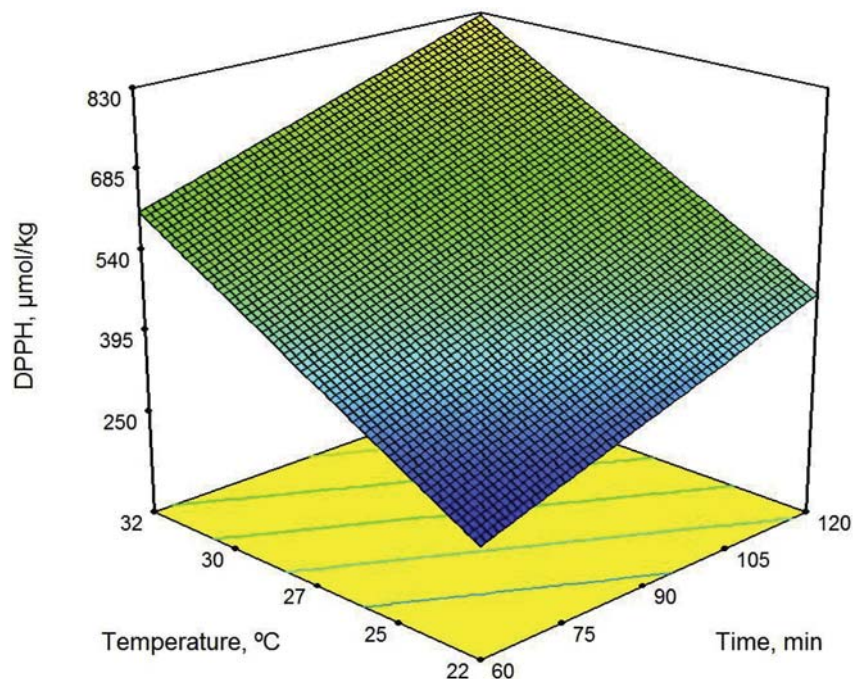


Fig. 4. Response surface of the effects of time and temperature on the antioxidant capacity as determined from the DPPH free radical scavenging activity.

3.2. Effect of technological factors on phenolic compounds and antioxidant activity

Phenolic compounds play a very important role in VOO because of their large antioxidant activity, which contributes to the shelf life of the oils and their typical bitter taste (Zribi et al., 2013). Table 2 shows the total phenolics determined by HPLC (mg/kg), sum of the individual phenolic compounds, and the antioxidant potential determined from the DPPH free radical scavenging activity ($\mu\text{mol trolox/kg}$); Table 3 shows the individual content of phenolic compounds determined by HPLC (mg/kg); Table 4 shows the model results for all responses,

different model results are observed, which could be used to predict the responses. The software generated regression equations after discarding the statistically insignificant terms ($p\text{-value} > 0.05$); however, to support the hierarchy, some linear terms were not eliminated from the models, although they were statistically insignificant.

The models show that the temperature has a major influence on the amount of phenolic compounds (Table 4), which generally increased as temperature increased (except for hydroxytyrosol, *p*-coumaric acid, cinnamic acid, lignans (pinoselinol + 1-acetoxypinoselinol), and flavonoids (luteolin and apigenin)). However, the influence of sieve size and malaxing time was different for each phenolic compound, but these

Table 5
Responses for individual volatile compounds (mg/kg).

Design points ^a	1	2	3	4	5	6	7	8	9 ^b
LOX pathway									
hexanal	0.40	0.51	0.54	0.57	0.57	0.63	0.67	0.63	0.45
hexan-1-ol	0.36	0.49	0.47	0.48	0.47	0.49	0.50	0.46	0.41
<i>trans</i> -2-hexenal	2.90	3.72	4.65	3.43	3.70	4.23	4.28	3.41	4.85
<i>trans</i> -2-hexen-1-ol	0.23	0.64	0.80	0.86	0.73	0.78	0.89	0.72	0.57
<i>cis</i> -3-hexen-1-ol	1.61	1.58	1.40	1.94	1.45	1.42	1.40	1.70	1.15
<i>cis</i> -3-hexenyl acetate	2.25	2.43	2.52	2.19	2.21	2.89	2.69	2.54	2.10
1-penten-3-ol	0.23	0.31	0.40	0.50	0.36	0.39	0.43	0.40	0.27
1-penten-3-one	0.56	0.80	0.78	0.90	0.83	0.85	0.83	0.87	0.81
<i>cis</i> -2-penten-1-ol	0.39	0.51	0.48	0.56	0.47	0.48	0.49	0.48	0.49
Sugar fermentation									
ethanol	4.58	4.80	5.60	3.51	4.99	4.82	6.39	3.55	7.71
acetic acid	0.53	0.53	0.40	0.55	0.54	0.54	0.53	0.47	0.95
Other compounds									
<i>trans</i> -2-pentenal	0.25	0.38	0.35	0.39	0.35	0.39	0.38	0.34	0.36
pentan-3-one	0.31	0.38	0.29	0.30	0.26	0.28	0.28	0.24	0.27
nonanal	1.75	2.56	3.01	3.27	2.85	3.06	3.41	2.83	2.32

The values that appear crossed out have been deleted to obtain the mathematical model.

^a For values of factors see Table 1.

^b Circular grid holes.

parameters have less influence. Thus, in the total phenol HPLC model, only the temperature is shown.

Similar results were reported by other authors studying malaxation for separately milled samples (Ranalli, Pollastri, Contento, Iannucci, & Lucera, 2003; Vekiri & Koutsaftakis, 2002). However, Ben Brahim, Marrakchi, Gargouri, and Bouaziz (2015) used RSM and found that the malaxing time did not significantly affect the phenol content.

The secoiridoid derivatives (3,4-DHPEA-EDA, 3,4-DHPEA-EA, *p*-HPEA-EDA, and *p*-HPEA-EA) were clearly predominant; all of them increased with temperature, and this increase could be attributed to the increased partition coefficient between the oil and water phases, which increased the solubility of these compounds in the oil phase. The results are similar to those obtained by other authors (Fregapane & Salvador, 2013; Gómez-Rico, Inarejos-García, Salvador, & Fregapane, 2009; Kalua, Bedgood, Bishop, &, 2006; Rodis, Karathanos, & Mantzavinou,

2002). The malaxing time positively influenced the secoiridoid derivatives, except for 3,4-DHPEA-EDA. Fig. 3 shows the response surface of the effects of temperature and time on the oleocanthal (*p*-HPEA-EDA) content. A strong positive interaction existed between temperature and time, which implies that the influence of time is greater for high temperature values and the influence of temperature is greater for high time values. This interaction is in accordance with that observed by De Torres, Espínola, Moya, and Castro (2016).

Comparing the value obtained for total phenolics by HPLC in 9th design point (398 mg/kg) with that predicted by the model at the same temperature (296 mg/kg) indicates that higher amounts of phenolic compounds were obtained using circular grid holes.

Regarding the antioxidant potential, which was determined from the DPPH free radical scavenging activity, the model in Table 4 shows the dependency on sieve size, temperature, and malaxing time, without interactions (Fig. 4). This model is similar to the oleocanthal model without interaction.

3.3. Effect of technological factors on volatile compounds

Table 5 shows the contents of volatile compounds grouped based on their probable origin, and Table 4 shows the models. *Trans*-2-hexenal was predominant. The volatiles arising from the LOX cascade (Angerosa et al., 2004; Kalua et al., 2007) decreased with temperature, time, and sieve size. Fig. 5 shows the response surface of the effects of time and temperature on the total volatile LOX pathway content. The mathematical model shows a strong negative interaction between temperature and time (Fig. 5); both high temperature and time values further decreased the volatile compound content of the oil, in agreement with many research papers (Angerosa, Mostallino, Basti, & Vito, 2001; Gómez-Rico et al., 2009; Kalua, Bedgood, Bishop, & Prenzler, 2006; Ranalli, Contento, Schiavone, & Simone, 2001) based on the inactivation of hydroxylase enzymes (Salas, Williams, Harwood, & Sánchez, 1999).

Some studies indicated that the content of volatile compounds increased with increasing malaxing time (Angerosa et al., 2001; Gómez-Rico et al., 2009; Ranalli et al., 2003; Gómez-), but one study indicated otherwise (Reboredo-Rodríguez, González-Barreiro, Cancho-Grande, &

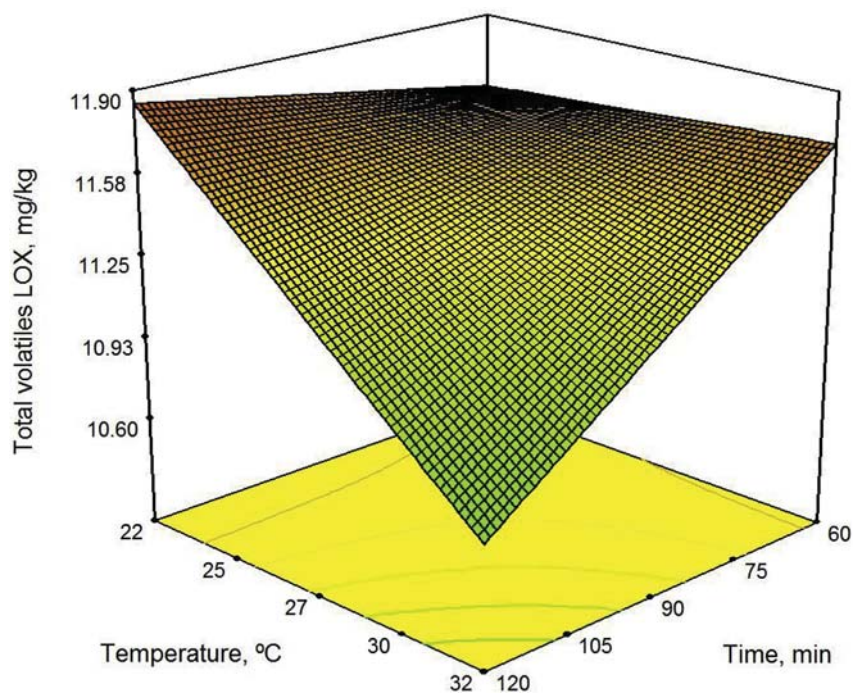


Fig. 5. Response surface of the effects of time and temperature on the total LOX volatile content.

Table 6
Optimum conditions for Picual olive oil based on maximum response.

Individual response				
	Maximun value	Sieve size (mm)	Temperature (°C)	Time (min)
Efficacy (%)	87.7	–	32	120
Chlorophylls (mg/kg)	32.5	5.5	32	120
Carotenoids (mg/kg)	13.1	5.1	32	120
Total phenolics HPLC (mg/kg)	296	5.1	32	73
DPPH (μmol trolox/kg)	898	6.0	32	120
Total volatiles LOX (mg/kg)	12.2	5.0	22	120
Combined responses				
Total phenolics HPLC (mg/kg)	Total Volatiles LOX (mg/kg)	Sieve size (mm)	Temperature (°C)	Time (min)
296	12.1	5.0	32	60

Simal-Gándara, 2014); we observed a slight increase in the malaxing time at low temperatures, e.g., 22 °C, and a large decrease for high temperatures, e.g., 32 °C, which could explain the differences found in the literature.

Comparing the value of total volatiles from the LOX pathway in 9th design point with the value predicted by the model under the same conditions indicates that there are no statistically significant differences.

3.4. Effect of technological factors on sensory analysis

Table 2 shows the values obtained for the positive attributes by the panel; no defects were detected. Table 4 shows the mathematical models for predicting these positive attributes. Only the fruity and bitter models were significant, and both attributes increased with the sieve size and malaxing time. We made numerous attempts to relate them to volatile compounds and phenolic compounds, but neither the experimental values nor the models coincided because the malaxing temperature did not appear with a statistically significant factor in the models that corresponded to these attributes.

3.5. Optimal conditions

To achieve optimal conditions, we aimed to maximize the efficacy, antioxidant activity, and the amounts of chlorophylls, carotenoids, total phenolics HPLC and total volatiles from LOX pathway); Table 6 shows the optimal values obtained from the derived mathematical models using the Design-Expert software. The optimal conditions were at the contour limits. Additionally, the optimal values did not match for all responses. A combined optimization procedure converting total phenolics HPLC and total volatiles from LOX pathway was applied to find an overall optimal value. The results are summarized in Table 6.

4. Conclusion

Temperature provided the main effect on the technological factors on phenolic compounds and antioxidant activity between 22 and 32 °C. The content of phenolic compounds and the antioxidant activity increased when the temperature increased. A good correlation between antioxidant and phenolic compounds was determined. Higher amounts of phenolic compounds could be obtained using circular grid holes.

The effect of technological factors on volatile compounds derived from the LOX cascade, the mathematical model showed a strong negative interaction between the temperature and malaxing time; thus, as the malaxing time increased, the amount of volatile compounds increased at 22 °C, but decreased over time to 32 °C. When the temperature increased from 22 to 32 °C, the total amount of volatiles decreased by 10.9% for a malaxing time of 120 min but decreased when the sieve size increased.

The RSM was used to obtain the optimum conditions for the process by a combined optimization procedure. These conditions were within

the contour limits. The best temperature was 32 °C, the best malaxing time was 60 min, and the best sieve size of crusher was 5 mm.

Acknowledgements

This work is part of the Research Project of Excellence PI11-AGR-7726. The Department of Economy, Innovation and Science of the Andalusian Regional Government is acknowledged for financial support. The authors are also grateful to MONVA S. L. and to the staff at Cortijo Virgen de los Milagros, Mancha Real, Jaén, Spain for their kindness and attention.

References

- Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., & Vito, R. (2000). Virgin olive oil odour notes: Their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chemistry*, 68, 283–287.
- Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., & Vito, R. (2001). Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chemistry*, 72, 19–28.
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., & Montedoro, G. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: Occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, 1054, 17–31.
- Beauchamp, G. K., Keast, R. S. J., Morel, D., Lin, J., Pika, J., Han, Q., et al. (2005). Ibuprofen-like activity in extra-virgin olive oil. *Nature*, 437, 45–46.
- Ben Brahim, S., Marrakchi, F., Gargouri, B., & Bouaziz, M. (2015). Optimization of malaxing conditions using CaCO₃ as a coadjutant: A method to increase yield and quality of extra virgin olive oil cv. chemlali. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie - Food Science and Technology*, 63, 243–252.
- COI/T.20/Doc No 29 (November 2009). Determination of biophenols in olive oils by HPLC [Internet]. Available from: <http://www.internationaloliveoil.org/documents/viewfile/4141met29eng>.
- De Torres, A., Espínola, F., Moya, M., Alcalá, S., Vidal, A. M., & Castro, E. (2018). Assessment of phenolic compounds in virgin olive oil by response surface methodology with particular focus on flavonoids and lignans. *Lwt-food Science and Technology*, 90, 22–30.
- De Torres, A., Espínola, F., Moya, M., & Castro, E. (2016). Composition of secoiridoid derivatives from picual virgin olive oil using response surface methodology with regard to malaxation conditions, fruit ripening, and irrigation management. *European Food Research and Technology*, 242, 1709–1718.
- Espínola, F., Moya, M., Fernández, D. G., & Castro, E. (2009). Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjutant extractant. *Journal of Food Engineering*, 92, 112–118.
- European Commission Regulation 1308/2013. Establishing a common organisation of the markets in agricultural products and repealing council regulations (EEC) no 922/72, (EEC) no 234/79, (EC) no 1037/2001 and (EC) no 1234/2007. L347:671–854.
- European Commission Regulation 2568/1991. On the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. L248:1–83.
- European Commission Regulation 432/2012. Establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to children's development and health. L136:1–40.
- Fregapane, G., & Salvador, M. D. (2013). Production of superior quality extra virgin olive oil modulating the content and profile of its minor components. *Food Research International*, 54, 1907–1914.
- Gómez-Rico, A., Inarejos-García, A. M., Salvador, M. D., & Fregapane, G. (2009). Effect of malaxation conditions on phenol and volatile profiles in olive paste and the corresponding virgin olive oils (olea europaea L. cv. cornicabra). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 3587–3595.
- Hansen, K., Adersen, A., Christensen, S. B., Jensen, S. R., Nyman, U., & Smitt, U. W. (1996). Isolation of an angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitor from olea europaea and olea lancea. *Phytomedicine*, 2, 319–325.
- Inarejos-García, A. M., Fregapane, G., & Salvador, M. D. (2011). Effect of crushing on olive paste and virgin olive oil minor components. *European Food Research and*

- Technology*, 232, 441–451.
- Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Jr., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., & Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, 100, 273–286.
- Kalua, C. M., Bedgood, D. R., Jr., Bishop, A. G., & Prenzler, P. D. (2006). Changes in volatile and phenolic compounds with malaxation time and temperature during virgin olive oil production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7641–7651.
- Luna, G., Morales, M. T., & Aparicio, R. (2006). Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions. *Food Chemistry*, 98, 243–252.
- Minguez-Mosquera, I. M., Rejano-Navarro, L., Gandul-Rojas, B., Sanchez-Gomez, A. H., & Garrido-Fernandez, J. (1991). Color-pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68, 332–336.
- Montedoro, G. F., Servili, M., & Baldioli, M. (2002). The use of biotechnology means during oil mechanical extraction process: Relationship with sensory and nutritional parameters of virgin oil quality. *Acta Horticulturae*, 586, 557–560.
- Montgomery, D. C. (2012). In U. States (Ed.). *Design and analysis of experiments* (8th ed.). John Wiley & Sons Inc.
- Ranalli, A., Contento, S., Schiavone, C., & Simone, N. (2001). Malaxing temperature affects volatile and phenol composition as well as other analytical features of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103, 228–238.
- Ranalli, A., Pollastri, L., Contento, S., Iannucci, E., & Lucera, L. (2003). Effect of olive paste kneading process time on the overall quality of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105, 57–67.
- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., & Simal-Gándara, J. (2014). Improvements in the malaxation process to enhance the aroma quality of extra virgin olive oils. *Food Chemistry*, 158, 534–545.
- Rodis, P. S., Karathanos, V. T., & Mantzavinou, A. (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 596–601.
- Romero, N., Saavedra, J., Tapia, F., Sepúlveda, B., & Aparicio, R. (2016). Influence of agroclimatic parameters on phenolic and volatile compounds of Chilean virgin olive oils and characterization based on geographical origin, cultivar and ripening stage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 583–592.
- Salas, J. J., Williams, M., Harwood, J. L., & Sánchez, J. (1999). Lipoxygenase activity in olive (*olea europaea*) fruit. *JAOCs. Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 1163–1168.
- Sánchez, J., & Salas, J. J. (2003). Biogénesis del aroma del aceite de oliva. In R. Aparicio, & J. Harwood (Eds.). *Manual del aceite de oliva* Madrid: AMV Ediciones and Mundi-Prensa 89 pp.
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposito, S., Taticchi, A., Montedoro, G., & Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054, 113–127.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., & La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: Structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18, 98–112.
- Vekiari, S. A., & Koutsafakis, A. (2002). The effect of different processing stages of olive fruit on the extracted olive oil polyphenol content. *Grasas y Aceites*, 53, 304–308.
- Zribi, A., Gargouri, B., Jabeur, H., Rebaï, A., Abdelhedi, R., & Bouaziz, M. (2013). Enrichment of pan-frying refined oils with olive leaf phenolic-rich extract to extend the usage life. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 1443–1453.

ARTÍCULO 6

Título: Use of talc in oil mills: influence on the quality and content of minor compounds in olive oils

Autores: Alfonso M. Vidal; Sonia Alcalá; Antonia de Torres; Manuel Moya; Francisco Espínola

Publicación: LWT-Food Science and Technology 98, 31-38 (2018)

Cuartil: Q1 (Food Science & Technology)

Índice de impacto (JCR 2018): 3,714

Índice de impacto (5 años): 4,000

doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.001>



Use of talc in oil mills: Influence on the quality and content of minor compounds in olive oils



Alfonso M. Vidal^{*}, Sonia Alcalá, Antonia de Torres, Manuel Moya, Francisco Espínola

Centre for Advanced Studies in Energy and Environment (CEAEMA). Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3). Dept. Chemical, Environmental and Materials Engineering, University of Jaén, Paraje Las Lagunillas, Edif. B-3, 23071 Jaén, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Industrial trials
Technological coadjuvant
Phenolic compounds
Volatile compounds
Sensory analysis
Chemical compounds studied in this article:
Talc PubChem CID: 7355547
Hydroxytyrosol PubChem CID: 82755
Tyrosol PubChem CID: 10393
Oleocanthal PubChem CID: 11652416
Pinoresinol PubChem CID: 73399
Trans-2-hexenal PubChem CID: 5281168
Hexanal PubChem CID: 6184
Trans-2-hexen-1-ol PubChem CID: 5318042
Cis-2-penten-1-ol PubChem CID: 5364919
1-Penten-3-one PubChem CID: 15394

ABSTRACT

In oil milling, in order to obtain high-quality oils without reducing the industrial yield, the use of coadjuvants with a physical action and adequate operating conditions is necessary. The aim of this study was to evaluate the influence of talc addition during the malaxation stage in an oil mill on the resulting oil. Moreover, the oil obtained by talc treatment can be classified as extra virgin olive oil as this coadjuvant has a physical action. Talc increases the extraction efficacy by up to 2.35%, but retains 26.2% of its weight in oil; therefore, it is disadvantageous to use a dose higher than 0.75%. The volatile compound contents were increased in trials using lower doses of talc. In contrast, the quantity of the phenolic compounds was increased in trials using higher talc doses. In low doses, talc does not influence the content of antioxidants and volatile compounds.

1. Introduction

Virgin olive oil (VOO) is the most important fat consumed in Mediterranean diet due its high production in this region and high nutritional and health-promoting qualities. Its consumption is very widespread due to its high content of oleic acid, a monounsaturated fatty acid. Furthermore, in addition to its unique characteristic flavor and aroma, VOO has great health benefits due to its great natural antioxidant potential (Altieri, Genovese, Tauriello, & Di Renzo, 2015). The facility at which oil is extracted from the olive is called an “almazara” (oil mill). The extraction of olive oil is a complex multi-stage procedure. All the operations in this process must be physical, rather than chemical or biochemical. Normally, olive oil extraction plants consist of a hummer crusher, a malaxer machine, a decanter (DC), and a vertical centrifuge (Di Giovacchino, Sestili, & Di Vincenzo, 2002).

The inability to extract all the oil content from the fruit is one of the main drawbacks in the extraction of olive oil. Coadjuvants are required to improve the extraction yields of difficult-to-extract pastes, such as those of early olives, olives that have been exposed to frost, or very ripe

and wet olives. The influence of technological coadjuvants on the extraction yield and quality of VOO has been studied by several researchers in recent years (Caponio et al., 2016; Espínola, Moya, de Torres, & Castro, 2015; Moya et al., 2010; de Torres, Espínola, Moya, & Castro, 2016). Factors that affect the yield include not only the efficiency of the equipment, but also the maturity the olives and their growing conditions. Most frequently, “difficult” olive pastes are produced by olives at the early ripening stage and with higher moisture content (Majetic Germek et al., 2016).

A high level of moisture, the cellulose wall consistency, and high pectin content can result in emulsified pulps that are difficult to extract (Carrapiso, García, Petró, & Martín, 2013; Sadkaoui, Jiménez, Pacheco, & Beltrán, 2016). To decompose such emulsions, the physical action of technological coadjuvants can be used (EEC, 2013); however, Spanish legislation only permits the usage of hydrated magnesium silicate (natural talc) and kaolinitic clays.

The technological variables used during the oil milling process can determine the phenolic and volatile compound content and profile of VOO. Additionally, olives contain a complex system of endogenous

^{*} Corresponding author.

E-mail address: amvidal@ujaen.es (A.M. Vidal).

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.08.001>

Received 30 April 2018; Received in revised form 30 July 2018; Accepted 1 August 2018

Available online 02 August 2018

0023-6438/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

enzymes. The operating conditions in an oil mill affect the activity of these enzymes, in turn modifying the content of phenols and volatiles in the resulting olive oil (Alcalá et al., 2017; Clodoveo, Hbaieb, Kotti, Mugnozza, & Gargouri, 2014). The malaxation conditions can alter the phenol and volatile compound contents in VOO, and consequently its properties (Kalua, Bedgood Jr., Bishop, & Prenzler, 2006; Gómez-Rico, Inarejos-García, Salvador, & Fregapane, 2009; Servili et al., 2004). That is, the malaxation conditions affect not only the oil yield but also the composition and quality of the final VOO.

Phenolic compounds contribute to the higher oxidative stability of VOO compared to other edible vegetable oils. Some researchers have suggested that also contribute to the health benefits of the Mediterranean diet (Franco, Galeano-Díaz, Sánchez, De Miguel, & Martín-Vertedor, 2014; Parkinson & Cicerale, 2016). The sensory attributes of olive oil are also closely related to the volatile compounds present. The lipoxygenase (LOX) pathway is one of the main pathways by which these compounds are derived. These compounds are responsible for pleasant attributes of the oil, such as green and herbaceous or fruity and floral sensations (Kalua, Bedgood Jr., Bishop, & Prenzler, 2006). The main volatile compound is trans-2-hexenal, which gives the oil green and fruity notes such as bitter almond and apple. This compound, together with aldehydes and alcohols, constitutes a significant fraction of the volatile compounds (Sánchez & Salas, 2003).

The influence of talc was evaluated within the malaxation stage of olive paste. Trials in oil mill were carried out to obtain results at industrial level. The extraction efficacy and the changes produced in the composition of olive oils obtained in this stage were assessed.

2. Materials and methods

2.1. Raw materials

Olive fruits (*Olea europaea* L.) cv. Picual, were harvested during the 2016–2017 season in Mancha Real (Jaén, Spain). The olives were collected from irrigated land. A homogeneous lot of approximately 60000 kg was used for the experimental trials. The olive fruits were processed within 6 h of harvest at a local olive oil mill. To analyze the operating factors in the mill, three samples of olives, paste, pomace and oil were collected at approximately 20 min intervals, about halfway through each trial. The entire study was conducted during continuous operation of the mill; therefore, the objective of the trial was to analyze olives, pomaces, and oils corresponding to the same initial raw material throughout the continuous process. The results of the characterization of the samples are shown in Table 1. The maturity index (MI), or ripening degree, was determined according to the method described by Espínola, Moya, Fernández, and Castro (2009). The moisture content was determined by the drying the milled paste at 105 °C, and the oil content was determined by the Soxhlet method. The extraction efficacy (EE) is defined as the percentage of the initial oil content that is

Table 1
Details of the industrial trials and the characteristics of the milled olives (*Olea europaea*, L. cv. Picual).

Trial	Coadjuvant	Dosage, %	Olive characteristics ^a			
			Maturity Index	Oil, %	Moisture, %	Solids, %
A	None	–	4.41	27.24	45.20	27.56
B	Talc	0.6	4.40	26.85	47.18	25.97
C	None	–	4.41	26.12	46.57	27.31
D	Talc	2.1	4.41	26.33	44.50	29.16
E	None	–	4.40	26.51	48.27	25.21
F	Talc	2.9	4.40	25.65	48.95	25.40
Fisher's LSD			0.06	0.47	0.80	0.82

^a Means of three replicates.

extracted (Moya et al., 2010).

2.2. Oil mill

The oil mill is located in “Cortijo Virgen de los Milagros”, Mancha Real (Spain). It is equipped with a plant for the continuous extraction of olive oil, which was used to carry out all the trials. The model is SPI 77 Perialisi (Jesi, Italy), and its total working capacity is 4000 kg/h. The plant involves five elements: a hummer crusher that can accommodate different types of sieve; a horizontal malaxer (Perialisi 1250 2C) with a capacity of 8000 kg, with two bodies of 4000 kg each; a two-phase centrifugal DC operating at 3200 rpm, with a processing capacity of 4000 kg/h; and a vertical centrifuge operating at 6400 rpm. All samples were obtained in the industrial oil mill under normal operating conditions; the only factor that was modified was the usage of the coadjuvant. The predetermined operating conditions were a hole diameter of 6 mm in the crusher, a malaxation temperature of 22 °C (no heating or cooling fluid was used), and a paste addition flow rate of 3250 kg/h in the DC. This flow rate was used to determine all sampling times and delays.

The malaxation time was approximately 150 min based on the 8000 kg of capacity of the malaxer. Therefore, each sample of olives collected from the mill corresponded to the oil and pomace samples collected from the DC at 150 min, assuming that the residence times in these apparatuses were negligible. All the samples at different stages of the process were collected at the halfway point of each trial and with intervals of 20 min between each sample collection.

Based on the capacities of the machines and the flow rate used, each test lasted 225 min. However, during continuous operation the trials overlapped, because the DC was still processing the output from the second malaxer body while the first body was being filled with the olives from the subsequent trial. Therefore, the total operating time was 17.5 h, (1050 min), with a duration of 225 min for the first and last trials and 150 min for all other trials. In total, 56785 kg of ground olives was processed.

To analyze the talc activity, the trials were alternated and compared in pairs, one trial without talc and the other with talc, and also to minimize variations in the raw material. This sequence was repeated, as permitted by the talc addition pump, progressively increasing the talc proportion. The operation sequence is shown in Table 1.

Talc was added using a dosing pump. Talcoliva[®], which is micronized talc (2.5 µm average diameter), was used in the oil mill and was purchased from Imerys (Málaga, Spain). The amount of talc was controlled by varying the rotation speed of the pump. At the minimum pump rotation speed, the talc dosage was 0.6%; at intermediate speed, 2.1%; and at maximum speed, it was 2.9%.

2.3. Analysis of olive oil quality parameters

The quality criteria of free acidity, peroxide index, and the extinction coefficients K_{232} and K_{270} were determined for all the oil samples according to EEC (1991).

2.4. Analysis of pigments, chlorophylls, and carotenoids

The pigment composition of the oil samples was measured following the procedure proposed by Mínguez-Mosquera, Rejano-Navarro, Gandul-Rojas, SanchezGomez, and Garrido-Fernandez (1991). The absorbance was measured using a Shimadzu UV-1800 spectrophotometer. For determination of pigments, the olive oils were measured using a wavelength of 470 nm for the carotenoid pigments and a wavelength of 670 nm for the chlorophyllic pigments; cyclohexane was used as the solvent. The pigment concentration of the sample is expressed in mg of pigment per kg of oil.

Table 2
Oil extraction yield and quality parameters^a.

Trial	A	B	C	D	E	F	Fisher's LSD
Extraction Efficacy (%)	91.06	92.21	88.93	89.19	91.03	90.51	1.08
Acidity (%)	0.18	0.17	0.15	0.15	0.15	0.14	0.01
Peroxides (mEq O ₂ /kg)	2.98	2.96	3.01	2.95	2.73	3.06	0.08
K ₂₃₂	1.37	1.32	1.28	1.26	1.30	1.27	0.09
K ₂₇₀	0.12	0.11	0.11	0.09	0.10	0.10	0.01
Chlorophylls (mg/kg)	13.81	11.32	6.59	5.13	6.04	5.35	0.69
Carotenoids (mg/kg)	9.56	7.99	5.74	5.23	5.80	5.54	0.37
Total HPLC Phenols (mg/kg)	521.98	476.91	457.24	454.82	459.20	418.94	10.55
DPPH (μmol/kg)	1531.37	1616.16	1530.16	1238.57	1511.31	1261.32	100.75
Total LOX Volatiles (mg/kg)	6.73	6.60	7.16	7.33	7.74	7.81	0.26

^a Means of three replicates.

2.5. Analysis of volatile compounds

Headspace solid phase microextraction technique was used. Two grams of the sample were placed into a 20 mL amber glass vial. The vial was heated to 40 °C for 10 min to reach equilibrium in the headspace. Subsequently, the SPME needle was inserted and the fiber was exposed for 40 min. The SPME fiber (2 cm length and 50/30 μm film thickness) was purchased from Supelco (Bellefonte, USA) and was composed of Carboxen/DVB/polydimethylsiloxane. Gas chromatography analysis was performed using a model 7890B-GC (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The volatile compounds adsorbed on the fiber were desorbed into the injector port for 1 min in splitless mode. A DB-WAXetr capillary column (30 m length, 0.25 mm internal diameter, 0.25 μm coating, Agilent Technologies, USA) was used. The carrier gas was helium at a flow rate of 1 mL/min. The injector temperature was 260 °C and the flame ionization detector was 280 °C. The initial oven temperature was 40 °C; this temperature was maintained for 10 min, after which the temperature was increased by 3 °C/min up to 160 °C and then immediately increased by 15 °C/min up to 200 °C, and then held at 200 °C for 5 min. 4-Methyl-2-pentanol was used as the internal standard, and each of the compounds was used as an external standard. The results obtained were expressed as mg of each standard compound per kg of oil.

2.6. Analysis of phenolic compounds

The method proposed by the International Olive Council (IOC, 2017) was used to determine the phenolic compounds present in the VOOs via high performance liquid chromatography (HPLC). A liquid chromatograph (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) was used in conjunction with a BDS Hypersil C18 column (Thermo Scientific, USA) with a particle size of 5 μm, a length of 25 cm, and internal diameter of 4.6 mm. The UV detector provided a signal at 280 nm. The phenol compounds were quantified through the addition of syringic acid as an internal standard and tyrosol as an external standard. The results obtained were expressed as mg of tyrosol per kg of oil. The phenolic compounds were identified by comparison to the analytical standards. Vanillin, luteolin, vanillic acid, oleuropein, trans-ferulic acid and trans-cinnamic acid were purchased from Fluka (Milan, Italy). Tyrosol, pinoresinol, caffeic acid, apigenin and p-coumaric acid were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). o-coumaric acid and hydroxytyrosol were purchased from Extrasynthese (Genay Cedex, France). The rest of the compounds were obtained by separation methods in the Organic Chemistry laboratories of the University of Jaén.

2.7. Analysis of antioxidant potential

The antioxidant potential was determined as the DPPH free radical scavenging activity. A DPPH solution was prepared in methanol, and further diluted to 0.8 AU at 515 nm prior to use. To a sample of 2 g of oil, an extraction with 4 mL of methanol/water (60/40) was carried

out, repeating the extraction one more time. Aliquots of the extract (0.1 mL) were added to 2.9 mL of DPPH solution in a cuvette, shaken, and kept in the dark for 15 min, and then the absorbance was measured at 515 nm using methanol as a blank. The percentage of inhibition of the DPPH radicals was calculated according to equation (1):

$$\%DPPH_{inhibition} = ([DPPH]_0 - [DPPH]_{sample} / [DPPH]_0) \times 100 \quad [1]$$

where [DPPH]₀ and [DPPH]_{sample} are the concentration of the control and sample, respectively. The DPPH concentration was calculated by interpolation along the calibration curve of absorbance versus DPPH concentration. Another calibration curve of the percentage of inhibition against the Trolox concentration was used to convert the percentage of inhibition into the Trolox concentration. The antioxidant capacity of the oil was obtained in terms of the standard concentration.

2.8. Sensory analysis

Descriptive sensory analysis of VOO was performed by a panel of experts according to the method described by EEC (1991) and its subsequent amendments in Annex XII. The panel is situated in the Agri-food Laboratory (Granada, Spain) and is accredited to conduct the sensory analysis of VOOs according to the EN ISO/IEC (17025:2007) standard and is recognized by the International Olive Council for the period from 1.12.2016 to 30.11.2017. Samples were analyzed to determine their positive attributes: fruity, bitter and pungent, as well as the possible presence of defects.

3. Results and discussion

Assuming that the three samples obtained over the 60 min period in the same trial should be identical, a statistical analysis of the results was performed using the StatGraphics Centurion software package, version 17.2.00, (Statpoint Technologies, Inc.). This software provided the means of the replicates and the Fisher's least significant differences (Fisher's LSD) for each response analyzed; these values are tabulated in Tables 1–5. The oil extraction, EE, and quality parameters are collected in Table 2, and the results of the sensory analysis are shown in Table 3.

Table 3
Sensory analysis (medians).

Trial	Fruity	Bitter	Pungent
A	4.6	3.8	3.7
B	4.6	3.2	3.8
C	5.8	3.6	4.4
D	6.1	2.8	4.0
E	5.8	3.2	4.0
F	6.1	3.8	4.1

Table 4
Individual volatile compounds (mg/kg oil)^a.

Trial	A	B	C	D	E	F	Fisher's LSD
LOX pathway							
hexanal	0.33	0.39	0.60	0.59	0.53	0.48	0.03
hexan-1-ol	0.45	0.43	0.46	0.46	0.45	0.48	0.03
<i>trans</i> -2-hexenal	0.66	0.77	1.01	1.06	1.12	1.15	0.04
<i>trans</i> -2-hexen-1-ol	0.32	0.46	0.58	0.58	0.54	0.50	0.03
<i>cis</i> -3-hexen-1-ol	1.82	1.87	2.24	2.41	2.53	2.71	0.10
<i>cis</i> -3-hexenyl acetate	2.28	1.65	1.00	0.88	1.30	1.06	0.11
1-penten-3-ol	0.14	0.18	0.24	0.31	0.24	0.33	0.02
1-penten-3-one	0.43	0.50	0.61	0.62	0.62	0.66	0.03
<i>cis</i> -2-penten-1-ol	0.31	0.35	0.43	0.43	0.42	0.43	0.02
Sugar fermentation							
ethanol	10.08	8.94	4.07	2.68	2.60	2.30	0.49
acetic acid	0.48	0.45	0.40	0.44	0.45	0.43	0.05
Other compounds							
<i>trans</i> -2-pentenal	0.23	0.24	0.33	0.33	0.31	0.32	0.02
pentan-3-one	0.22	0.22	0.25	0.25	0.22	0.23	0.01
Nonanal	2.09	2.02	2.48	2.50	2.33	2.20	0.12

^a Means of three replicates.

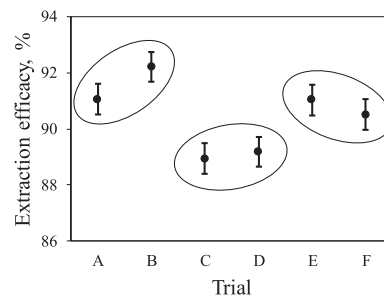
3.1. Effect of talc addition on the extraction yield, quality parameters, and sensory analysis

According to (EEC, 2016) all the oil samples were classified as extra virgin olive oil. The average values and Fisher's LSD are shown in Table 2 and in Fig. 1. For the purpose of studying the influence of the coadjuvant on the different responses, the trials were compared in pairs, one trial without talc and one with talc, as indicated by the ellipses in Fig. 1.

The EE was affected by the addition of talc. The EE in trial B increased by 1.15% compared to trial A; this difference was statistically

Table 5
Individual phenolic compounds (mg tyrosol/kg oil)^a.

Trial	A	B	C	D	E	F	Fisher's LSD
Phenolic alcohol							
hydroxytyrosol	2.42	1.55	2.77	2.18	2.47	1.67	0.14
tyrosol	5.57	5.57	5.71	4.89	5.60	4.57	0.35
Phenolic acid							
vainillinic acid	1.39	1.69	2.11	2.04	2.11	1.89	0.11
vainillin	2.25	1.73	1.49	1.43	1.51	1.48	0.10
p-coumaric acid	3.46	3.48	3.68	3.73	3.68	3.47	0.24
ferulic acid	5.56	4.71	3.97	3.85	3.89	3.25	0.38
cinnamic acid	1.47	1.43	1.49	0.00	1.65	0.00	0.06
Secoiridoids							
3,4-DHPEA-EDA (oleacein)	128.8	135.6	156.4	134.5	169.3	156.8	12.9
3,4-DHPEA-EA	173.4	130.4	94.2	92.6	95.0	88.1	7.3
p-HPEA-EDA (oleocanthal)	75.01	63.65	57.94	54.97	58.56	56.97	3.62
p-HPEA-EA	37.45	28.95	20.10	19.37	19.46	19.44	1.91
Lignans							
pinoresinol + acetoxypinoresinol	20.22	17.82	23.70	23.24	23.57	20.66	1.60
Flavones							
luteolin	10.98	14.71	17.23	17.29	17.22	17.37	1.19
apigenin	7.14	8.26	9.32	9.49	9.36	8.78	0.65

^a Means of three replicates.**Fig. 1.** Extraction efficacy and Fisher's least significant difference (LSD).

significant according to the Fisher's LSD in Table 2. In trial D the increase was 0.25%, and for F an increase of -0.52% was observed; neither of these differences were significant. Thus, an increase in the EE was observed with the use of talc, focusing only on the tendencies of the media. The decrease at high doses may be due to oil retention by the coadjuvant. Assuming that the net increase in extraction efficacy without accounting for oil retention (IEEO) varies with the dose of coadjuvant according to a first-order differential equation, the dependence of IEEO on the talc dosage can be described by Equation (2):

$$\frac{dIEEO}{dx} = k(IEEO_{max} - IEEO) \quad [2]$$

where $IEEO_{max}$ is the maximum achievable increase in extraction efficacy, k is a constant of proportionality corresponding to the action of the coadjuvant, and x the coadjuvant dose. Equation (2) predicts an asymptotic increase in IEEO with the coadjuvant dose up to its maximum value, $IEEO_{max}$. Integrating Equation (2) using the limit condition that for $x = 0$, $IEEO = 0$, and assuming that the oil retention of talc is proportional to the talc dosage, Equation (3) was obtained, in which the increase in efficacy and oil retention of the coadjuvant are both taken into account.

$$IEE = IEEO_{max} [1 - e^{-kx}] - bx \quad [3]$$

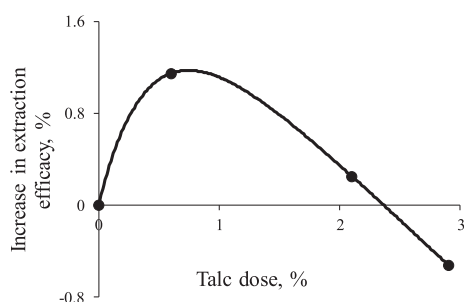


Fig. 2. Representation of the increase in extraction efficacy versus the talc dose.

where IEE is the increase in extraction efficacy with retention and b is a constant of proportionality corresponding to oil retention by the coadjutant. Equation (3) is similar to that obtained by [Trapani et al. \(2017\)](#). The experimental IEE data at all doses was fitted to the coadjutant concentration as described in the previous paragraph by non-linear regression using the software SigmaPlot (Systat Software, Inc.) to obtain Equation (4) and [Fig. 2](#), and predicted a maximum increase of 2.35% in the extraction efficacy

$$IEE = 2.35[1 - e^{-2.25x}] - 0.99x \quad [4]$$

If 26.45% is considered to be the mean fat content of all the olive samples used, the coefficients of Equation (4) can be recalculated to

determine the maximum amount of oil that could be extracted by the use of talc during the olive paste malaxation, which is 0.83 kg of oil per 100 kg of olive, and the amount of oil retained by the coadjutant, which is 26.2 kg of oil per 100 kg of talc. This value is slightly lower than, but close to, the value of 30% indicated by [Zadaka-Amir, Bleiman, and Mishael \(2013\)](#) as the equilibrium value for the adsorption of olive oil by talc; and slightly lower than the values of oil adsorption reported for talc of different compositions and grain size distributions ([Casanova, Orrego, & Zapata, 2007](#); [Mondo Minerals, 2017](#)). At higher fines content in talc, greater oil retention occurs, as is mentioned in all of the above references.

The very high value of the constant k in Equation (4) indicates that the coadjutant is very effective at low doses, which is in agreement with previous reports ([Moya et al., 2010](#); [Carrapiso et al., 2013](#); [Caponio et al., 2014, 2016](#)). Its effect decreases appreciably with increasing dosage. This can be observed in [Fig. 2](#), which is a graphical representation of Equation (4), which takes into account both the increased extraction of oil from the paste by the coadjutant and the retention of oil by the talc. Based on this figure and equation, the maximum oil recovery was found to be equivalent to an IEE of 1.18% for a talc dose of 0.75%. As the dose of the coadjutant is increased above this value, the amount of oil recovered decreases. Using a talc dosage higher than 2.36% is counterproductive, because rather than resulting in increased oil extraction, less oil is recovered than when no coadjutant is used due to retention.

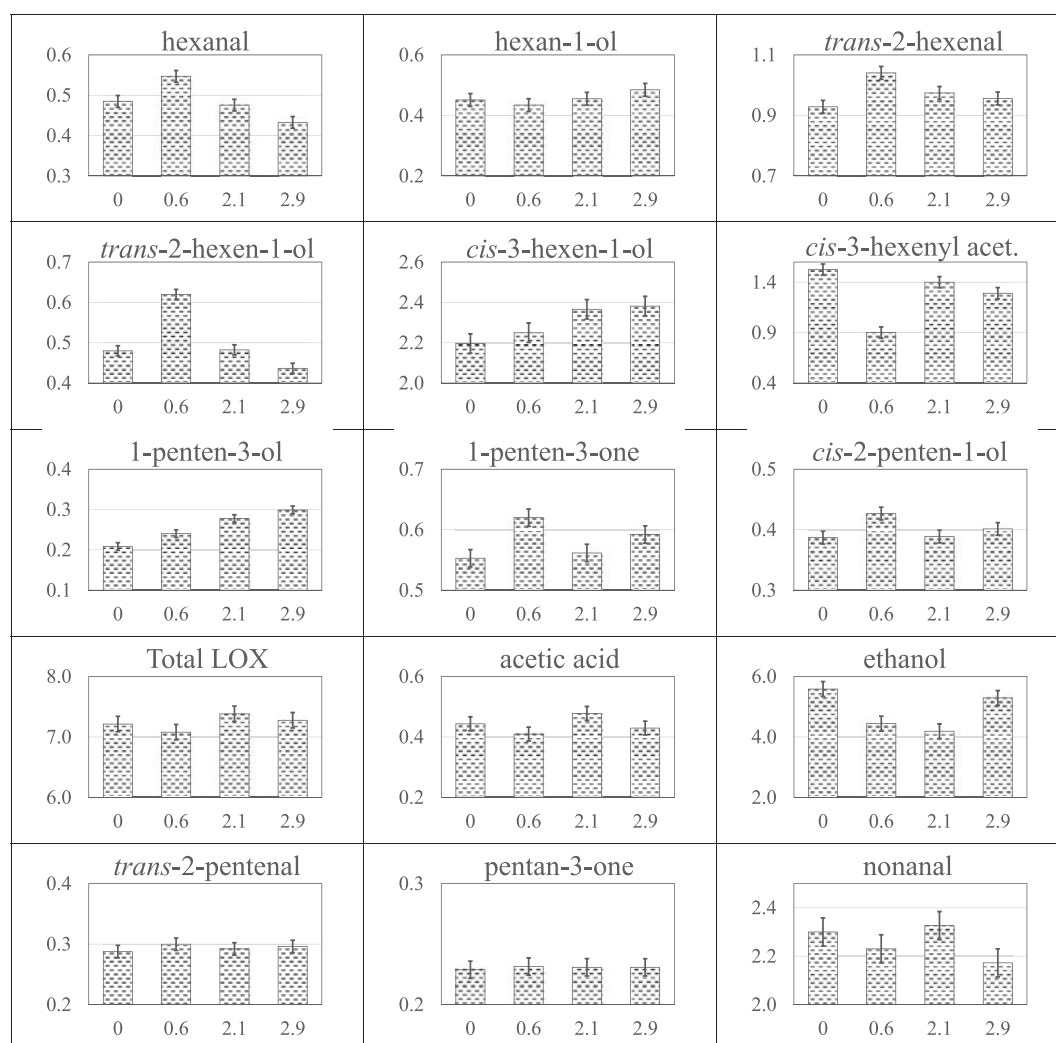


Fig. 3. Volatile compound contents of oils obtained with different talc doses. The dose of the coadjutant (%) is shown on the abscissa axis and the content of the compound indicated in the figure header (mg/kg) is on the ordinate. The error bars show the Fisher's LSD from [Table 4](#).

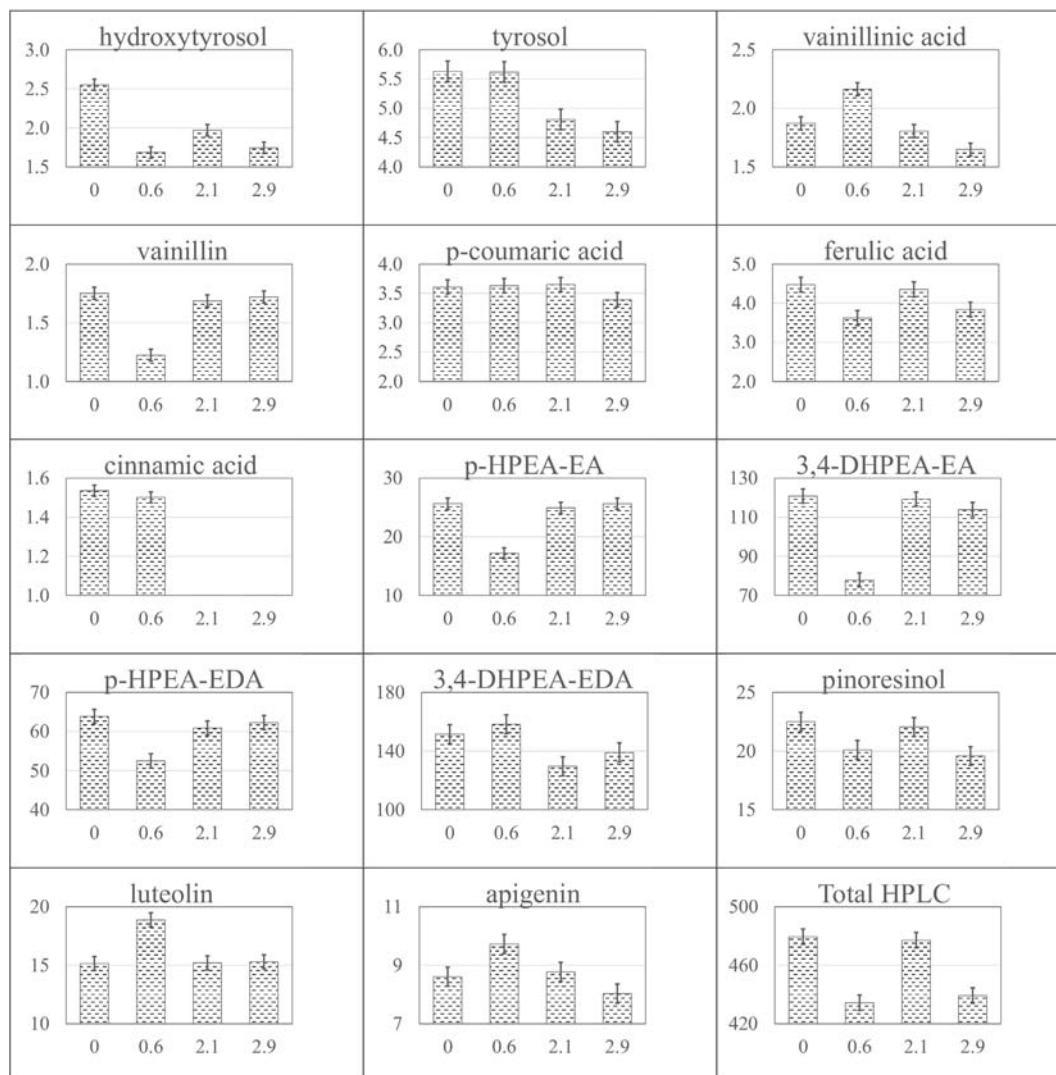


Fig. 4. Phenolic compound contents of oils obtained with different talc doses. The dose of the coadjuvant (%) is shown on the abscissa axis and the content of the compound indicated in the figure header (mg/kg) is on the ordinate. The error bars show the Fisher's LSD from Table 5.

The quality, free acidity, peroxide index parameters and the extinction coefficients in the ultraviolet (K_{232} and K_{270}) did not experience significant variations due to the use of talc. Just for the maximum dose of talc has detected a small increase in the peroxide value of about 0.33 mEq O_2 /kg, which is in accordance with the results of Carrapiso et al. (2013). The olive oil category was not modified by the addition of talc during malaxation, as previously reported in the literature (Carrapiso et al., 2013; Moya et al., 2010). In all cases, the use of talc caused a negligible decrease in the content of chlorophylls and carotenoids in the oils. The sensory analysis results in Table 3 indicate that the use of talc did not significant alter the fruity, bitter, or spicy attributes, and that no negative attributes were been detected.

3.2. Effect of talc addition on the volatile compounds

The volatile compound analysis results for the oil samples from the decanter are shown in Table 4. Fig. 3 was constructed from the data in Table 4. The effect of the coadjuvant on each of the different volatile compounds is shown, along with the Fisher's LSD. To isolate the effect of the coadjuvant, the average volatile compound content of the three oils obtained without using talc was calculated, and is represented in the columns labelled 0%. The remaining columns represent the sum of the variation in the content of each volatile compound due to the

addition of talc during processing. Each dose of talc was preceded by a trial in which no talc was used, similarly to in the extraction efficacy results.

Fig. 3 shows that for hexanal, trans-2-hexenal, trans-2-hexen-1-ol, 1-penten-3-one, and cis-2-penten-1-ol, the use of small talc doses slightly increased the content of these compounds, although larger doses decrease the content. However, the contents of cis-3-hexen-1-ol and 1-penten-3-ol increased with increasing coadjuvant dose. In general terms, the total content of volatile compounds of the LOX pathway underwent small variations due to the use of talc; however, the variations were not significant according to the Fischer's LSD values. Koprivnjak, Brkic Bubola, and Kosic (2016) and Caponio et al. (2015) reported that volatile compounds were not significantly influenced by the addition of talc during malaxation.

For compounds originating from the fermentation reactions of sugars, such as ethanol or acetic acid, it was observed that as the amount of talc used in the malaxation increased, the ethanol content decreased, except for at the maximum talc dose. Therefore, small doses of the coadjuvant have the advantage of decreasing the ethanol content in oils, which is a precursor of ethyl esters together with free fatty acids (Alcalá et al., 2017).

The volatile content of the oils was not appreciably altered by the addition of talc. However, from the small variations observed, the 0.6%

dose of talc was found to be most favorable for obtaining oils with higher contents of volatile compounds, including trans-2-hexenal, although the differences were not significant. This talc dosage also resulted in lower ethanol content.

3.3. Effect of talc addition on the phenolic compounds

The results of the phenolic compound analysis of the oil sampled from the decanter are shown in Table 5. Fig. 4 was constructed from the data of Table 5 for the individual phenolic compounds. For the phenolic alcohols, a sudden decrease is observed as the talc dose increases. Majetic Germek et al. (2016) reported that hydroxytyrosol content was significantly decreased by the addition of talc, similar to these results. In contrast, the addition of talc was observed to have a small or slightly positive influence on the content of the phenolic acids in the oils. However, it was not significant considering the experimental errors. Cinnamic acid deserves a special mention, as this component was completely removed from the oil due to coadjuvant addition. A slight increase in the flavone components, luteolin and apigenin, was observed at low doses of talc, but their contents decreased at higher doses. No significant variation in the content of the lignans was observed.

Secoiridoid compounds are the most abundant group of phenols in the oils. The content of p-HPEA-EDA, p-HPEA-EA, and 3,4-DHPEA-EA decreased at low doses, but increased at higher doses of talc, similar to the results reported by Majetic Germek et al. (2016). However, the content of 3,4-DHPEA-EDA did not follow this trend, in agreement with the results of Tamborrino et al. (2017). Therefore, the total phenol content followed the same trend as the secoiridoid compounds that constitute the majority of the total phenols by weight. A slight decrease in the total phenols was observed at low talc doses, but an increase in these compounds was observed at a talc dose of 2%, which was similar to the results reported by Caponio et al. (2015). However, some compounds were not affected by the presence of talc. These results are comparable to those found in some previous works (de Torres et al., 2016, 2018).

Fig. 4 shows that the phenolic compound content was least affected by the talc dose of 2.1%. In contrast, the content of most of the phenolic compounds decreased at lower or higher doses. However, the phenolic compounds do not all have the same partition constant between water and oil, and therefore the individual components showed different behaviors (Rodis, Karathanos, & Mantzavinou, 2002). The antioxidant capacity of the oils was decreased slightly by the use of higher doses of talc. This trend was similar to that of the phenolic compounds; these trends are related, since generally, phenolic compounds are antioxidants.

4. Conclusions

Differences were observed between samples of olive oil processed with and without added talc. The obtained results indicate several advantages of the use of this coadjuvant during the malaxation process. No temperature increase was required during malaxation due to the improvement in oil extraction by the addition of talc. The largest increase in extraction efficacy was observed in the trial using 0.6% talc, which resulted in an increase of 1.15%. The maximum EE was obtained at a talc dose of 0.75%. No significant variations in the acidity and peroxide indexes or the extinction coefficients (K_{232} and K_{270}) were observed between the samples with and without talc; this trend was similar for the chlorophylls and carotenoids. No significant differences were obtained in the sensory analysis. A talc dosage of 0.6% was found to be optimal in terms of the volatile compound composition. The optimum dosage of talc to maximize the phenolic compound content of the oil was 2.1%, but analysis of the individual compounds demonstrated that the content of some types of compounds was maximized at other proportions of talc.

Acknowledgements

The authors are grateful to Andalusian Regional Government by the financial help provided through Research Project of Excellence PI11-AGR-7726. The authors also would like to acknowledge to the company MONVA S. L. and to all the staff of “Cortijo Virgen de los Milagros”, Mancha Real, Jaén, Spain, for their kindness and attention. Technical and human support provided by CICT of University of Jaén is gratefully acknowledged.

References

- Alcalá, S., Ocaña, M. T., Cárdenas, J. R., Miquel, M.Á., Vilar, J., Espinola, F., et al. (2017). Alkyl esters content and other quality parameters in oil mill: A response surface methodology study. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119(1).
- Altieri, G., Genovese, F., Tauriello, A., & Di Renzo, G. C. (2015). Innovative plant for the separation of high quality virgin olive oil (VOO) at industrial scale. *Journal of Food Engineering*, 166, 325–334.
- Caponio, F., Monteleone, J. L., Martellini, G., Summo, C., Paradiso, V. M., & Pasqualone, A. (2014). Effect of talc addition on the extraction yield and quality of extra virgin olive oils from coratina cultivar after production and during storage. *Journal of Oleo Science*, 63(11), 1125–1132.
- Caponio, F., Squeo, G., Difonzo, G., Pasqualone, A., Summo, C., & Paradiso, V. M. (2016). Has the use of talc an effect on yield and extra virgin olive oil quality? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 3292–3299.
- Caponio, F., Squeo, G., Monteleone, J. L., Paradiso, V. M., Pasqualone, A., & Summo, C. (2015). First and second centrifugation of olive paste: Influence of talc addition on yield, chemical composition and volatile compounds of the oils. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie- Food Science and Technology*, 64(1), 439–445.
- Carrapiso, A. I., García, A., Petrón, M. J., & Martín, L. (2013). Effect of talc and water addition on olive oil quality and antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115(5), 583–588.
- Casanova, H., Orrego, J. A., & Zapata, J. (2007). Oil absorption of talc Minerals and dispersant demand of talc mineral non-aqueous dispersions as a function of talc content: A surface Chemistry approach. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 299(1), 38–44.
- Clodoveo, M. L., Hbaieb, R. H., Kotti, F., Mugnozza, G. S., & Gargouri, M. (2014). Mechanical strategies to increase nutritional and sensory quality of virgin olive oil by modulating the endogenous enzyme activities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 135–154.
- Di Giovacchino, L., Sestili, S., & Di Vincenzo, D. (2002). Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9–10), 587–601.
- EEC (1991). European commission regulation 2568/1991, on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant. *Methods of Analysis*, L248, 1–83.
- EEC (2013). *European commission regulation no 1308/2013, establishing a common organization of the markets in agricultural products and repealing Council regulations (EEC) no 922/72, L347, 671–854 (EEC) no 234/79, (EC) no 1037/2001 and (EC) no 1234/2007.*
- EEC (2016). *European commission regulation 2095/2016, amending regulation (EEC) no 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis*, L326. 1–6.
- Espinola, F., Moya, M., de Torres, A., & Castro, E. (2015). Comparative study of coadjuvants for extraction of olive oil. *European Food Research and Technology*, 241(6), 759–768.
- Espinola, F., Moya, M., Fernández, D. G., & Castro, E. (2009). Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjuvant extractant. *Journal of Food Engineering*, 92(1), 112–118.
- Franco, M. N., Galeano-Díaz, T., Sánchez, J., De Miguel, C., & Martín-Vertedor, D. (2014). Antioxidant capacity of the phenolic fraction and its effect on the oxidative stability of olive oil varieties grown in the southwest of Spain. *Grasas y Aceites*, 65(1).
- Gómez-Rico, A., Inarejos-García, A. M., Salvador, M. D., & Fregapanè, G. (2009). Effect of malaxation conditions on phenol and volatile profiles in olive paste and the corresponding virgin olive oils (olea europaea L. Cv. Cornicabra). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3587–3595.
- IOC (2017). *Determination of biophenols in olive oils by HPLC*. COL/T.20/Doc no 29/Rev 1.
- Kalua, C. M., Bedgood, D. R., Jr., Bishop, A. G., & Prenzler, P. D. (2006). Changes in volatile and phenolic compounds with malaxation time and temperature during virgin olive oil production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7641–7651.
- Koprivnjak, O., Brkic Bubola, K., & Kosic, U. (2016). Sodium chloride compared to talc as processing aid has similar impact on volatile compounds but more favorable on ortho-diphenols in virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(2), 318–324.
- Majetic Germek, V., Butinar, B., Pizzale, L., Bucar-Miklavcic, M., Conte, L. S., & Koprivnjak, O. (2016). Phenols and volatiles of istarska bjelica and leccino virgin olive oils produced with talc, NaCl and KCl as processing aids. *JAOS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(10), 1365–1372.
- Minerals, M. (2017). Low oil absorption talc for high solids coatings. *Mondo Minerals B.V. Technical bulletin*, 1206.
- Minguez-Mosquera, I. M., Rejano-Navarro, L., Gandul-Rojas, B., SanchezGomez, A. H., & Garrido-Fernandez, J. (1991). Color-pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of*

- the American Oil Chemists Society, 68(5), 332–336.
- Moya, M., Espínola, F., Fernández, D. G., Torres, A. d., Marcos, J., Vilar, J., et al. (2010). Industrial trials on coadjuvants for olive oil extraction. *Journal of Food Engineering*, 97(1), 57–63.
- Parkinson, L., & Cicerale, S. (2016). The health benefiting mechanisms of virgin olive oil phenolic compounds. *Molecules*, 21(12).
- Rodis, P. S., Karathanos, V. T., & Mantzavinou, A. (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 596–601.
- Sadkaoui, A., Jiménez, A., Pacheco, R., & Beltrán, G. (2016). Micronized natural talc with a low particle size and a high carbonate rate is more effective at breaking down oil-in-water emulsion. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(4), 545–552.
- Sánchez, J., & Salas, J. J. (2003). Biogénesis del aroma del aceite de oliva. In R. Aparicio, & J. Harwood (Eds.). *Manual del aceite de oliva* (pp. 89–107). Madrid: AMV Ediciones y Mundi-Prensa.
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposito, S., Taticchi, A., Montedoro, G., & Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054(1–2), 113–127.
- Tamborrino, A., Squeo, G., Leone, A., Paradiso, V. M., Romaniello, R., Summo, C., et al. (2017). Industrial trials on coadjuvants in olive oil extraction process: Effect on rheological properties, energy consumption, oil yield and olive oil characteristics. *Journal of Food Engineering*, 205, 34–46.
- de Torres, A., Espínola, F., Moya, M., Alcalá, S., Vidal, A. M., & Castro, E. (2018). Assessment of phenolic compounds in virgin olive oil by response surface methodology with particular focus on flavonoids and lignans. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 90, 22–30.
- de Torres, A., Espínola, F., Moya, M., & Castro, E. (2016). Composition of secoiridoid derivatives from picual virgin olive oil using response surface methodology with regard to malaxation conditions, fruit ripening, and irrigation management. *European Food Research and Technology*, 242(10), 1709–1718.
- Trapani, S., Guerrini, L., Masella, P., Parenti, A., Canuti, V., Picchi, M., et al. (2017). A kinetic approach to predict the potential effect of malaxation time-temperature conditions on extra virgin olive oil extraction yield. *Journal of Food Engineering*, 195, 182–190.
- Zadaka-Amir, D., Bleiman, N., & Mishael, Y. G. (2013). Sepiolite as an effective natural porous adsorbent for surface oil-spill. *Microporous and Mesoporous Materials*, 169, 153–159.

ARTÍCULO 7

Título: Centrifugation, storage, and filtration of olive oil in an oil mill: effect on the quality and content of minority compounds

Autores: Alfonso M. Vidal; Sonia Alcalá; Antonia de Torres; Manuel Moya; Francisco Espínola

Publicación: Journal of Food Quality (2019), ID 7381761. (Open Access)

Cuartil: Q3 (Food Science & Technology)

Índice de impacto (JCR 2018): 1,360

Índice de impacto (5 años): 1,492

doi: <https://doi.org/10.1155/2019/7381761>

Research Article

Centrifugation, Storage, and Filtration of Olive Oil in an Oil Mill: Effect on the Quality and Content of Minority Compounds

Alfonso M. Vidal , Sonia Alcalá , Antonia de Torres, Manuel Moya ,
and Francisco Espínola 

Centre for Advanced Studies in Energy and Environment (CEAEMA), Agrifood Campus of International Excellence (ceiA3),
Dept. Chemical, Environmental and Materials Engineering, University of Jaén, Paraje Las Lagunillas, Edif. B-3, 23071 Jaén, Spain

Correspondence should be addressed to Alfonso M. Vidal; amvidal@ujaen.es

Received 17 August 2018; Accepted 23 January 2019; Published 18 February 2019

Guest Editor: Nabil Ben Youssef

Copyright © 2019 Alfonso M. Vidal et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Centrifugation, storage, and filtration of olive oil were evaluated in an oil mill to determine their effect on the final quality of virgin olive oil. The main functions of these processes are to clarify the olive oil by removing water, solids, and other possible suspended particles. Although some changes were detected in the oil quality parameters after these processes, all the samples were extra virgin olive oil. The phenolic and volatile compound content of the olive oil was influenced by vertical centrifugation processing. Significantly, vertical centrifugation led to a 53% reduction in ethanol content. Oil storage before filtration resulted in a significant increase of around 30% in the peroxide index, while the antioxidant capacity decreased by 78%. Comparison of the results for filtered and unfiltered oil samples revealed that the most significant change was the reduction in the photosynthetic pigment content, with a decrease of around 50% in chlorophyll. Due to all this, the conditions applied in vertical centrifugation and the time of storage of the olive oils should be further controlled, enabling cleaning and decantation but avoiding the reduction of the antioxidant capacity and the content of phenolics compounds.

1. Introduction

Virgin olive oil (VOO) is a fat known worldwide for its beneficial properties for human health. The consumption of olive oil in the Mediterranean diet is associated with low mortality from cardiovascular disease [1]. Several health benefits have been associated with certain antioxidant compounds such as phenols [2]. The health claims on “olive oil polyphenols” by the EEC [3] refer to the impact of bioactive phenolic compounds on the protection of blood lipids against oxidative stress [4]. High nutritional quality arises from large amounts of unsaturated fatty acids in the composition of oil, such as oleic acid and linolenic acid. The production of VOO is solely carried out by physical and mechanical extraction processes. Oil washing is a step of the process, which is performed in a vertical centrifuge (VC). After obtaining the oil, it is filtered to eliminate any solids in the suspension.

Washing represents an important source of oxidative reactions arising from the contact between water and oil [5]. The distribution of phenolic compounds in the water and oil phases depends on their solubility in the phases [6]; phenolic compounds may thus be found in the wastewater and pomace. Vertical centrifugation has a great effectiveness in clarifying the oil, although this process reduces the concentration of minor compounds in the extra virgin olive oil (EVOO) [7]. The maximum oxygenation levels have been detected after VC treatment. The oxidation of olive oil during its shelf-life is negatively affected by the concentration of dissolved oxygen [8].

Inert gases have been used for oil oxygenation prevention and found to significantly extend the oil shelf-life [9]. Other researchers have focused on the effect of the water employed in the VC and on the content of alkyl esters in olive oils [10], where the content of ethyl and methyl esters were found to decrease with the use of water in the VC.

According to Gila et al. [11], minimal water addition to the VC is the optimum option to improve the oil quality.

The content of certain compounds such as hydroxytyrosol, tyrosol, and the dialdehydic form of elenolic acid linked to hydroxytyrosol, underwent the most significant changes [12]. Other authors such as Masella et al. [13] have described slight variations in the concentrations of phenolic compounds while comparing the composition of olive oil before and after the centrifugation process. Generally, a decrease in the content of these compounds is observed [14], that is, by diffusion from the oil phase to the aqueous phase. Moreover, the temperature of the added water was also found to influence the extraction process [15]. Comparative trials have also been performed on oil samples filtered using a conventional filtration method instead of a VC [16].

The turbidity of oil is caused by particles from plant tissue in suspension and water droplets. Such solids, particles, and water can deteriorate the quality by promoting the oxidation and hydrolysis of olive oil [17]. The aim of filtration is eliminate these to increase oil shelf-life. Several changes in the oil composition can occur during filtration, such as changes in the phenol and volatile compound content or the color of the oil [18, 19]. Natural sedimentation is more favorable than filtration in delaying the oxidative deterioration of oil; nevertheless, filtration provides a more stable sensory profile than do sedimentation and decantation [20].

Regarding filtration, a laboratory-scale study has shown that similar amounts of phenolic compounds are present in filtered and unfiltered EVOO [21]. However, another study, this time at pilot plant scale using filtration systems with inert gas flow (argon and nitrogen) and polypropylene filter bags, showed that the content of most phenolic compounds seemed to increase after filtration [22]. Quantitative and qualitative changes, especially on minor components were detected, which affected the EVOO quality [17]. The volatile compound and sensory characteristics of EVOO can be influenced by oil filtration [23, 24].

The objective of this work was to determine the influence of oil centrifugation, storage, and subsequent filtration on the regulated quality parameters and the phenolic and volatile compound contents of olive oil produced in a mill.

2. Materials and Methods

2.1. Raw Material. Olive fruits (*Olea europaea* L.) cv. Picual were harvested from irrigated land during the 2016–2017 crop season in Mancha Real (Jaén, Spain) and processed after the harvest at a local olive oil mill. A lot of approximately 5000 kg of olives was used for the experimental trials. The maturity index (MI), or ripening degree, was obtained following the method described by Espínola et al. [25]. The Soxhlet method is used to analyse the oil content.

2.2. Olive Oil Mill. The oil mill where the centrifugation, storage and filtration trials were carried out is located in the “Cortijo Virgen de los Milagros,” Mancha Real (Spain), and has a plant for the extraction of EVOO. The experiments

were performed with the mill working continuously. The VC (Pieralisi, Jesi, Italy) was operated at 6400 rpm. The optimum water addition content was determined by the millworkers to be 5%. Samples of oil, pomace, and paste were collected in triplicate at different times, at approximately 20 min intervals throughout the experiment. The extracted oil was stored in a stainless-steel tank for 25 days. Then, the oil was filtered through a layer of hydrophilic cellulose acetate. The filtration was carried out continuously with an industrial filter and three oil samples were collected, at both the filter inlet and outlet. All oil samples were stored in amber glass bottles, filled with nitrogen, and kept at -18°C until further analysis. The samples for the sensory analysis were sent to an external laboratory.

2.3. Analysis of Olive Oil Quality Parameters. The free acidity, peroxide index, and extinction coefficients K_{232} and K_{270} were determined according to the European Union standard method [26].

2.4. Analysis of Photosynthetic Pigments. The photosynthetic pigments composition was determined according to the method of Mínguez-Mosquera et al. [27]. The spectrophotometer used was a Shimadzu (model UV-1800). The carotenoids and the chlorophylls were measured at a wavelength of 470 nm and 670 nm, respectively. The pigment concentration of the olive oils was expressed as mg of pigment per kg of oil.

2.5. Analysis of Volatile Compounds. The volatile compounds were quantified by following the method previously described by Vidal et al. [28]. They were analyzed by headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) and gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID). The SPME fiber is formed of Carboxen/DVB/polydimethylsiloxane and had 2 cm length and 50/30 μm of film thickness. It was acquired from Supelco (Bellefonte, PA, USA). The fiber had been previously conditioned following the instructions of the manufacturer.

GC-FID analysis was carried out on a gas chromatograph, model 7890B (Agilent Technologies, CA, USA). The capillary column used to the separation was a DB-WAXetr (Agilent Technologies, USA), (30 m of length, 0.25 of mm internal diameter, and 0.25 of μm coating) formed by polyethylene glycol. The chromatographic peaks were quantified by the “Internal Standard” method. This method uses internal and external standards. A calibration curve was made with the relationship between the external and internal standard (4-methyl-2-pentanol). The purpose was to improve the quantification. The results are expressed as mg of compound per kg of olive oil.

2.6. Analysis of Phenolic Compounds. The phenolic compounds present in the VOO were determined according to the method of International Olive Council [29]. A liquid chromatograph (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) was used. The column C18 BDS Hypersil (Thermo Scientific, USA) was

employed in the chromatographic separation and its characteristics were 25 cm length, 5 μm of particle size, and 4.6 mm of internal diameter. The quantification was carried out through the addition of syringic acid and tyrosol, as internal and external standard, respectively. The analytical standards were used to identify the phenol compounds. The results are showed as mg of tyrosol per kg of oil.

2.7. Determination of the Antioxidant Potential. The antioxidant potential was determined according to the method described by Vidal et al. [28]. The free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) was used to determine the antioxidant potential. The absorbance was measured at 515 nm of the sample and the DPPH solution. Methanol was used as solvent and as the control. The absorbance obtained was converted into the DPPH concentration by interpolation of the calibration curve of absorbance versus DPPH concentration. The percentage of inhibition of DPPH radical was calculated according to equation (1):

$$\text{DPPH}_{\text{inhibition}} (\%) = \left([\text{DPPH}]_0 - \frac{[\text{DPPH}]_{\text{sample}}}{[\text{DPPH}]_0} \right) \times 100, \quad (1)$$

where $[\text{DPPH}]_0$ and $[\text{DPPH}]_{\text{sample}}$ are the concentration of the control and sample, respectively. The percentage of inhibition DPPH was converted into the Trolox concentration using a calibration curve of the percentage of inhibition versus the Trolox concentration. The antioxidant capacity is expressed as μmol Trolox per kg of olive.

2.8. Sensory Analysis. A panel formed by highly experienced people carried out the quantitative descriptive sensory analysis of the EVOO. The method proposed by the International Olive Council described in the EEC, Annex XII, [26] was used. The determination was carried out in the Agri-food Laboratory of Granada (Granada, Spain). The positive attributes: fruity, bitter, and pungent, and the possible presence of defects were determined.

2.9. Statistical Analysis. The results were processed with the StatGraphics Centurion software, version 17.2.00, (Statpoint Technologies, Inc., Warrenton, VA, USA). The mean values of the repeats and the Fisher significant least differences (Fisher's LSD) for each response analyzed was obtained.

3. Results and Discussion

Olives were characterized by a MI of 1.74 and a content of oil of 20.69%. This means that the skin of the olives had a green color with above less than 50% of purple. The percentage of oil content is acceptable to extract considerable oil content, for the early maturation stage at which the sample is found. The effects of vertical centrifugation, storage and filtration were evaluated at industrial scale to obtain realistic results and thus be able to select the best parameters to produce EVOO. Washing the oil in a VC resulted in some changes in

the quality parameters and composition. Likewise, some differences were observed between unfiltered and filtered samples.

3.1. Effect of Centrifugation on the EVOO Characteristics.

The effect of oil centrifugation or washing was evaluated. For this purpose, the oil exiting the decanter and VC was analyzed. The results are provided in several tables: quality parameters and sensory characteristics (Table 1), volatile compounds (Table 2), and phenolic compounds (Table 3). An analysis of the quality parameters was also conducted. The acidity was reduced by 20.2% after washing and the peroxide index increased by 9.9%. The K_{232} value experienced a slight drop of 4.2% after washing, while K_{270} was reduced by 7.9%. The photosynthetic pigment (chlorophylls and carotenoids) content showed only a slight decrease after vertical centrifugation of the olive oil. These results are similar to those found in the literature [7]. According to the quality parameters, the olive oil category of every sample remained EVOO, as per the limits of the EEC [30]. The olive oil category did not change after the washing process, even though the quality parameters suffered some changes. Few variations in the sensory characteristics were observed, with just a slight decrease in the bitterness and pungency after oil centrifugation.

The results from the volatile compound analysis are presented in Table 2, and are represented in Figure S1(A). After washing, the total content of volatile compounds from the lipoxygenase (LOX) pathway experienced a reduction of 9.0%. These results are consistent with those by Masella et al. [13]. All volatile compounds from the LOX pathway as well as from other analyzed compounds exhibited a reduction in their content after washing. This reduction is due to partition phenomena between the oil and water phases [13]. Of note is the significant decrease of 53.3% in the ethanol content, which is produced by fermentation. According to Alcalá et al. [10], the use of water in the VC reduces the ethyl and methyl ester content, probably because some of the alcohol in the olive oil is extracted into water.

The phenolic compound content results are presented in Table 3, and are represented in Figure S1(B). The total content of phenolic compounds, mostly belonging to the group of secoiridoids, decreased by 22.9% after washing the oil. Furthermore, the antioxidant capacity decreased by 27.0% during the oil washing process. From an individual analysis of phenolic compounds, hydroxytyrosol, cinnamic acid and lignans did not undergo significant variations during centrifugation. In contrast, tyrosol, ferulic acid, *p*-coumaric acid, vanillin, secoiridoids and flavones had a decrease significant in their content during centrifugation. This reduction may be due to the transfer of the hydrophilic phenols of the oil to the water, and also to the increase of oxygen dissolved in the olive oil during centrifugation, which can cause oxidation reactions on the phenolic compounds [6, 13]. Therefore, the observed decrease in the total content of this type of compounds in EVOO is due to the individual reduction in the amount of each compound.

TABLE 1: Quality parameters and sensory characteristics for the oil samples before and after vertical centrifugation, storage, and filtration*.

	Decanter exit	Centrifuge exit/beginning of storage	Unfiltered/end of storage	Filtered
Acidity (%)	0.186 ± 0.001 ^a	0.148 ± 0.001 ^b	0.122 ± 0.004 ^c	0.111 ± 0.002 ^d
Peroxide I. (mEq-O ₂ /kg)	3.07 ± 0.07 ^d	3.38 ± 0.13 ^c	4.45 ± 0.03 ^b	5.00 ± 0.04 ^a
K ₂₃₂	1.33 ± 0.08 ^a	1.27 ± 0.19 ^a	1.46 ± 0.03 ^a	1.35 ± 0.04 ^a
K ₂₇₀	0.13 ± 0.01 ^a	0.12 ± 0.02 ^{a,b}	0.106 ± 0.002 ^{b,c}	0.096 ± 0.006 ^c
Chlorophylls (mg/kg)	35.18 ± 1.47 ^a	32.51 ± 0.90 ^a	26.41 ± 0.73 ^b	13.78 ± 0.18 ^c
Carotenoids (mg/kg)	14.17 ± 0.62 ^a	13.08 ± 1.06 ^{a,b}	12.24 ± 0.32 ^b	7.73 ± 0.05 ^c
Total HPLC phenols (mg/kg)	438.37 ± 3.23 ^a	338.14 ± 3.99 ^b	224.75 ± 5.47 ^c	221.40 ± 3.49 ^c
DPPH (μmol/kg)	1359.83 ± 19.54 ^a	992.07 ± 8.52 ^b	221.09 ± 21.56 ^c	213.71 ± 11.84 ^c
Total LOX volatiles (mg/kg)	9.82 ± 0.26 ^b	8.93 ± 0.43 ^b	11.73 ± 0.88 ^a	11.02 ± 0.37 ^a
Fruitiness	6.4 ± 0.6 ^a	6.0 ± 0.3 ^{a,b}	5.8 ± 0.1 ^b	5.6 ± 0.9 ^b
Bitterness	3.5 ± 0.3 ^{a,b}	3.6 ± 0.3 ^a	3.2 ± 0.3 ^{b,c}	2.9 ± 0.2 ^c
Pungency	4.1 ± 0.1 ^a	4.3 ± 0.2 ^a	3.9 ± 0.1 ^{a,b}	3.6 ± 0.4 ^b

* Values are expressed as mean ± SD; (a, b, c, d) indicate Fisher's least significant differences (LSD), with statistically significant differences at 95% confidence level.

TABLE 2: Individual content of volatile compounds before and after vertical centrifugation, storage, and filtration processes, expressed in mg/kg*.

	Decanter exit	Centrifuge exit/beginning of storage	Unfiltered/end of storage	Filtered
<i>LOX pathway</i>				
Hexanal	0.42 ± 0.01 ^b	0.40 ± 0.01 ^b	0.56 ± 0.02 ^a	0.55 ± 0.02 ^a
Hexan-1-ol	0.38 ± 0.02 ^b	0.36 ± 0.02 ^b	0.64 ± 0.06 ^a	0.61 ± 0.02 ^a
(E)-2-hexenal	3.25 ± 0.03 ^a	2.90 ± 0.11 ^b	3.27 ± 0.22 ^a	3.13 ± 0.05 ^{a,b}
(E)-2-hexen-1-ol	0.24 ± 0.01 ^b	0.23 ± 0.02 ^b	0.62 ± 0.01 ^a	0.65 ± 0.02 ^a
(Z)-3-hexen-1-ol	1.80 ± 0.04 ^b	1.61 ± 0.11 ^b	2.33 ± 0.21 ^a	2.16 ± 0.06 ^a
(Z)-3-hexenyl acetate	2.33 ± 0.16 ^b	2.25 ± 0.10 ^b	3.07 ± 0.35 ^a	2.44 ± 0.08 ^b
1-penten-3-ol	0.28 ± 0.00 ^{a,b}	0.23 ± 0.03 ^{b,c}	0.21 ± 0.004 ^c	0.32 ± 0.07 ^a
1-penten-3-one	0.65 ± 0.02 ^c	0.56 ± 0.04 ^b	0.62 ± 0.01 ^b	0.71 ± 0.02 ^a
(Z)-2-penten-1-ol	0.45 ± 0.01 ^a	0.39 ± 0.04 ^b	0.41 ± 0.01 ^{a,b}	0.46 ± 0.02 ^a
<i>Sugar fermentation</i>				
Ethanol	8.31 ± 0.17 ^a	3.88 ± 0.09 ^c	4.70 ± 0.07 ^c	6.27 ± 0.18 ^b
Acetic acid	0.64 ± 0.09 ^b	0.53 ± 0.07 ^c	0.77 ± 0.04 ^a	0.55 ± 0.01 ^{b,c}
<i>Other compounds</i>				
(E)-2-pentenal	0.28 ± 0.01 ^{b,c}	0.25 ± 0.03 ^c	0.29 ± 0.004 ^b	0.34 ± 0.02 ^a
Pentan-3-one	0.34 ± 0.01 ^b	0.31 ± 0.02 ^c	0.35 ± 0.01 ^b	0.41 ± 0.01 ^a
Nonanal	1.96 ± 0.05 ^c	1.75 ± 0.12 ^d	2.39 ± 0.05 ^b	2.63 ± 0.12 ^a

* Values are expressed as mean ± SD; (a, b, c, d) indicate Fisher's least significant differences (LSD), with statistically significant differences at 95% confidence level.

3.2. *Effect of Storage of EVOO before Filtration.* Oil storage was performed in a stainless-steel tank for 25 days at room temperature. A comparison was made between the oil samples obtained on the day of oil elaboration and the samples collected on the day of filtration to determine any changes in the composition, which will in turn have an effect on the quality parameters. The results are those compared between the columns called "centrifuge exit/beginning of storage" and "unfiltered/end of storage" from Tables 1–3. The most significant changes were the increase in the peroxide index by 31.66% and an increase of 14.96% for K₂₃₂, similar to the results reported by Rodrigues et al. [31]. In contrast, the other parameters decreased after those 25 days. The most significant changes were observed for the antioxidant capacity with a drop of 77.71%, and a decrease of 54.93% for the chlorophyll content and of 48.05% for the carotenoid content. These results are similar to those reported in the literature by Gutiérrez and Fernández [32]. The phenolic compound content decreased by 33.53%, similar to the data reported by Gutiérrez and Fernández [32] and Kotsiou and Tasioula-Margari [33]. A decrease in the

content of most phenolic compounds was also observed, which could explain at least in part the loss of antioxidant capacity. This may be due to the loss of hydroxytyrosol, and the decrease of secoiridoid compounds, since they are compounds with a high antioxidant capacity. Making an individual analysis of the phenolic compounds during storage, it is worth highlighting the total disappearance of hydroxytyrosol. Furthermore, the secoiridoid compounds experiment a great decrease except *p*-HPEA-EA. On the contrary, tyrosol, flavones and cinnamic acid have a slight increase in their content.

In the sensory analysis, only a slight decrease was observed, similar to Gutiérrez results [32].

3.3. *Effect of Filtration on the EVOO Characteristics.* The effect of filtration on the characteristics of the olive oil samples was evaluated. For this purpose, the characteristics of filtered and unfiltered samples were compared. The quality parameters, sensory data, and phenolic and volatile compound content in the filtered and unfiltered oil samples are

TABLE 3: Individual content of phenolic compounds before and after vertical centrifugation, storage, and filtration, expressed in mg/kg*

	Decanter exit	Centrifuge exit/beginning of storage	Unfiltered/end of storage	Filtered
<i>Phenolic alcohols</i>				
Hydroxytyrosol	6.24 ± 0.10 ^a	6.15 ± 0.10 ^a	–	–
Tyrosol	3.87 ± 0.07 ^a	2.34 ± 0.15 ^c	2.85 ± 0.02 ^b	2.88 ± 0.03 ^b
<i>Phenolic acids</i>				
<i>p</i> -coumaric acid	3.04 ± 0.15 ^a	1.69 ± 0.09 ^c	2.74 ± 0.01 ^b	1.42 ± 0.05 ^d
Ferulic acid	7.36 ± 0.16 ^a	5.32 ± 0.13 ^b	0.77 ± 0.03 ^c	0.87 ± 0.01 ^c
Cinnamic acid	1.70 ± 0.08 ^a	1.64 ± 0.05 ^a	1.04 ± 0.04 ^b	0.88 ± 0.29 ^b
<i>Secoiridoids</i>				
3,4-DHPEA-EDA (oleacein)	141.57 ± 3.68 ^a	94.63 ± 0.32 ^b	28.93 ± 0.37 ^c	29.95 ± 0.92 ^c
3,4-DHPEA-EA	108.14 ± 2.11 ^a	85.27 ± 2.18 ^b	27.99 ± 0.29 ^c	28.98 ± 0.56 ^c
<i>p</i> -HPEA-EDA (oleocanthal)	75.18 ± 2.98 ^a	62.30 ± 2.90 ^b	32.72 ± 0.32 ^c	32.74 ± 0.24 ^c
<i>p</i> -HPEA-EA	21.98 ± 2.38 ^a	17.80 ± 1.49 ^b	18.45 ± 0.17 ^b	18.61 ± 0.37 ^b
<i>Lignans</i>				
Pinoresinol + acetoxypinoresinol	14.56 ± 1.37 ^a	14.05 ± 1.65 ^a	11.60 ± 0.84 ^b	11.45 ± 0.46 ^b
<i>Flavones</i>				
Luteolin	7.67 ± 0.29 ^b	7.50 ± 0.48 ^{b,c}	9.75 ± 0.56 ^a	6.76 ± 0.50 ^c
Apigenin	5.24 ± 0.48 ^b	4.49 ± 0.31 ^c	7.37 ± 0.13 ^a	6.99 ± 0.23 ^a
<i>Others</i>				
Vainillin	1.85 ± 0.03 ^a	1.67 ± 0.07 ^b	1.52 ± 0.04 ^c	1.56 ± 0.09 ^c

*Values are expressed as mean ± SD; (a, b, c, d) indicate the Fisher's least significant differences (LSD), with statistically significant differences at 95% confidence level.

presented in Tables 1–3. After oil filtration, slight but significant differences were observed. The acidity and K_{232} value decreased slightly and the peroxide index increased by 12.2%. In contrast, the photosynthetic pigment content was reduced during the filtration process. The chlorophyll concentration decreased by 47.8% in relation to the unfiltered oil, and the carotenoid concentration decreased by 36.8%. This means that the cellulose acetate filter collects a very important fraction of photosynthetic pigments. These results are consistent with those reported by Gordillo et al. [34] and Brkic Bubola et al. [24]. According to the quality parameters determined, the olive oil category was still EVOO for all the samples as per the EEC [30]. Although the quality parameters underwent some changes, the category of the olive oil was not changed by the filtration process. The antioxidant capacity was also similar in both cases.

The results of the volatile compounds are presented in Table 2, and are represented in Figure S2(A). The volatile compounds were analyzed separately to detect any differences between the unfiltered and filtered samples. Overall, no major differences were observed between the two samples, except for some compounds. (*E*)-2-Hexenal, (*Z*)-3-hexenol, and (*Z*)-3-hexenyl acetate were found in greater proportion in the unfiltered sample; in contrast, (*Z*)-2-pentenol, 3-pentanone, and (*E*)-2-pentenal were detected in smaller proportion in the unfiltered sample. The amount of six-carbon-atom volatile compounds decreased after filtration; however, the amount of five-carbon-atom volatile compounds increased after the filtration process. Although the observed differences are minor, they still reveal a slight trend. These results are similar to those previously reported in the literature by Bottino et al. [23] and Brkic Bubola et al. [24].

The results obtained from the analysis of phenolic compounds are shown in Table 3, and are represented in Figure S2(B). The total amount of phenolic compounds was similar in both filtered and unfiltered samples. Certain

similarities exist in both samples, except for some particular compounds. Larger amounts of luteolin and *p*-coumaric acid were detected in the unfiltered sample, results similar to those obtained by Bakhouché et al. [19], that finds a reduction of phenolic alcohols and flavones. On the other hand, oleacin and 3, 4-DHPEA-EA were found in smaller proportion in the unfiltered sample, although they are not significant differences. According to Gómez-Caravaca et al. [35], the content of phenolic compounds slightly increases after the filtration process, which may be due to the removal of water from the oil, thus increasing the concentration of dissolved substances in the oil.

All other phenolic compounds presented no differences in the filtered and unfiltered samples. It should be noted that there are some investigations changing the filtering conditions, such as that of Lozano-Sánchez et al. [22], and find some differences in the oils. Also, the type of filter used in the filtration process can be affected the content of phenolic compounds, according to results obtained by Bakhouché et al. [19] and Gómez-Caravaca et al. [35].

4. Conclusion

The use of centrifugation, storage (in order to decant) and filtration in an industrial olive mill have the function of to clean and to clarify olive oils. The olive oil category was not changed after the centrifugation, storage and filtration processes with slight changes in the fruitiness, bitterness and pungency. However, centrifugation, storage and filtration produced some significant changes found in the quality parameters and minor composition.

A relevant result was how the content of phenolic compounds was affected by centrifugation. A reduction in the concentration of these compounds was observed after the vertical centrifugation process. This is probably the result

of the transfer of hydrophilic phenols from the oil to the water phase. Centrifugation led to a 22.9% reduction in the total content of phenolic compounds. Similarly, the content of volatile compounds from the LOX pathway exhibited a decrease after washing, although the loss was just of 9%. It should be noted that a significant decrease of 53.3% of the ethanol compound content was observed after vertical centrifugation of the olive oil.

The most relevant results from the oil samples stored for 25 days before filtration were a significant increase in the peroxide index (around 30%) and a 78% decrease in the antioxidant capacity. A small number of differences were detected after oil filtration, with no differences in the sensory characteristics. The total amount of phenolic compounds and volatile compounds from the LOX pathway was similar in both filtered and unfiltered samples; furthermore, the antioxidant capacity exhibited a similar trend to the phenolic compound content. On the contrary, the photosynthetic pigment content decreased after the filtration process.

From these results, it is concluded that the water addition in the vertical centrifugation and the time of storage of olive oils should be reduced in order to avoid the decrease of the antioxidant capacity and phenolics compounds.

Abbreviations

3, 4-DHPEA-EA:	aldehyde and hydroxylic forms of oleuropein aglycone
3, 4-DHPEA-EDA (oleacein):	dialdehyde form of decarboxymethyl oleuropein aglycone
DPPH:	2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EVOO:	extra virgin olive oil
LSD:	least significant difference
MI:	maturity index
MUFA:	monounsaturated fatty acid
<i>p</i> -HPEA-EA:	aldehyde and hydroxylic forms of ligstroside aglycone
<i>p</i> -HPEA-EDA (oleocanthal):	dialdehyde form of decarboxymethyl ligstroside aglycone
VC:	vertical centrifuge
VOO:	virgin olive oil.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are included within the article.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors are grateful to the Department of Economy, Innovation and Science of the Andalusian Regional Government for the financial help provided through Research Project of Excellence PI11-AGR-7726. The authors would also like to acknowledge MONVA S.L. and all the staff at "Cortijo Virgen de los Milagros," Mancha Real, Jaén, Spain, for their kindness and attention. The technical and human

support provided by CICT of Universidad de Jaén (UJA, MINECO, Junta de Andalucía, FEDER) is also gratefully acknowledged.

Supplementary Materials

Figure S1. Comparison of the volatile (A) and phenolic (B) compound content in oil before and after centrifugation. Data at the decanter exit and centrifuge exit. The error bars show the standard deviation. Figure S2. Comparison of the volatile (A) and phenolic (B) compound content in unfiltered and filtered oil. Data at the unfiltered and filtered oils. The error bars show the standard deviation. (*Supplementary Materials*)

References

- [1] M. Covas, "Olive oil and the cardiovascular system," *Pharmacological Research*, vol. 55, no. 3, pp. 175–186, 2007.
- [2] L. Parkinson and S. Cicerale, "The health benefiting mechanisms of virgin olive oil phenolic compounds," *Molecules*, vol. 21, no. 12, p. 1734, 2016.
- [3] EEC, *European Commission Regulation 432/2012, Establishing a List of Permitted Health Claims Made on Foods, Other than Those Referring to the Reduction of Disease Risk and to Children's Development and Health*, Vol. 136, EEC, Brussels, Belgium, 2012.
- [4] M. Z. Tsimidou and D. Boskou, "The health claim on "olive oil polyphenols" and the need for meaningful terminology and effective analytical protocols," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 117, no. 8, pp. 1091–1094, 2015.
- [5] G. Altieri, F. Genovese, A. Tauriello, and G. C. Di Renzo, "Innovative plant for the separation of high quality virgin olive oil (VOO) at industrial scale," *Journal of Food Engineering*, vol. 166, pp. 325–334, 2015.
- [6] P. S. Rodis, V. T. Karathanos, and A. Mantzavinou, "Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 3, pp. 596–601, 2002.
- [7] L. Guerrini, O. Luca Pantani, and A. Parenti, "The impact of vertical centrifugation on olive oil quality," *Journal of Food Process Engineering*, vol. 40, no. 3, 2017.
- [8] A. Parenti, P. Spugnoli, P. Masella, and L. Calamai, "Influence of the extraction process on dissolved oxygen in olive oil," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 109, no. 12, pp. 1180–1185, 2007.
- [9] P. Masella, A. Parenti, P. Spugnoli, and L. Calamai, "Vertical centrifugation of virgin olive oil under inert gas," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 114, no. 9, pp. 1094–1096, 2012.
- [10] S. Alcalá, M. T. Ocaña, J. R. Cárdenas et al., "Alkyl esters content and other quality parameters in oil mill: a response surface methodology study," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 119, no. 1, article 1600026, 2017.
- [11] A. Gila, G. Beltrán, M. A. Bejaoui, M. P. Aguilera, and A. Jiménez, "How clarification systems can affect virgin olive oil composition and quality at industrial scale," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 119, no. 10, article 1600479, 2017.
- [12] J. M. García, K. Yousfi, R. Mateos, M. Olmo, and A. Cert, "Reduction of oil bitterness by heating of olive (*Olea europaea*) fruits," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 49, no. 9, pp. 4231–4235, 2001.

- [13] P. Masella, A. Parenti, P. Spugnoli, and L. Calamai, "Influence of vertical centrifugation on extra virgin olive oil quality," *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 86, no. 11, pp. 1137–1140, 2009.
- [14] A. Jimenez, M. Hermoso, and M. Uceda, "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 Aceites*, vol. 46, no. 4-5, pp. 299–303, 1995.
- [15] A. Cert, J. Alba, M. C. Pérez-Camino, and F. Hidalgo, "Influencia de los sistemas de extracción sobre las características y los componentes menores del aceite de oliva virgen extra," *Olivae*, vol. 79, pp. 41–50, 1999.
- [16] M. Fortini, M. Migliorini, C. Cherubini et al., "Shelf life and quality of olive oil filtered without vertical centrifugation," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 118, no. 8, pp. 1213–1222, 2015.
- [17] J. Lozano-Sánchez, L. Cerretani, A. Bendini, A. Segura-Carretero, and A. Fernández-Gutiérrez, "Filtration process of extra virgin olive oil: effect on minor components, oxidative stability and sensorial and physicochemical characteristics," *Trends in Food Science & Technology*, vol. 21, no. 4, pp. 201–211, 2010.
- [18] K. B. Bubola and O. Koprivnjak, "Chapter 31-influence of filtration on composition of olive oils," in *Processing and Impact on Active Components in Food*, V. Preedy, Ed., pp. 259–265, Academic Press, San Diego, CA, USA, 2015.
- [19] A. Bakhouché, J. Lozano-Sánchez, C. A. Ballus et al., "A new extraction approach to correct the effect of apparent increase in the secoiridoid content after filtration of virgin olive oil," *Talanta*, vol. 127, pp. 18–25, 2014.
- [20] K. Brkić Bubola, M. Lukic, I. Mofardin, A. Butumovic, and O. Koprivnjak, "Filtered vs. naturally sedimented and decanted virgin olive oil during storage: effect on quality and composition," *LWT*, vol. 84, pp. 370–377, 2017.
- [21] G. Fregapane, V. Lavelli, S. León, J. Kapuralin, and M. Desamparados Salvador, "Effect of filtration on virgin olive oil stability during storage," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 108, no. 2, pp. 134–142, 2006.
- [22] J. Lozano-Sánchez, L. Cerretani, A. Bendini, T. Gallina-Toschi, A. Segura-Carretero, and A. Fernández-Gutiérrez, "New filtration systems for extra-virgin olive oil: effect on antioxidant compounds, oxidative stability, and physicochemical and sensory properties," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 14, pp. 3754–3762, 2012.
- [23] A. Bottino, G. Capannelli, A. Mattei, P. Rovellini, and P. Zunin, "Effect of membrane filtration on the flavor of virgin olive oil," *European Journal of Lipid Science and Technology*, vol. 110, no. 12, pp. 1109–1115, 2008.
- [24] K. Brkić Bubola, O. Koprivnjak, and B. Sladonja, "Influence of filtration on volatile compounds and sensory profile of virgin olive oils," *Food Chemistry*, vol. 132, no. 1, pp. 98–103, 2012.
- [25] F. Espínola, M. Moya, D. G. Fernández, and E. Castro, "Improved extraction of virgin olive oil using calcium carbonate as coadjuvant extractant," *Journal of Food Engineering*, vol. 92, no. 1, pp. 112–118, 2009.
- [26] EEC, *European Commission Regulation 2568/1991, on the Characteristics of Olive Oil and Olive-residue Oil and on the Relevant Methods of Analysis*, Vol. 248, EEC, Brussels, Belgium, 1991.
- [27] I. M. Mínguez-Mosquera, L. Rejano-Navarro, B. Gandul-Rojas, A. H. Sánchez-Gómez, and J. Garrido-Fernández, "Color-pigment correlation in virgin olive oil," *Journal of American Oil Chemists' Society*, vol. 68, no. 11, pp. 809–813, 1991.
- [28] A. M. Vidal, S. Alcalá, A. de Torres, M. Moya, and F. Espínola, "Use of talc in oil mills: influence on the quality and content of minor compounds in olive oils," *LWT*, vol. 98, pp. 31–38, 2018.
- [29] IOC, *Determination of Biophenols in Olive Oils by HPLC*, IOC, Madrid, Spain, 2017.
- [30] EEC, *European Commission Regulation 2095/2016, Amending Regulation (EEC) no. 2568/91 on the Characteristics of Olive Oil and Olive-Residue Oil and on the Relevant Methods of Analysis*, Vol. 326, EEC, Brussels, Belgium, 2016.
- [31] N. Rodrigues, L. G. Dias, A. C. A. Veloso, J. A. Pereira, and A. M. Peres, "Monitoring olive oils quality and oxidative resistance during storage using an electronic tongue," *LWT*, vol. 73, pp. 683–692, 2016.
- [32] F. Gutiérrez and J. L. Fernández, "Determinant parameters and components in the storage of virgin olive oil. Prediction of storage time beyond which the oil is no longer of "extra" quality," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 3, pp. 571–577, 2002.
- [33] K. Kotsiou and M. Tasioula-Margari, "Monitoring the phenolic compounds of Greek extra-virgin olive oils during storage," *Food Chemistry*, vol. 200, pp. 255–262, 2016.
- [34] B. Gordillo, L. Ciaccheri, A. G. Mignani, M. L. Gonzalez-Miret, and F. J. Heredia, "Influence of turbidity grade on color and appearance of virgin olive oil," *Journal of American Oil Chemists' Society*, vol. 88, no. 9, pp. 1317–1327, 2011.
- [35] A. M. Gómez-Caravaca, L. Cerretani, A. Bendini, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, and G. Lercker, "Effect of filtration systems on the phenolic content in virgin olive oil by HPLC-DAD-MSD," *American Journal of Food Technology*, vol. 2, no. 7, pp. 671–678, 2007.

