

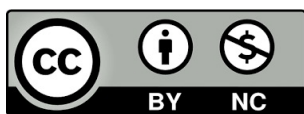
Raquel Rey Gimenez

La diversidad en los aceites de
oliva vírgenes de Aragón.
Caracterización de variedades y
aceites elaborados en el territorio
aragonés

Director/es

Sánchez Gimeno, Ana Cristina

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

LA DIVERSIDAD EN LOS ACEITES DE OLIVA
VÍRGENES DE ARAGÓN.
CARACTERIZACIÓN DE VARIEDADES Y ACEITES
ELABORADOS EN EL TERRITORIO ARAGONÉS

Autor

Raquel Rey Gimenez

Director/es

Sánchez Gimeno, Ana Cristina

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Calidad, Seguridad y Tecnología de los
Alimentos

2023



Universidad
Zaragoza

Tesis Doctoral

**La diversidad en los aceites de oliva
vírgenes de Aragón.
Caracterización de variedades y aceites
elaborados en el territorio aragonés.**

Autora

Raquel Rey Giménez

Directora

Dra. Ana Cristina Sánchez Gimeno

Facultad de Veterinaria
2023



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Departamento de
Producción Animal
y Ciencia de los Alimentos
Universidad Zaragoza

Dña. Ana Cristina Sánchez Gimeno, Profesora Titular del Area de Tecnología de los Alimentos del Departamento de Producción Animal y Ciencia de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada *“La diversidad en los aceites de oliva vírgenes de Aragón. Caracterización de variedades y aceites elaborados en el territorio aragonés”* de la que es autora Dña. Raquel Rey Giménez, ha sido realizada bajo mi dirección, su contenido corresponde con el Plan de Investigación aprobado en su momento y cumple las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, 13 de julio de 2023

Fdo. Ana Cristina Sánchez Gimeno

AGRADECIMIENTOS

Escribiendo estas palabras de agradecimiento siento una gran satisfacción personal y emoción por haber conseguido terminar esta locura que inicié ya hace unos seis años, una Tesis Doctoral. Yo no soy la protagonista de esta historia, sino que lo son todas las personas que han estado a mi lado de una manera u otra. A ellas me dirijo, algunas con nombre y apellidos y otras en colectivo; todas igualmente importantes. Sin ellas, no lo hubiera logrado.

En primer lugar, quisiera agradecer todo su apoyo profesional y personal al que ha sido hasta hace unos meses el director del Laboratorio Agroambiental del Gobierno de Aragón, Nicolás Abancens. Gracias por responderme con un sí tan rotundo cuando te planteé la posibilidad de realizar esta Tesis con la colaboración del Laboratorio Agroambiental. Vaya idea tuve. Otra persona fundamental para mí ha sido Jesús Betrán, jefe de Unidad de análisis agrícolas del Laboratorio Agroambiental. Gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme, por tus consejos, tu impulso y tu inspiración. Ya sabes Jesús, me apoyo en hombros de gigantes como el tuyo y el de Eni, M^a Eugenia Martínez, compañera y amiga a la que echo de menos. Ambos habéis conseguido que disfrute enormemente en los retos en los que nos hemos embarcado juntos y, seguro, en los que vendrán.

Gracias a la Dra. Ana Cristina Sánchez Gimeno por su respaldo como directora de esta Tesis. No solo has sido mi directora, siempre dispuesta y rauda ante cualquier consulta o petición, sino que has sido una guía además de una amiga. Gracias a Dr. Javier Raso por los consejos ante dudas que iban surgiendo. A la Dra. Pilar Mañas y a la Dra. M^a Lourdes Sánchez, por la ayuda en los trámites administrativos y otras gestiones como coordinadoras del programa de doctorado Calidad, Seguridad y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Zaragoza.

Gracias a Diego Laya, jefe de Unidad de cultivos leñosos del Centro de Transferencia Agroalimentaria (CTA) del Gobierno de Aragón. Esta Tesis Doctoral no habría sido posible sin el material vegetal de la finca experimental que diriges en Alcañiz. Tu colaboración junto a la de otros compañeros (Fernando Camuñas, Fernando Rodrigo y José Luis Rosel) en la recogida de muestras y ante cualquier consulta agronómica ha sido muy valiosa.

A mis compañero/as del Laboratorio Agroambiental del Gobierno de Aragón. Nunca imaginé que tendría el privilegio de trabajar junto a personas tan valiosas y profesionales.

Todas ellas son especiales, pero mi corazón está en la Sala de aceites, grasas y productos lácteos, en donde he ejercido profesionalmente durante unos diez años. Lola Machina, Julia Royo, Marisa Díaz y José Luis Jiménez, sin vosotros y sin vuestro conocimiento técnico ni siquiera me habría planteado esta Tesis Doctoral. Al Dr. Roberto Lasheras y a Alba Barrós por su ayuda con la cromatografía líquida. Los polifenoles se resistieron.

Quiero agradecer también a mis compañero/as del Panel de Catadores de Aceite de Oliva Virgen y del Servicio de Seguridad Agroalimentaria del Gobierno de Aragón, así como a las personas que trabajan en las cooperativas agrarias y almazaras y a los agricultores de Aragón. En definitiva, gracias al sector oleícola aragonés en general por su colaboración en esta Tesis. El dialogo entre las distintas partes beneficia al sector oleícola y ha sido fundamental tanto en mi desarrollo profesional dedicado a los aceites de oliva como en el discurrir de esta Tesis Doctoral.

Gracias por la ayuda prestada en la identificación de la variedad Royal de Calatayud a Carlos Lahoz del Centro de Sanidad y Certificación Vegetal del Gobierno de Aragón y a la Dra. Angelina Belaj del Banco Mundial de Germoplasma de Olivo de Córdoba.

A MI FAMILIA. Sin mi familia no sería la persona que soy ni habría sido capaz de llegar hasta aquí. Mis padres, siempre con su apoyo incondicional. Aunque a veces sea en silencio, ahí están. Ellos me han inculcado valores como el esfuerzo, el trabajo, la responsabilidad y la constancia. Ojalá yo consiga lo mismo con mis hijas. Sí, mamá, por fin he acabado.

Victor, mi refugio y mi piedra angular. Siempre estás ahí y yo, a menudo vuelo con mis proyectos, pero aterrizo a tu lado. Gracias por acompañarme en este viaje que ya acaba. Habrá nuevos viajes juntos, pero los próximos serán de recreo. Prometido.

Leyre y Claudia, sois dos hijas maravillosas y estoy muy orgullosa de vosotras. Espero que haya podido recompensaros mis ausencias de alguna manera, así lo he intentado. Rodearos de personas que os quieran, ilusionaros con vuestras propias metas y a por ello. Sois grandes, creéroslo. Os quiero.

Las últimas líneas son una disculpa dirigida al resto de la familia y a las amigas por estar, pero no estar. Pero sobre todo son un intento de promesa hacía mí: voy a desacelerar, descansar y disfrutar. Adiós al síndrome de la impostora.

A Leyre y Claudia

A Victor

Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza.

*Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico:
es también un niño colocado ante fenómenos naturales
que le impresionan como un cuento de hadas.*

Maria Skłodowska-Curie (1867 - 1934)

*Solos podemos hacer muy poco;
unidos podemos hacer mucho.*

Helen Keller (1880 - 1968)

ÍNDICE

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	25
1. INTRODUCCIÓN	29
1.1. Situación del sector oleícola	31
1.1.1. Origen del cultivo del olivo y su distribución geográfica	31
1.1.2. Diversidad genética	33
1.1.3. Importancia y situación actual del sector oleícola	35
1.1.4. La olivicultura en Aragón	45
1.2. La aceituna	61
1.2.1. Descripción y desarrollo del fruto	61
1.2.2. Maduración. Cambios fisiológicos y bioquímicos asociados.	63
1.3. El aceite de oliva virgen	75
1.3.1. Obtención del aceite de oliva virgen	75
1.3.2. Composición química del aceite de oliva virgen	81
1.4. La calidad y autenticidad del aceite de oliva virgen	92
1.4.1. Calidad y autenticidad	92
1.4.2. Calidad y pureza reglamentada del aceite de oliva virgen	92
1.4.3. Calidad nutricional	102
2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	105
3. MATERIAL Y MÉTODOS	111
3.1. Materia prima y diseño experimental	113
3.1.1. Ensayos en Finca Experimental	113
3.1.2. Estudio sobre la diferenciación de los aceites de oliva virgen extra de distintas zonas productoras de Aragón a través de su perfil lipídico e identificación de las características específicas para cada zona productora	123
3.2. Métodos analíticos	130
3.2.1. Determinaciones en la aceituna	130
3.2.2. Determinaciones en el aceite de oliva virgen	134
3.3. Tratamiento estadístico	153

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	155
4.1. Artículo I: Crop year, harvest date and clone effects on fruit characteristics, chemical composition and olive oil stability from an Empeltre clonal selection grown in Aragon	159
4.2. Artículo II: Authenticity in Olive Oils from an Empeltre Clonal Selection in Aragon (Spain): How Environmental, Agronomic, and Genetic Factors Affect Sterol Composition	183
4.3. Artículo III: Chemometric and Physico-Chemical Characterization of Fruit and Olive Oils from Autochthonous Cultivars Grown in Aragon (Spain)	221
4.4. Artículo IV: Effect of cultivar and environment on chemical composition and geographical traceability of Spanish olive oils	255
4.5. Evaluación del cumplimiento de la declaración de propiedad saludable referida a los polifenoles en los aceites de oliva virgen extra de variedades autóctonas de Aragón	283
4.5.1. Selección del método de análisis adecuado para el propósito de la declaración de propiedad saludable	285
4.5.2. Contenido de fenoles en los aceites de oliva virgen de la selección clonal de Empeltre y en otras variedades autóctonas de Aragón	289
4.5.3. Comparación de resultados entre el ensayo Folin-Ciocalteu (sin hidrólisis) y HPLC-DAD (con hidrólisis)	295
4.5.4. Contenido de hidroxitirosol y tirosol en los AOV	298
5. DISCUSIÓN GENERAL	301
5.1. Estudio de la influencia de factores agronómicos (genéticos, ambientales y maduración) sobre las características de las aceitunas de variedades autóctonas de Aragón destinadas a almazara	308
5.2. Estudio de la evolución de la calidad y perfil lipídico de los aceites de oliva virgen extra de variedades autóctonas de Aragón destinadas a almazara a lo largo de la maduración del fruto y su efecto en la obtención de aceites de oliva diferenciados	314
5.3. Estudio de la influencia de factores agronómicos en la calidad, el perfil lipídico y autenticidad de los aceites de oliva virgen extra de variedades autóctonas de Aragón destinadas a almazara y en la obtención de aceites de oliva con características fisicoquímicas singulares	327

5.4. Diferenciación de los aceites de oliva virgen extra de distintas zonas productoras de Aragón a través de su perfil lipídico e identificar las características específicas para cada zona productora _____	342
5.5. Evaluación del cumplimiento de la declaración de propiedad saludable referida a los polifenoles en los aceites de oliva virgen extra de variedades autóctonas de Aragón _____	347
6. CONCLUSIONES _____	351
7. ANEXO _____	357
8. REFERENCIAS _____	365

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Debate sobre la historia evolutiva y domesticación del olivo..	32
Figura 1.2. Distribución del cultivo del olivo en la actualidad.	33
Figura 1.3. Áreas geográficas de distribución de los casos de sinonimia de la variedad «Safrawi» en la Cuenca Mediterránea.	34
Figura 1.4. Evolución de la superficie de olivar cultivado en España desde 2003	36
Figura 1.5. Distribución geográfica nacional de algunas de las principales variedades de olivo	38
Figura 1.6. Esquema de obtención de nuevas variedades mediante mejora genética.	41
Figura 1.7. Variación en la producción mundial de aceites de oliva desde 1990.	43
Figura 1.8. Evolución de consumo mundial de aceite de oliva desde 1990.	43
Figura 1.9. Evolución de la producción total de aceite de oliva virgen (extra, virgen y lampante) en España. Periodo 2010/11 a 2020/2021	44
Figura 1.10. Evolución de la superficie de olivar cultivado en Aragón desde 2005	46
Figura 1.11. Distribución del olivar (ha) por comarcas en el año 2017	47
Figura 1.12. Comparativa en la evolución del tipo de cultivo del olivo en las provincias Zaragoza, Teruel y Huesca durante el periodo 2005-2020.	48
Figura 1.13. Evolución anual de la producción total de aceite de oliva virgen (extra, virgen y lampante) en Aragón y sus provincias. Periodo 2010-2019.	49
Figura 1.14. Distribución por municipios de cultivo de las variedades principales de olivo en Aragón.	54
Figura 1.15. Distribución por municipios de cultivo de las variedades secundarias.	56
Figura 1.16. Aceitunas de la variedad Empeltre.	57
Figura 1.17. Aceitunas de la variedad Arbequina.	58
Figura 1.18. Aceitunas de la variedad Royal de Calatayud.	58
Figura 1.19. Aceitunas de la variedad Negral de Sabiñán	59
Figura 1.20. Partes estructurales de la aceituna. Imagen microscópica transversal del fruto de la variedad Barnea.	61
Figura 1.21. Desarrollo del olivo durante las estaciones. Estados fenológicos (EF) del olivo durante el desarrollo del fruto	62
Figura 1.22. Evolución de la coloración de la aceituna de la variedad Empeltre a lo largo de su maduración.	64
Figura 1.23. Biosíntesis de novo de los ácidos grasos.	65
Figura 1.24. Acumulación de aceite en las células del mesocarpio	69

Figura 1.25. Estructura química básica del esteroles.....	71
Figura 1.26. Rutas metabólicas de síntesis de compuestos fenólicos derivados de fenilpropanoides.....	73
Figura 1.27. Sistema continuo de Pieralisi.....	76
Figura 1.28. Etapas en la producción de aceite de oliva virgen	76
Figura 1.29. Molino de martillos.	78
Figura 1.30. Batidora horizontal de dos cuerpos.....	79
Figura 1.31. Esquema del proceso de centrifugación del AOV en una almazara.....	80
Figura 1.32. Estructura química de algunos de los 24-etilesteroles (Δ^5 - y Δ^7 -) que contiene el aceite de oliva.....	86
Figura 1.33. Estructura química de eritrodiol y uvaol.....	87
Figura 1.34. Estructura química del α -tocoferol.....	89
Figura 1.35. Estructura química de los principales compuestos fenólicos polares en el AOV.....	91
Figura 1.36. Árbol de decisión del campesterol para AOVE y AOV	95
Figura 1.37. Árbol de decisión del campesterol para aceites de oliva en general	95
Figura 1.38. Árbol de decisión del Δ^7 -estigmastenol para AOVE y AOV	95
Figura 1.39. Árbol de decisión del Δ^7 -estigmastenol para AOVE y AOV	95

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Figura 3.1. Plano de sectores y red de riego de la Finca Experimental de Cultivos Leñosos en Alcañiz (Teruel).....	114
Figura 3.2. Localización de la Finca Experimental Cultivos Leñosos del Gobierno de Aragón en Alcañiz (Teruel).....	115
Figura 3.3. Régimen de temperaturas diarias durante el periodo de muestreo.	117
Figura 3.4. Precipitaciones diarias (mm) durante los años 2017, 2018 y 2019.....	118
Figura 3.5. Parcela ensayo «Selección clonal de Empeltre»	120
Figura 3.6. Localización de Aragón en EspañaLocalización del olivar en Aragón	124
Figura 3.7. Clasificación climática de Aragón según criterios de Köppen.	125
Figura 3.8. Datos climáticos anuales en Aragón, periodo 1971-2000.	126
Figura 3.9. Pigmentación del epicarpio en distintos estadios de maduración en la variedad Empeltre y en la variedad Royal de Calatayud	130
Figura 3.10. Analizador NIR de pasta de aceituna.	131

Figura 3.11. Sistema Abencor®.....	132
Figura 3.12. Aceite de oliva virgen obtenido mediante Abencor® de la variedad Empeltre.	133
Figura 3.13. Cromatógrafo de gases con detección de ionización de llama.	139
Figura 3.14. Perfil cromatográfico de la composición de ácidos grasos en un AOVE de Empeltre.....	140
Figura 3.15. Placa cromatográfica tras elución del insaponificable de una muestra de AOVE de la variedad Empeltre, revelada con 2,7-diclorofluoresceína bajo UV	142
Figura 3.16. Cromatograma de esteroides y diolcos triterpénicos en un AOVE.	143
Figura 3.17. Equipo Rancimat 743 para la medida de la estabilidad oxidativa.	145
Figura 3.18. Tubos de reacción con AOV para analizar la estabilidad oxidativa	146
Figura 3.19. Extracción de la fracción fenólica polar del aceite de oliva virgen	147
Figura 3.20. Reacción colorimétrica durante el análisis de fenoles totales por colorimetría.	148
Figura 3.21. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC).	150

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Figura 4.1. Contenido fenólico total (mg/20 g aceite) de los AOV analizados. Comparación entre métodos: F-C y HPLC-DAD	295
Figura 4.2. Correlaciones entre el contenido fenólico total.....	296
Figura 4.3. Comparación global del contenido fenólico total determinado según método de análisis (Folin-Ciocalteu e hidrólisis-HPLC-DAD).....	297
Figura 4.4. Evolución del contenido (%) de Htir y Tir	299

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1. Distribución mundial de la superficie del olivar en la campaña 2021/22.	36
Tabla 1.2. Superficie en plantación regular y producción del olivar español en 2020/2021.	37
Tabla 1.3. Evolución de la producción de aceite de oliva en España (2010/11 a 2019/20) y tasa de variación	45
Tabla 1.4. Evolución de la superficie de olivar de almazara en Aragón.	47
Tabla 1.5. Evolución de la producción de aceite de oliva en Aragón (2010/11 a 2019/20) y tasa de variación	49
Tabla 1.6. Límites de composición (%) de ácidos grasos de las distintas categorías de aceites de oliva virgen.	82
Tabla 1.7. Algunos de los componentes minoritarios en el AOV.	84
Tabla 1.8. Contenido relativo de esteroides individuales y contenido total de esteroides en las distintas categorías de aceites de oliva virgen.	87
Tabla 1.9. Características de calidad para los aceites de oliva virgen.	97
Tabla 1.10. Detección de adulteración en los aceites de oliva virgen.	101

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Tabla 3.1. Tabla climática del municipio de Alcañiz (Teruel).	116
Tabla 3.2. Localización estación agroclimática de la red SIAR.	116
Tabla 3.3. Datos anuales medios de temperatura y radiación solar y datos anuales totales de pluviometría, evotranspiración potencial y balance hídrico en los años de estudio 2017, 2018 y 2019.	116
Tabla 3.4. Datos analíticos (expresados sobre suelo seco al aire) correspondientes al suelo de la finca experimental.	119
Tabla 3.5. Origen geográfico de los clones seleccionados para su estudio.	122
Tabla 3.6. Datos meteorológicos de las zonas noreste, oeste y sureste de Aragón durante los años 2017, 2018 y 2019.	127
Tabla 3.7. Muestras de aceite y variable de estudio.	129
Tabla 3.8. Gradiente ternario de elución utilizado para la separación de los compuestos fenólicos.	150

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 4.1. Contenido total de fenoles, contenidos totales en hidroxitirosol (Htir) y tirosol (Tir) y su suma en los AOV (selección clonal de Empeltre)291

Tabla 4.2. Contenido total de fenoles, contenidos totales en hidroxitirosol (Htir) y tirosol (Tir) y su suma en los AOV (Arbequina, Royal de Calatayud y Negral de Sabinán)...293

7. ANEXO

Tabla 7.1. Características de la aceituna de la selección clonal de Empeltre.359

Tabla 7.2. Parámetros fisicoquímicos de calidad de los AOVE de la selección clonal de Empeltre.....361

Tabla 7.3. Principales ácidos grasos en los AOVE de la selección clonal de Empeltre..363

LISTADO DE ABREVIATURAS

ACCase	Acetyl-CoA carboxilase	Acetil-CoA carboxilasa
ACP	Acyl carrier protein	Proteína transportadora de grupos acilo
ANOVA	Analysis of Variance	Análisis de varianza
AO		Aceite de oliva
AOV		Aceite de oliva virgen
AOVE		Aceite de oliva virgen extra
BGMO		Banco de Germoplasma Mundial de Olivo
C16:0		Ácido palmítico
C16:1		Ácido palmitoleico
C17:0		Ácido margárico
C17:1		Ácido margaroleico
C18:0		Ácido esteárico
C18:1		Ácido oleico
C18:2		Ácido linoleico
C18:3		Ácido linolénico
C20:0		Ácido aráquico
C20:1		Ácido gadoléico
C22:0		Ácido behénico
C24:0		Ácido lignocérico
CE		Comunidad Europea
CEE		Comunidad Económica Europea
CG-FID		Cromatografía de gases con detector de ionización de llama.
COI		Consejo Oleícola Internacional
CV		Coeficiente de variación
DAG		Diacylglicerol
DGAT	Diacylglycerol acyltransferase	
DH	β -hydroxyacyl-ACP dehydrase	
DMS	Degree, Minutes, Seconds	Grados, minutos, segundos
DOP		Denominación de Origen Protegida
EC	Enzyme Commission	Comisión de Enzimas
ECN	Equivalent Carbon Number;	Número equivalente de carbonos
EFSA	European Food Safety Authority	Agencia Europea de Seguridad Alimentaria
EN	European Norm	Norma Europea
ENAC		Entidad Española de Acreditación
ENR	Enoyl-ACP reductase	
FAD	Fatty Acid Desaturase	Desaturasa de ácido graso
FAE	Fatty Acid Elongase	Elongasa de ácido graso

FAO		Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FAS	Fatty Acid Sintase	Ácido graso sintasa
GPAT		Glicerol-3-fosfato aciltransferasa
GSM		Rendimiento graso sobre materia natural
GSS		Rendimiento graso sobre materia seca
ha		Hectárea
HPLC-DAD	High-Performance Liquid chromatography Diode-Array	Cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos
HTir		Hidroxitirosol
HUM		Humedad
IEC	International Electrotechnical Commission	Comisión Electrotécnica Internacional
IM		Índice de madurez
ISO	International Organization for Standardization	Organización Internacional para la Estandarización
K		Coeficiente de extinción
KAR	β -ketoacyl-ACP reductase	β -cetoacil-ACP reductasa
KAS	β -ketoacyl-ACP synthase	β -cetoacil-ACP sintasa
LC-MS	Liquid Chromatography Masas Spectrum	Cromatografía líquida con espectrometría de masas
LOX		Lipoxigenasa
LPAAT	Lysophosphatidate acyltransferase	Lisofosfatidil aciltransferasa
M/P		Ácidos grasos monoinsaturados/poliinsaturados
MAPA		Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
Md		Mediana de defectos
Mf		Mediana de frutado
PAL		fenilalanina amonio liasa
PDAT	Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase	Fosfolípido:diacilglicerol aciltransferasa
PVDF		Polifluoruro de vinilideno
rpm		Revoluciones por minuto
SAD	Stearoyl-ACP Δ 9-desaturase	
SIAR		Sistema de Información Agroclimática para el Regadío
TAG		Triacilglicerol
Tir		Tirosol
UE		Unión Europea
UHPLC-DAD	Ultra High-performance Liquid Chromatography Diode-Array	Cromatografía líquida de ultra alta resolución con detector de red de diodos
UNE		Una Norma Española
UV-VIS		Ultravioleta-visible
WAF	Week After Flowering	Semanas después de la floración

RESUMEN

El cultivo del olivo es una actividad agrícola con una arraigada herencia histórica en Aragón, cuyo territorio oleícola cuenta con diferentes zonas productoras. Esta comunidad autónoma alberga principalmente variedades autóctonas de olivo en plantaciones tradicionales, algunas de las cuales aún no han sido ampliamente caracterizadas debido a su naturaleza minoritaria y local. Por otra parte, la calidad y composición química del aceite de oliva, además de su valor nutricional, están estrechamente ligadas a las características de las aceitunas utilizadas, las cuales a su vez dependen de factores externos.

Esta Tesis Doctoral tiene como objetivo caracterizar la diversidad de los aceites de oliva virgen extra producidos en Aragón. Para ello, se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo mediante la caracterización fisicoquímica de los aceites de oliva obtenidos de diversas variedades autóctonas de Aragón y de diferentes zonas productoras. Se ha demostrado la influencia de algunos factores agronómicos intrínsecos como la genética, el ambiente o de algunas prácticas agronómicas sobre el perfil lipídico de los aceites de oliva virgen extra de clones de Empeltre y de otras variedades autóctonas consideradas, y se ha establecido una trazabilidad geográfica basada en compuestos específicos que definen los aceites estudiados. Por otra parte, la mayoría de los aceites de oliva de la variedad Empeltre analizados, así como los aceites tempranos de la variedad Royal de Calatayud, superaron el contenido en fenoles requerido por la legislación europea para poder declarar en su etiquetado que «los polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre frente el daño oxidativo».

El estudio realizado en esta Tesis Doctoral ha permitido resaltar las características fisicoquímicas y nutricionales singulares de los aceites de oliva virgen extra de Aragón, poniendo en valor su identidad.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. SITUACIÓN DEL SECTOR OLEÍCOLA

1.1.1. Origen del cultivo del olivo y su distribución geográfica

El olivo (*Olea europaea* L.) es una especie arbórea leñosa de la familia botánica *Oleaceae*. Su legado genético incluye miles de cultivares (*europaea* var. *europaea*) (Bartolini, 2008; FAO, 2010; Belaj *et al.*, 2022) y acebuches (*europaea* var. *sylvestris*), como subespecie *europaea*, además de otras cinco subespecies relacionadas (*cuspidata*, *laperrinei*, *cerasiformis*, *maroccana* y *guanchica*) que se han distribuido en diferentes continentes (Green, 2002; Kassa *et al.*, 2019). Las seis subespecies se consideran recursos genéticos primarios en los programas actuales de mejora del olivo cultivado (Besnard *et al.*, 2018).

La historia de *Olea europaea* L. previa a su cultivo comienza a documentarse arqueológicamente a través de los restos más antiguos de olivo que fueron hallados en el sitio arqueológico Achelense del Pleistoceno Medio o Paleolítico Inferior situado en Gesher Benot Ya'aqov, en el sur del Levante, Israel. Estos restos corresponden a semillas, polen y madera de olivo silvestre (Goren-Inbar *et al.*, 2000; Van Zeist y Bottema, 2009). Se considera que estos hallazgos muestran la recolección de aceitunas silvestres por parte de los habitantes de los yacimientos arqueológicos mencionados. Langgut *et al.* (2019) recabaron datos polínicos sobre la presencia de esta especie vegetal en la Cuenca Mediterránea, en proporciones relativamente reducidas, durante el Holoceno temprano, es decir, hace unos 10.000-7.000 años.

El olivo cultivado (*O. e.* subsp. *europaea* var. *europaea*) fue uno de los primeros árboles en ser domesticado (Zohary y Spiegel-Roy, 1975). Está genéricamente aceptada la domesticación del olivo silvestre (*O. e.* subsp. *europaea* var. *sylvestris*), también conocido como acebuche u oleaster, como el origen del cultivo del olivo mediterráneo. Aunque sigue existiendo cierta controversia sobre el proceso y su distribución geográfica (Figura 1.1) (Diez *et al.*, 2015; Besnard y Rubio de Casas, 2016; Besnard *et al.*, 2018; Langgut *et al.*, 2019).

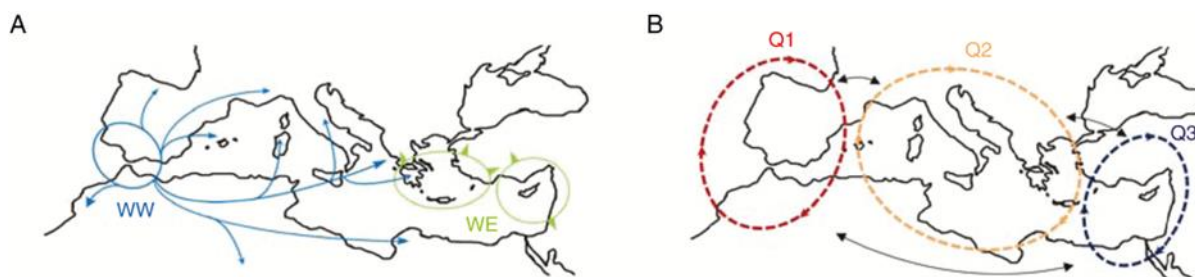


Figura 1.1. Debate sobre la historia evolutiva y domesticación del olivo. Distribución de los recursos genéticos de olivos silvestres y cultivados en la Cuenca Mediterránea (A: Besnard *et al.*, 2013; B: Díez *et al.*, 2015). Fuente: Besnard *et al.*, 2018.

La domesticación del acebuche, como principal progenitor del olivo cultivado, se ha situado geográficamente en el Levante meridional mediterráneo (Siria-Turquía), hace unos 6.000 años, como atestiguan las pruebas palinológicas, arqueológicas, arqueobotánicas, y moleculares (Zohary y Spiegel-Roy, 1975; Liphshitz *et al.*, 1991; Kaniewski *et al.*, 2012; Langgut *et al.*, 2019). Posteriormente, la difusión del cultivo del olivo desde el este hacia el oeste de la Cuenca Mediterránea ocurrió paulatinamente con las sucesivas migraciones y expediciones comerciales de las distintas civilizaciones (fenicios, griegos, etruscos, romanos y árabes), y que convivieron con la población autóctona.

En la Península Ibérica, los análisis morfométricos aplicados a huesos de aceituna silvestre y cultivada hallados en excavaciones arqueológicas evidencian el inicio del cultivo del olivo en el Neolítico, con prácticas de cultivo más exitosas y selectivas durante la Edad del Bronce (Terral *et al.*, 2004). Aunque fue durante el Imperio romano cuando su cultivo definitivamente se expandió por la Península dado el interés agronómico y económico tanto de su fruto como de su aceite (Buxó, 2005; Rodríguez-Ariza y Montes, 2010), confirmando a Hispania como el mayor proveedor de aceite de oliva del Imperio. Tras la caída de la hegemonía romana, la olivicultura y producción de aceite de oliva sufrió un retroceso en la Península Ibérica en los inicios de la Edad Media hasta la irrupción de los árabes, los cuales introdujeron nuevas variedades de olivos por el sur peninsular.

En el transcurso del siglo XV, y seguidamente al descubrimiento de América, el olivo traspasó las fronteras de la Cuenca Mediterránea extendiéndose su cultivo al otro lado del Atlántico. El olivo fue uno de los primeros cultivos introducidos por España en el continente americano tal y como atestiguan los documentos conservados en el Archivo de Indias de Sevilla, España (Vilar y Pereira, 2018).

En el tiempo actual, el cultivo del olivo se ha extendido a otras regiones no mediterráneas, aunque principalmente bajo climas del tipo mediterráneo, caracterizado por veranos cálidos y secos e inviernos templados (Figura 1.2).

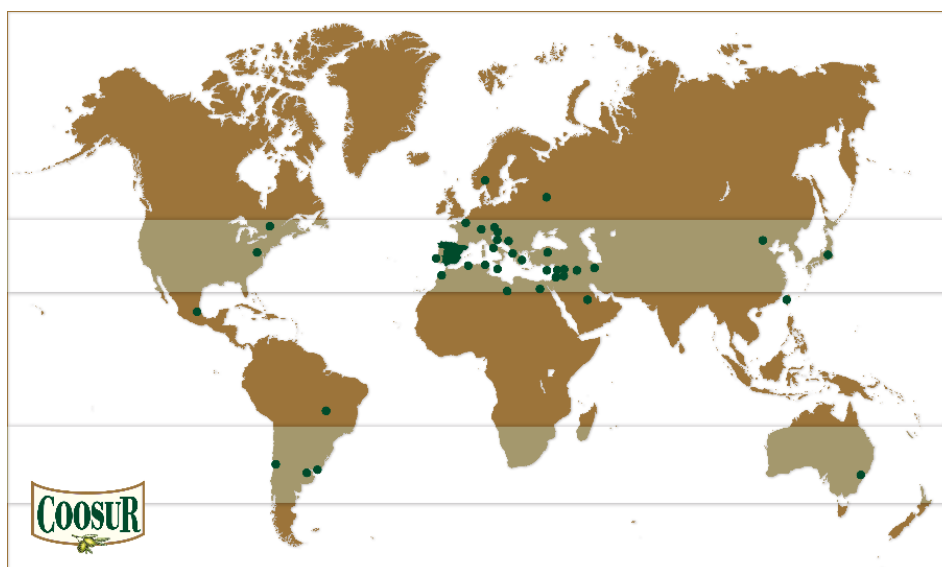


Figura 1.2. Distribución del cultivo del olivo en la actualidad, entre las latitudes 30° y 40° de los hemisferios norte y sur (Civantos, 2009). Imagen: Coosur.

1.1.2. Diversidad genética

La domesticación del olivo, aunque es probable que se iniciara mediante reproducción sexual, se ha caracterizado por la propagación vegetativa selectiva de los individuos más sobresalientes. Inicialmente, las técnicas aplicadas fueron procedimientos sencillos y la propagación posterior se habría realizado a gran escala mediante la clonación (Díez *et al.*, 2011; Belaj *et al.*, 2010).

Como resultado, y de forma generalizada, se obtuvieron cultivares locales asociados a regiones específicas que fueron principalmente seleccionados según sus rasgos agronómicos o fenotípicos (productividad, tamaño del fruto y contenido de

aceite) o por su adaptación al medio (Barranco, 2008; Belaj *et al.*, 2010). Este proceso conllevó inicialmente una pérdida considerable de diversidad genética en el olivo cultivado frente a su ancestro silvestre, el oleaster o acebuche, ya que la mayoría de los cultivares tradicionales actuales han resultado de un número restringido de individuos iniciadores (Lumaret *et al.*, 2004; Barranco, 2008; Rugini *et al.*, 2011; Besnard *et al.*, 2018;). Una vez que los genotipos destacados se fijaron clonalmente, estos pudieron difundirse por migración a otras regiones o países. En algunos casos, esta difusión dio lugar a una confusión en la identidad y en la nomenclatura de las variedades que perdura en la actualidad (Diez *et al.*, 2015), con casos de sinonimia y homonimia dentro y entre países (Belaj *et al.*, 2022). Pero lo habitual fue el confinamiento de los cultivares a sus zonas iniciales de origen, ya sea por desconocimiento del comportamiento del cultivar en distintos ambientes o por la inviabilidad de los sistemas tradicionales de propagación vegetativa (Barranco *et al.*, 2005). La variedad local «Cirujal», ubicada en Calatayud (Aragón, España), y sinonimia de «Safrawi», es un claro ejemplo de sinonimia entre países como puede apreciarse en la Figura 1.3.

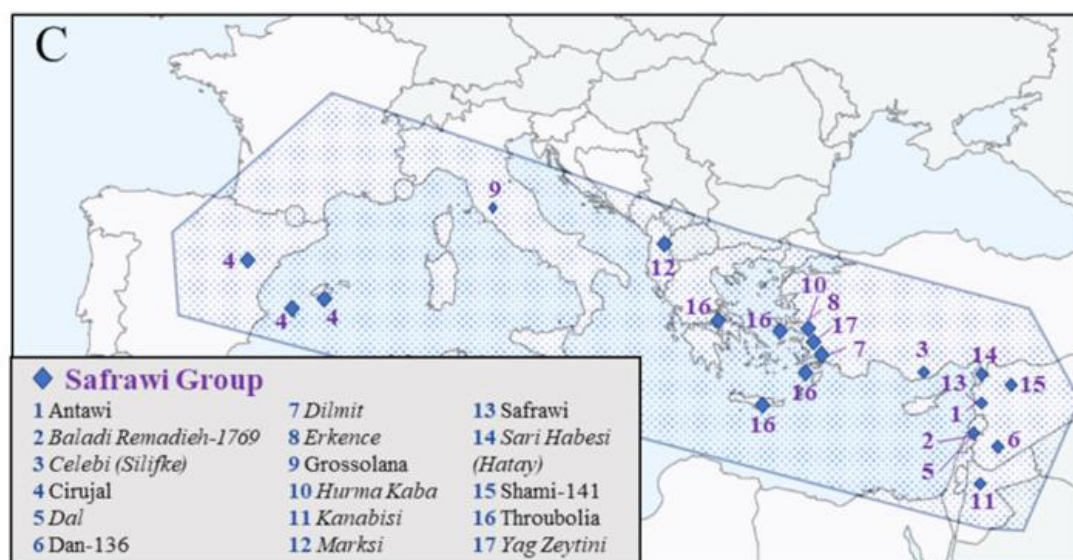


Figura 1.3. Áreas geográficas de distribución de los casos de sinonimia de la variedad «Safrawi» en la Cuenca Mediterránea (Belaj *et al.*, 2022).

La diversidad del olivo cultivado se estima en alrededor de 1.200 variedades por todo el mundo con más de 3.000 nomenclaturas diferentes (Rallo *et al.*, 2005). Sin embargo, pocas de ellas se cultivan hoy en día y más aún en la coyuntura actual de un

mercado globalizado. La Península Ibérica ha sido identificada como una de las zonas con mayor diversidad genética en el olivo (Belaj *et al.*, 2010; Rubio de Casas *et al.*, 2006), con unas 272 variedades cultivadas de olivo catalogadas en 2005 (Barranco *et al.*, 2005). En 1970, con la finalidad de mitigar la pérdida de germoplasma, además de facilitar la mejora genética de los cultivares, se iniciaron los programas de prospección y catalogación de variedades en España. Uno de los logros fue la creación del primer Banco Mundial de Germoplasma del Olivo de Córdoba (BGMO) (Rallo *et al.*, 2005; Belaj *et al.*, 2022; El Bakkali *et al.*, 2019). Desde entonces, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) da cifra de 2629 accesiones mundiales en bancos de germoplasma de olivo, tanto mundiales como nacionales y regionales (FAO, 2010).

La revolución del olivar en España acontecida en los últimos años, después de su modernización, está siendo el cultivo en sistemas intensivo y superintensivo. Esta circunstancia está reduciendo enormemente la diversificación de variedades a aquellas más idóneas para su recolección mecanizada por su menor porte y vigor. Por el contrario, las amenazas actuales como el cambio climático y la aparición de enfermedades (ej. *Xylella fastidiosa*) exigen el mantenimiento de la diversidad del olivar con el fin de la preservación de su cultivo.

1.1.3. Importancia y situación actual del sector oleícola

1.1.3.1. Cultivo del olivo

1.1.3.1.1. Superficie cultivada

El olivo es un cultivo oleaginoso, leñoso y principalmente de secano, aún muy focalizado en su zona tradicional de cultivo. Sin embargo, el auge que está experimentado el consumo del aceite de oliva en los últimos años, por su alta calidad y reconocidas propiedades saludables, ha impulsado nuevas plantaciones en países como Australia, Chile o China además del incremento en hectáreas en los países con tradición oleícola (COI, 2023). Hoy en día, la olivicultura se encuentra presente en 58 países

distribuidos en 5 continentes. Ocupa aproximadamente 10,3 millones de hectáreas de las cuales el 95% se sitúan en la Cuenca Mediterránea, el 25% en España (FAO, 2021) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Distribución mundial de la superficie del olivar en la campaña 2021/22.

País	Hectáreas	Proporción (%)
España	2.623.290	25
Túnez	1.280.811	12
Italia	1.129.000	11
Marruecos	1.104.083	11
Turquía	889.168	9
Grecia	819.060	8
República Árabe Siria	693.106	7
Otros	979.243	9
Total, mundial	10.338.179	100

Fuente: Elaboración propia a partir de los datos de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, 2021).

En España, el cultivo del olivo ocupa más de 2,5 millones de hectáreas (MAPA, 2021a). Esta cifra sigue en continuo crecimiento (10.700 ha/año desde 2003) (Figura 1.4) desde los inicios de la reconversión del olivar tradicional en los años 80, a causa de su baja rentabilidad, en nuevas plantaciones mecanizables, con menores marcos de plantación y mayor productividad (Civantos, 2008).

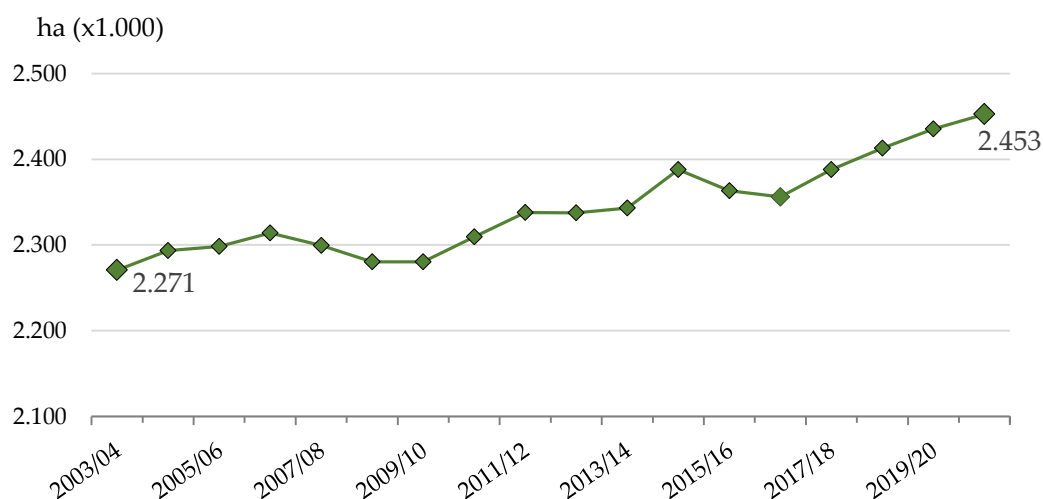


Figura 1.4. Evolución de la superficie de olivar cultivado en España desde 2003. Fuente: elaboración propia a partir de datos del Anuario de Estadística. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2021a).

Las hectáreas cultivadas en España se encuentran repartidas por todo el territorio peninsular, a excepción de Cantabria y Asturias. Las comunidades con mayor superficie de olivar de almazara son Andalucía (63,0%), Castilla-La Mancha (15,5%), Extremadura (8,1%), Cataluña (4,4%), Comunidad Valenciana (3,8%), Aragón (2,0%) y Madrid (1,0%) (MAPA, 2021a). El aumento en la superficie cultivada no ha sido homogéneo en las distintas comunidades autónomas españolas. Desde 2005, la mayoría de las regiones han aumentado las hectáreas destinadas al olivar a excepción de Cataluña y la C. Valenciana, dos zonas oleícolas muy importantes, que destacan en su retroceso (10% y 9% respectivamente desde 2005). Otras, en cambio, han apostado claramente por el olivar aumentando su cultivo, como Canarias y el País Vasco, aunque su aportación es mínima al conjunto español, o como Navarra y La Rioja. El incremento que realmente afecta a la superficie del olivar español se sitúa en tres de las seis comunidades autónomas con mayor superficie destinada al olivar en España: Castilla-La Mancha (+7%), Aragón (+7%) y, sobre todo, Andalucía (+10%) (MAPA, 2021a).

En cuanto a la distribución del olivar en secano y regadío en España, claramente el olivo es un cultivo de secano (78%) y destinado principalmente a almazara (95%) (Tabla 1.2), aunque existen variedades como Empeltre que responden a un cultivo para doble aptitud (mesa y almazara).

Tabla 1.2. Superficie en plantación regular y producción del olivar español durante la campaña 2020/2021.

Cultivo	Superficie y producción del olivar español					
	Secano		Regadío		Producción	
	ha	%	ha	%	t	%
Aceituna de almazara	1.902.408	78	550.161	22	7.684.413	95
Aceituna de mesa	138.932	81	32.220	19	385.570	5
Total	2.041.340	78	582.381	22	8.069.983	100

Elaboración propia. Fuente: Anuario de Estadística. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2021a).

1.1.3.1.2. Variedades de olivo en España

Las primeras descripciones sobre las variedades que se cultivaban antiguamente en España fueron realizadas en el siglo I d.C. por Columela, agrónomo hispano de la

Antigua Roma, en su libro *De re rustica* («Los trabajos del campo») que agrupaba doce libros sobre agricultura. Este autor ya entonces describió diez variedades de olivo cultivados en Hispania: *Pausia*, *Algia*, *Sergia*, *Naevia*, *Culminiana*, *Orchis*, *Regia*, *Circites* y *Murtes*. La trazabilidad de estas denominaciones se ha perdido a lo largo de la historia del cultivo del olivo.

La antigüedad de las variedades de olivo actuales en España, al igual que en otros países, se remonta al inicio de su cultivo y su difusión suele estar restringida en torno a su lugar de origen. La confusión en las denominaciones de los cultivares, causadas por homonimias y sinonimias, han dificultado los trabajos de catalogación varietal. Las técnicas actuales basadas en marcadores moleculares EST-SNP (Belaj *et al.*, 2022) han supuesto un inmejorable avance en la identificación varietal. En 2008, fueron 272 las variedades tradicionales identificadas y catalogadas en España. Según su importancia y difusión fueron clasificadas en: variedades principales (24), secundarias (24), difundidas (50) y locales (174) (Barranco, 2008). La Figura 1.5 representa la distribución geográfica de algunas de las variedades principales, mayoritariamente en su zona de origen (excepto Empeltre).

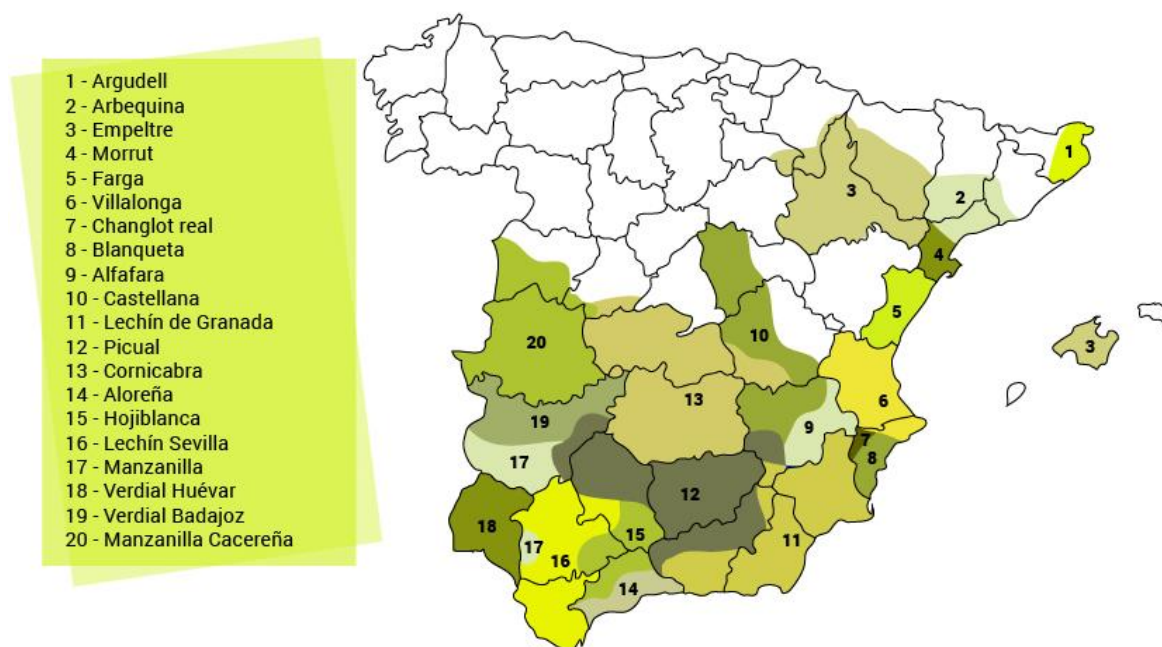


Figura 1.5. Distribución geográfica nacional de algunas de las principales variedades de olivo.
Fuente: <https://www.olioly.com/>

Picual es la variedad principal con mayor número de hectáreas cultivadas en España (860.000 ha) (Jaén: 98%) seguida por las variedades Cornicabra (270.000 ha) y Hojiblanca (220.000 ha) (Barranco, 2008). Empeltre (72.000 ha) y Arbequina (71.000 ha), variedades principales situadas entre las diez primeras en cultivo, están muy presentes en la olivicultura tradicional de Aragón.

En los últimos años, el desarrollo de los viveros y de los métodos de propagación vegetativa ha modificado el panorama de distribución de variedades y la estabilidad de la estructura varietal en las diferentes zonas oleícolas tradicionales. Un claro ejemplo es el cultivo de variedades como Picual y Arbequina. Estas dos variedades han destacado por su alta productividad, precocidad y rendimiento graso, además de por su adaptabilidad al medio (Rallo *et al.*, 2005). La introducción de nuevas variedades mejor adaptadas a los requerimientos de los nuevos cultivos, obtenidas a través de programas de mejora genética, es la muestra más actual de la alteración regional varietal.

1.1.3.1.3. *Mejora genética del olivo.*

La mayoría de las variedades tradicionales no reúnen en un mismo cultivar las mejores características agronómicas y tecnológicas por lo que la mejora de las variedades actuales o la obtención de nuevas variedades son el fin de los programas de mejora genética. Para lograrlo, se realiza la prospección e identificación de variedades y posterior valoración de sus características, tanto agronómicas como tecnológicas. Periodos de maduración, productividad, rendimiento graso, contenido en ácido oleico, estabilidad del aceite, resistencia al repilo y a la verticilosis, y tuberculosis, son algunas de las características evaluables en la búsqueda del «supercultivar». En las plantaciones intensivas o superintensivas actuales, además de estas características también son deseables otras como el porte reducido.

La valoración de una variedad en términos agronómicos y oleotécnicos requiere de la evaluación de los factores genéticos y ambientales, además de la interacción entre ambos componentes, en la expresión de los caracteres principales para determinar su contribución a la calidad y productividad de la variedad en cuestión (de la Rosa *et al.*,

2013; Navas-López *et al.*, 2019; Serrano *et al.*, 2021). En el caso en que el genotipo o variedad sea dominante en la expresión de un carácter, la variabilidad de la medida del carácter es menor. Por lo tanto, el número de repeticiones a realizar por variedad en un ensayo no es tan crítico como cuando el efecto ambiental tiene una mayor importancia, ya que recopilar información sobre el comportamiento de la variedad es mucho más sencillo. Si el efecto del componente ambiental es importante, la variabilidad en la medición del carácter en estudio puede aumentar considerablemente, por lo que se deben considerar múltiples repeticiones en diferentes árboles, localizaciones y campañas. En cambio, si la interacción entre ambos componentes domina, la respuesta en la expresión del carácter evaluado es muy variable y se requieren ensayos comparativos para obtener resultados precisos (Barranco, 2008). Sin embargo, es importante señalar que los ensayos comparativos suelen ser algo limitados en número. Como ejemplo, los aceites de la variedad Arbequina cultivada en Argentina, fuera de su área de origen en España, presentan contenidos muy bajos en ácido oleico, llegando incluso a situarse por debajo de los límites establecidos para ser considerado un aceite de oliva (Ceci y Carelli, 2007). El cultivo de Arbequina fuera de su origen no fue precedido por ensayos comparativos. Los ensayos comparativos realizados entre Cataluña y Andalucía demostraron que la variedad Empeltre presenta menor plasticidad en comparación con las variedades Arbequina o Picual ya que su producción resultó ser más elevada en las zonas interiores del valle del Ebro (zona de origen de Empeltre), y más reducida en la zona costera del Mediterráneo y Jaén. Por otro lado, la variedad Arbequina demostró una buena capacidad de adaptación a las localidades en que se realizaron los ensayos comparativos, si bien se observó una mayor concentración de ácido oleico en Jaén que en el sur de Cataluña (zona de origen de Arbequina), lo que confirmó la existencia de variabilidad en esta característica según la zona de cultivo (Tous y Romero, 1994).

Una técnica utilizada en la mejora genética es la selección clonal. Consiste en la elección de individuos genética o sanitariamente superiores dentro de una misma variedad bien conocida, para posteriormente propagarlos vegetativamente. Esta técnica permitiría una mejora inmediata, al lograr una rápida difusión del clon seleccionado en

el área de cultivo de dicha variedad. Posteriormente, los individuos preseleccionados (considerados potenciales cabezas de clon) son evaluados mediante ensayos comparativos antes de proceder a la selección final del clon. Uno de los mayores éxitos en cuanto a la selección clonal y su comercialización ha sido el clon i-18® de la variedad Arbequina obtenido por el Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentaria (IRTA) de Cataluña. Otras selecciones clonales de éxito comercial, también seleccionadas por el IRTA, han sido los clones i-43® y i-38® de las variedades Arbosana y Koroneiki respectivamente (Tous *et al.*, 2000a, 2000b, 2002).

En los últimos años, los programas de mejora genética han experimentado notables progresos gracias al desarrollo de diversas técnicas moleculares avanzadas (Figura 1.6). Estos programas se basan fundamentalmente en el cruzamiento selectivo entre progenitores que poseen rasgos genéticos sobresalientes, con el objetivo de transferir estos rasgos a las nuevas variedades. Una vez obtenidas las progenies resultantes, se realizan ensayos comparativos entre estas y las variedades estándar del área oleícola seleccionada para evaluar su rendimiento y características de interés.

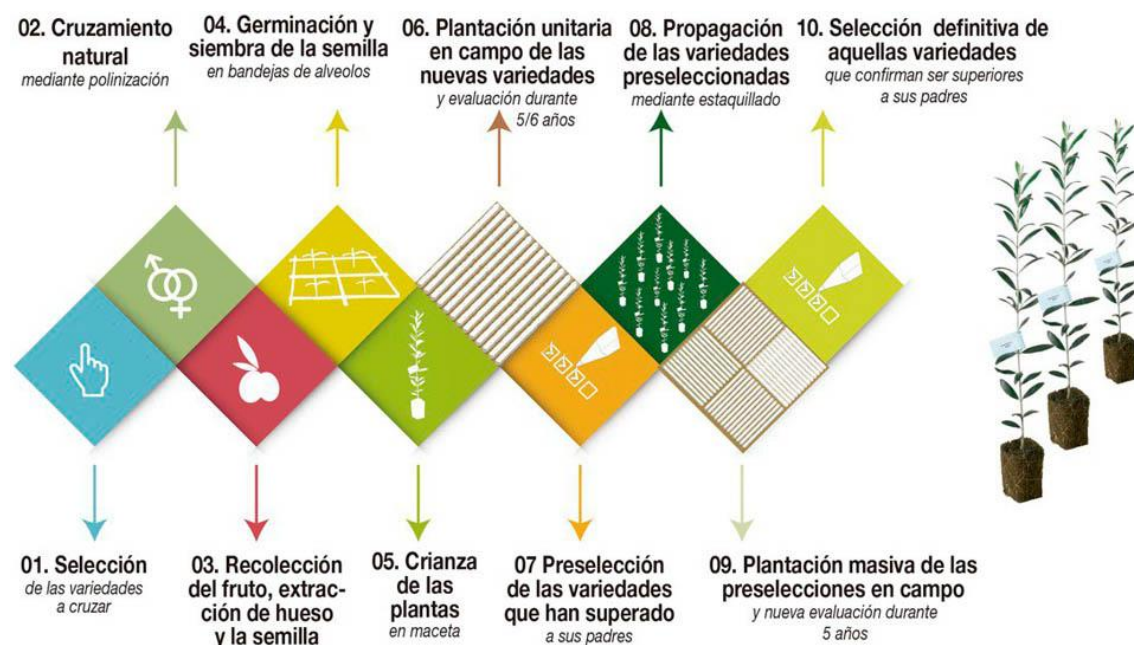


Figura 1.6. Esquema de obtención de nuevas variedades mediante mejora genética. Fuente: <https://www.todolivo.com/>

Selecciones procedentes de programas de mejora genética se encuentran hoy en día en ensayos comparativos para evaluar tanto sus características agronómicas como la calidad de sus aceites (de la Rosa *et al.*, 2013; Navas-López *et al.*, 2020; Serrano *et al.*, 2021). Un ejemplo de variedad obtenida mediante mejora genética es la variedad Sikitita (Rallo *et al.*, 2008), procedente del cruzamiento entre las variedades Picual (parental femenino) y Arbequina (parental masculino), o la recién obtenida Sultana, cruce entre Arbosana (parental femenino) y Sikitita (parental masculino) (Olimerca, 2023), ambas para olivar en seto o plantaciones de alta densidad, actual tendencia en el sector oleícola.

1.1.3.2. Producción y consumo de aceite de oliva

1.1.3.2.1. Mercado internacional

El 87% de la producción mundial de la aceituna se destina a la elaboración del aceite de oliva (Vilar y Pereira, 2018). La producción mundial de aceite de oliva se ha duplicado en los últimos 30 años, a razón de 52.000 toneladas/año. La Figura 1.7 muestra la tasa de variación en la producción de aceite de oliva respecto a la campaña 1990/91, con un incremento importante en el periodo comprendido entre los años 1990 a 2004. Tras una breve estabilización, la tendencia del actual sector productor de aceite de oliva es ascendente a pesar de tres campañas nefastas para el sector (2012/13, 2014/15 y 2016/17). El carácter vecero del cultivo del olivo incide sobre la variación anual en la producción del aceite de oliva.

En la campaña 2020/21, se alcanzaron los 3,02 millones de toneladas de aceite de oliva (datos definitivos; COI, 2023), lo que representó un 1,6% de los aceites vegetales producidos en el mundo (FAO, 2021). Los principales países productores del mundo fueron España, con un 46% de la producción mundial, seguido de Grecia (9,11%), Italia (9,06%) y Turquía (6,4%), todos ellos situados en la Cuenca Mediterránea y con larga tradición oleícola (datos definitivos; COI, 2023). España se ha consolidado como principal país productor desde hace más de 20 campañas.

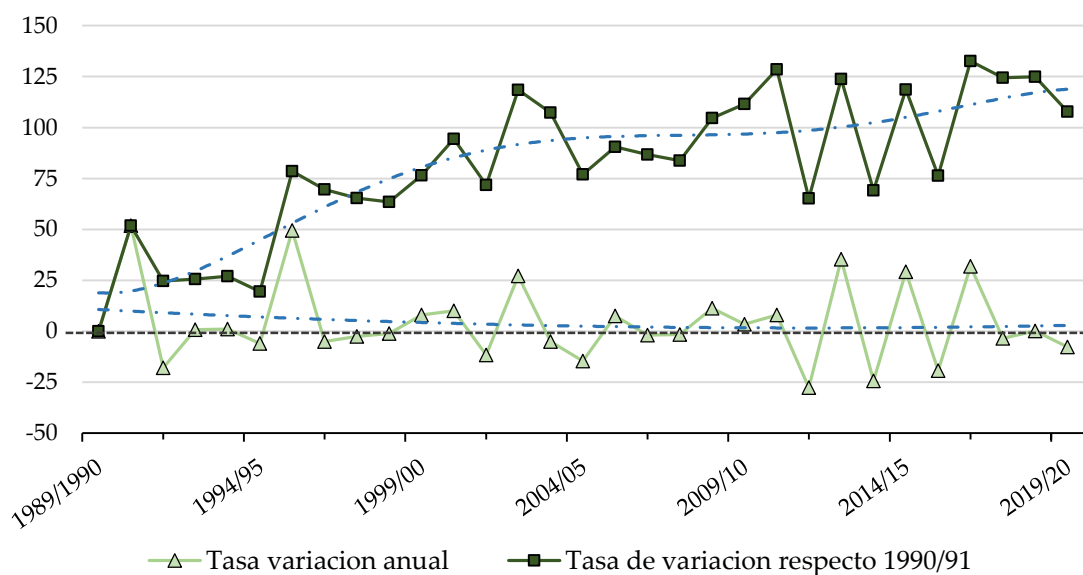


Figura 1.7. Variación en la producción mundial de aceites de oliva desde 1990. Fuente: elaboración propia a partir de datos del Consejo Oleícola Internacional (COI, 2023).

El consumo del aceite de oliva tradicionalmente se ha concentrado en los países productores. La tendencia observada en los últimos 15 años refleja un aumento considerable en el consumo de aceite de oliva en los países situados fuera de la Cuenca Mediterránea, no productores, de forma simultánea a la estabilización de su consumo en los principales países productores (Figura 1.8).

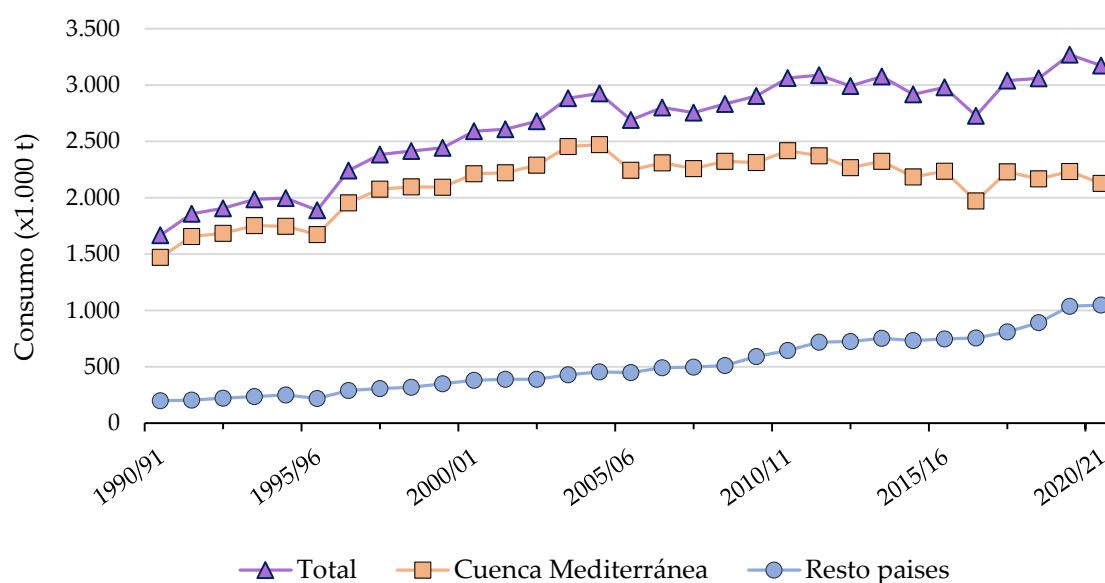


Figura 1.8. Evolución de consumo mundial de aceite de oliva desde 1990. Fuente: elaboración propia a partir de datos del Consejo Oleícola Internacional (COI, 2023).

Tradicionalmente, los principales países consumidores han sido Italia, España y Grecia, en el orden descrito, al ser un producto de consumo de cercanía. La globalización de los mercados y los cambios en las tendencias en el consumo definen hoy en día a España como líder en consumo (17%, 541.100 t), seguida de cerca por Italia (13%, 418.600 t) y Estados Unidos (12,3%, 389.000 t). Turquía (4,7%, 150.000 t) y Grecia (3%, 110.200 t) suelen disputarse el cuarto puesto (datos definitivos campaña 2020/21, COI 2023). Desde 2005, la Unión Europea adolece de una disminución en el consumo de aceites de oliva (-30%), principalmente causada por Italia y Grecia, pero compensada por la aparición de nuevos mercados como Chile (14.000 t) y China (53.000 t) y el incremento de otros como Estados Unidos (+43%), Japón (+49%), Canadá (+48%), Australia (+38%) y Brasil (+76%) los cuales deben importar la práctica totalidad del aceite que consumen (datos definitivos campaña 2020/21; COI, 2023).

1.1.3.2.2. Mercado nacional, España

La evolución en toneladas de aceites de oliva virgen en España ha sufrido, en los últimos 10 años, grandes oscilaciones debido a las malas campañas oleícolas acontecidas en los años 2012 y 2014 (Figura 1.9). Estos hechos se ven reflejados también en las variaciones de la producción mundial al ser el España el primer productor (Figura 1.7). A pesar de ello, se aprecia la estabilidad en la producción oleícola nacional.

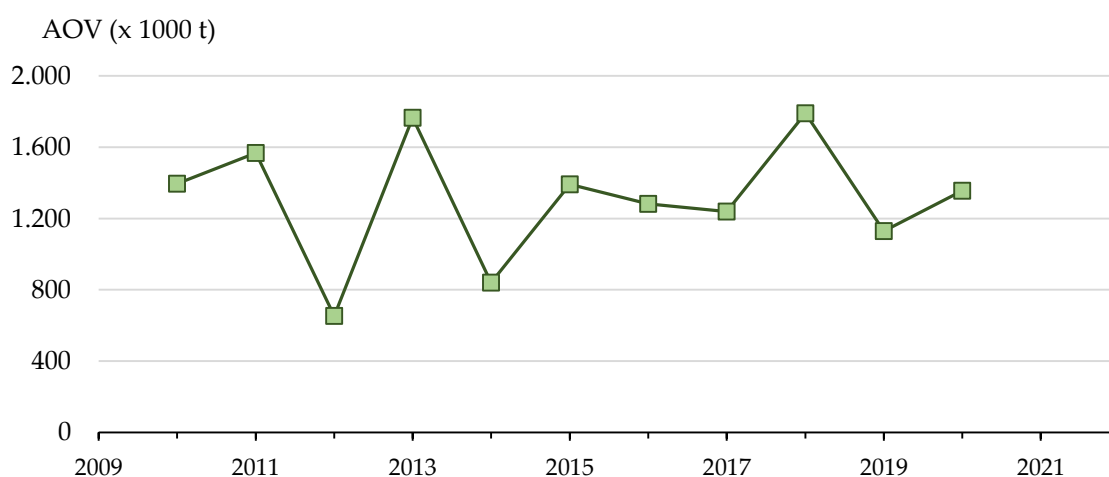


Figura 1.9. Evolución de la producción total de aceite de oliva virgen (extra, virgen y lampante) en España. Periodo 2010/11 a 2020/2021. Elaboración propia. Fuente: datos definitivos del Anuario de Estadística. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2021a).

El reparto de la producción de aceite de oliva según comunidades autónomas no es homogéneo. Andalucía es la comunidad autónoma por excelencia en producción de aceite de oliva (2020: 1.094.318 t), seguido de lejos por Castilla-La Mancha (2020: 117.475 t), Extremadura (2020: 50.374 t), Cataluña (2020: 28.136 t), C. Valenciana (2020: 25.201 t), Aragón (2020: 12.624 t) y R. de Murcia (2020: 11.527 t). Aunque la gran mayoría de regiones están experimentando grandes incrementos en su producción (Tabla 1.3), la influencia del peso de estos incrementos en el total de España es mínimo debido a la magnitud del olivar andaluz.

Tabla 1.3. Evolución de la producción de aceite de oliva en España según comunidades autónomas durante el periodo 2010/11 a 2019/20 y tasa de variación.

CCAA	Producción aceite de oliva en España(t)		
	2010/11-2014/15	2015/16-2019/20	tasa variación (%)
Andalucía	1.016.230	1.094.796	+8
Castilla-La Mancha	96.457	113.049	+17
Extremadura	44.725	67.678	+51
Cataluña	32.276	28.358	-12
C. Valenciana	23.088	24.359	+6
Aragón	11.287	13.697	+21
R. de Murcia	7.644	10.910	+43
Navarra	3.504	4.543	+30
Madrid	4.816	3.878	-19
La Rioja	1.638	2.502	+53
Castilla y León	1.678	1.573	-6
Baleares	461	591	+28
Canarias	39	125	+217
País Vasco	104	72	-31
Galicia	91	38	-58
Cantabria	-	-	-
P. de Asturias	-	-	-
Total, España	1.244.091	1.366.155	+10

Elaboración propia. Fuente: Datos definitivos de Anuario de Estadística. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2021a).

1.1.4. La olivicultura en Aragón

Desde antaño, el cultivo del olivo ha sido una práctica tradicional, reconocida y muy arraigada en las tierras aragonesas. Los olivares que bordeaban el discurrir del río Ebro hasta su desembocadura hicieron que los romanos conocieran a este río como *Oleum Flumen*, río del aceite. Esta descripción del Valle del Ebro la recoge en su obra *Ora*

Marítima («Las costas marítimas») el poeta y geógrafo romano Avienus en el siglo IV, inspirada en textos griegos y romanos del siglo VI a.C.

Aunque las cifras actuales del sector olivicultor en Aragón, en cuanto al cultivo del olivo y producción de aceites de oliva, no alcancen a las de otras regiones españolas, los aceites de oliva de esta comunidad autónoma son muy apreciados en los mercados nacionales e internacionales debido a su alta calidad y a su diferenciación respecto a otros aceites con mayor producción.

1.1.4.1. Situación actual

El olivo en Aragón es uno de los cultivos leñosos más importantes. En el año 2020 ocupó un 3,8% de la superficie agrícola de Aragón, un total de 49.226 ha (2,0% de la superficie oleícola española) (Gobierno de Aragón, 2023a). El olivar aragonés tuvo un periodo de declive importante y amplio en el tiempo del que todavía no se ha recuperado. En 1963, su superficie oleícola alcanzó las 91.000 ha, aunque llegó a reducirse a la mitad a causa del arranque de viejos olivares (Civantos, 2008). En los últimos años, ha habido un ligero repunte del olivar en Aragón (Figura 1.10) causado por nuevas plantaciones (2021: 1.982 ha de olivar joven (3,3%), aunque el ritmo es inferior respecto a otras comunidades autónomas con olivar tradicional como Extremadura (6,2%), Andalucía (7,3%) o Castilla-La Mancha (9,6%) (MAPA, 2021b).

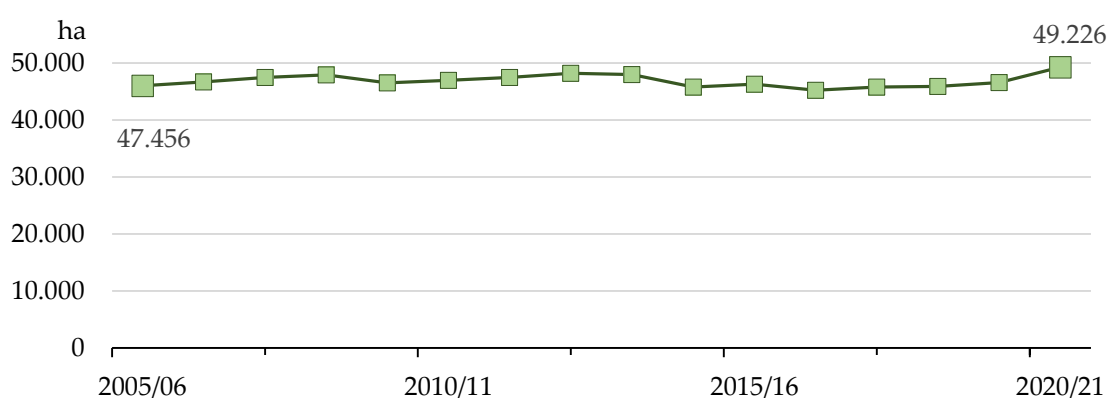


Figura 1.10. Evolución de la superficie de olivar cultivado en Aragón desde 2005. Fuente: elaboración propia a partir de datos definitivos del Anuario de Estadística. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2021a).

Respecto a la distribución del olivar aragonés en provincias, el 50,7% se localiza en Teruel (24.966 ha), mientras que Zaragoza y Huesca se reparten el 29,9% (14.708 ha) y el 19,4% (9.552 ha) respectivamente (MAPA, 2021a). La estabilización o ligero ascenso que disfruta la olivicultura en Aragón contempla diferentes manifestaciones según la provincia. La tasa de variación actual respecto a la superficie del olivar en 2005 informa incrementos en las tres provincias (Tabla 1.4).

Tabla 1.4. Evolución de la superficie de olivar de almazara en las provincias de Aragón. Plantación regular y tasa de variación sobre la base de 2005.

CCAA	Superficie total en plantación regular (ha)				
	2005	2010	2015	2020	tasa variación (%)
Huesca	8.713	7.822	7.078	9.552	+10
Teruel	23.256	23.900	24.249	24.966	+7
Zaragoza	14.017	15.221	14.941	14.708	+5
Total, Aragón	45.986	46.943	46.268	49.226	+7

Elaboración propia. Fuente: datos definitivos del Anuario de Estadística. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2021a).

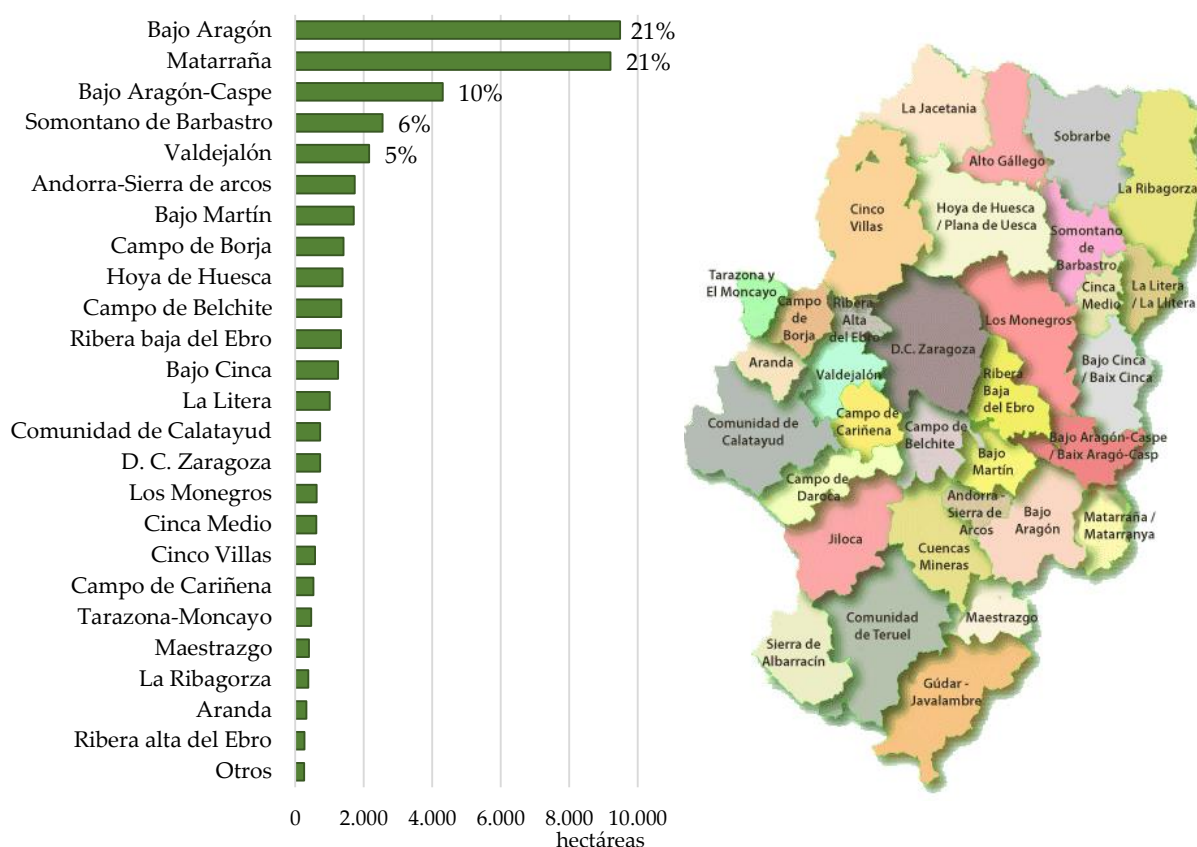


Figura 1.11. Distribución del olivar (ha) por comarcas en el año 2017. Elaboración propia. Fuente: datos SIGPAC, Gobierno de Aragón (<https://www.aragon.es/-/estadisticas-agricolas>).

Las comarcas del Bajo Aragón y Matarraña, seguidas por Bajo Aragón-Caspe y Somontano de Barbastro, son los territorios con mayor superficie de olivar en Aragón, si se realiza una visualización de la distribución del olivar aragonés mucho más minuciosa según el territorio comarcal (Figura 1.11).

El cultivo del olivo ha sido tradicionalmente en secano, pero a su vez es el menos productivo. En Aragón, el 74,9% de la superficie oleícola se cultiva en secano, un porcentaje ligeramente inferior al conjunto de España (77,6%). La evolución del secano está en retroceso en favor del regadío en Aragón (Figura 1.12), a un ritmo menor que la observada en otras comunidades autónomas con olivares tradicionales como Extremadura o Andalucía, que apuestan por plantaciones en intensivo o superintensivo en mayor medida que Aragón. Zaragoza es la provincia que más ha apostado por el regadío (2020/21: 55%) mientras que Teruel sigue cultivando en secano principalmente (2020/21: 91%) lo que se traduce en un menor rendimiento en la productividad de las explotaciones oleícolas.

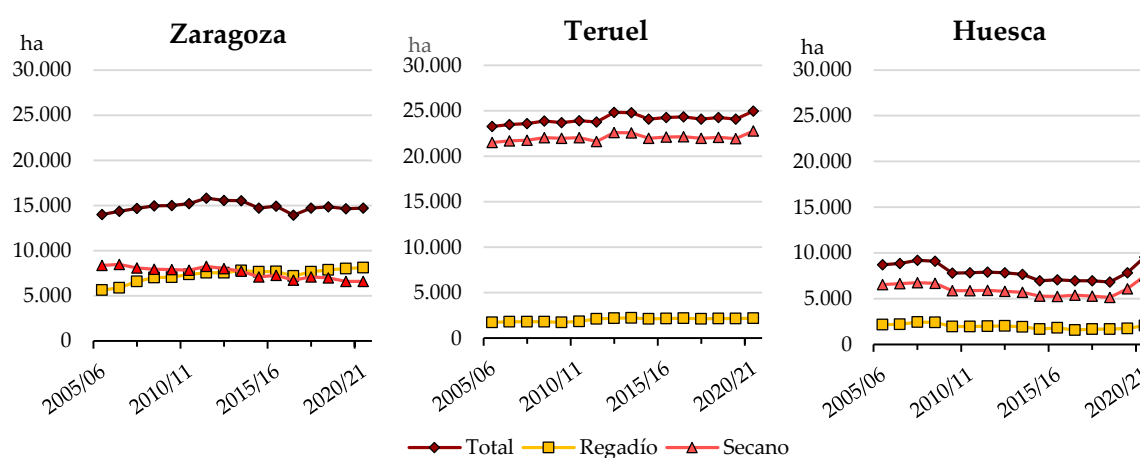


Figura 1.12. Comparativa en la evolución del tipo de cultivo del olivo en las provincias Zaragoza, Teruel y Huesca durante el periodo 2005-2020 (MAPA, 2021a).

La producción de aceite de oliva en Aragón se realiza a través de sus 103 almazaras distribuidas en las tres provincias (Huesca: 28, Teruel: 32, Zaragoza: 43) de las cuales un 52% son cooperativas agrarias, un porcentaje similar al resto de comunidades autónomas (MAPA, 2023a). Desde 2010, el aceite de oliva en Aragón ha experimentado un incremento en su producción, aunque de forma desigual entre provincias (Tabla 1.5).

El ligero incremento que ha experimentado el cultivo del olivo en regadío (Figura 1.12), acompañado quizás de la intensificación del cultivo que suelen experimentar hoy en día las nuevas plantaciones, podrían ser las causantes de las diferencias.

Tabla 1.5. Evolución de la producción de aceite de oliva en Aragón y tasa de variación, según provincias, durante el periodo 2010/11 a 2019/20.

Provincias	Producción aceite de oliva en Aragón (t)		
	2010/11-2014/15	2015/16-2019/20	tasa variación (%)
Zaragoza	5.382	7.264	+35
Teruel	4.041	4.056	0
Huesca	1.864	2.378	+28
Total, Aragón	11.287	13.697	+21

Elaboración propia. Fuente: Datos definitivos del Anuario de Estadística. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2021a).

La evolución anual en la producción de aceite de oliva virgen en Aragón, y detallada en sus tres provincias, se observa en la Figura 1.13. La exigua campaña nacional de 2012 también se sufrió en Aragón, a diferencia de la campaña de 2014, pero en mucha menor medida en Zaragoza respecto a Teruel. Quizás por su menor dependencia climatológica debido al mayor número de hectáreas de olivar en regadío.

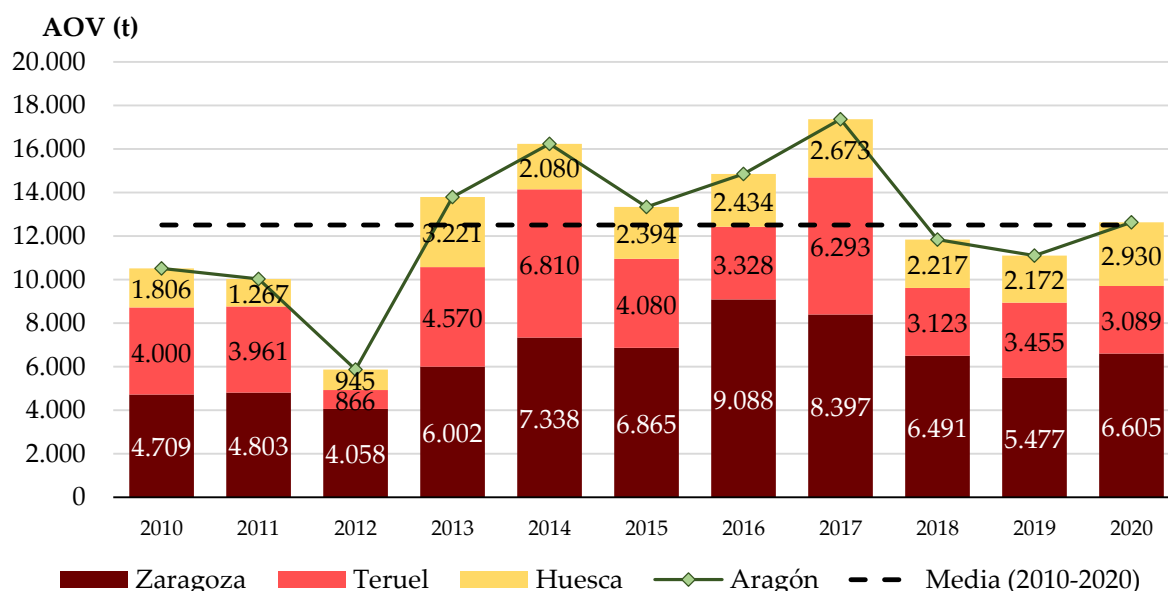


Figura 1.13. Evolución anual de la producción total de aceite de oliva virgen (extra, virgen y lampante) en Aragón y sus provincias. Periodo 2010-2019. Elaboración propia. Fuente: Datos del Anuario de Estadística. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA, 2021a).

En cuanto a la calidad de los aceites de oliva producidos en Aragón, la comunidad autónoma produce mayoritariamente aceites de la categoría comercial más alta (74%), virgen extra, seguido de los aceites de oliva lampantes. Esta última categoría ha desplazado del segundo lugar al aceite de oliva virgen en los últimos años.

1.1.4.2. Variedades de olivo en Aragón

Algunas de las variedades principales de Aragón ya fueron descritas o referenciadas en tratados de la época por autores ilustres de los siglos XVII-XVIII, cuando el olivo como cultivo alcanzó gran importancia en Aragón. En 1798, el botánico I. Jordán de Asso ya diferenció y describió dos variedades principales de olivo cultivadas en las tres provincias de Aragón: Empeltre y Royal (de Asso, 1798). En su obra, este autor subrayó la calidad sobresaliente de los aceites de Empeltre y el incremento de nuevas plantaciones de esta variedad frente al abandono de la variedad Royal. Además, se refirió a la obra escrita por el jurista Gerónimo Ardid en 1646, *Restauro de la agricultura y destierro del ocio*, primera obra impresa en Aragón que trató específicamente sobre agricultura en la que se describe la importancia de la variedad Empeltre («olivos ingertos») la cual es el resultado de «la injertación repetida», método «inventado por los aragoneses» («...oleas ex iterata insitione provenientes, quas nos Empeltres vocamus: atque hujus methodi (ab Aragonensibus inventæ) ...»).

Aragón, al igual que el resto de España, no ha estado exento de dificultades en la identificación y catalogación de sus variedades autóctonas. Muchas de las denominaciones tradicionalmente adjudicadas a las variedades aragonesas eran referencias hacia alguna característica que las diferenciaba como la forma, color o uso del fruto incluso su lugar de origen. Tal fue así en la descripción realizada por Alberto de Megino sobre las variedades más conocidas en Aragón en 1804: Royal, Negral, Sevillano, Racimillo o Uva, Acebuche, Picudillo, Verdillo, Cirujal o Largal y Zuequillo o Empeltre (de Megino, 1804). En fechas similares, el oscense Félix de Azara catalogó y realizó la descripción morfológica sobre 10 variedades cultivadas en Alquézar (Huesca), algunas de ellas actualmente con producciones muy locales en Huesca (Aragón), en su informe sobre *Los olivos de Alquézar y sus aldeas* (Viñuales et al., 2013). Este autor utilizó

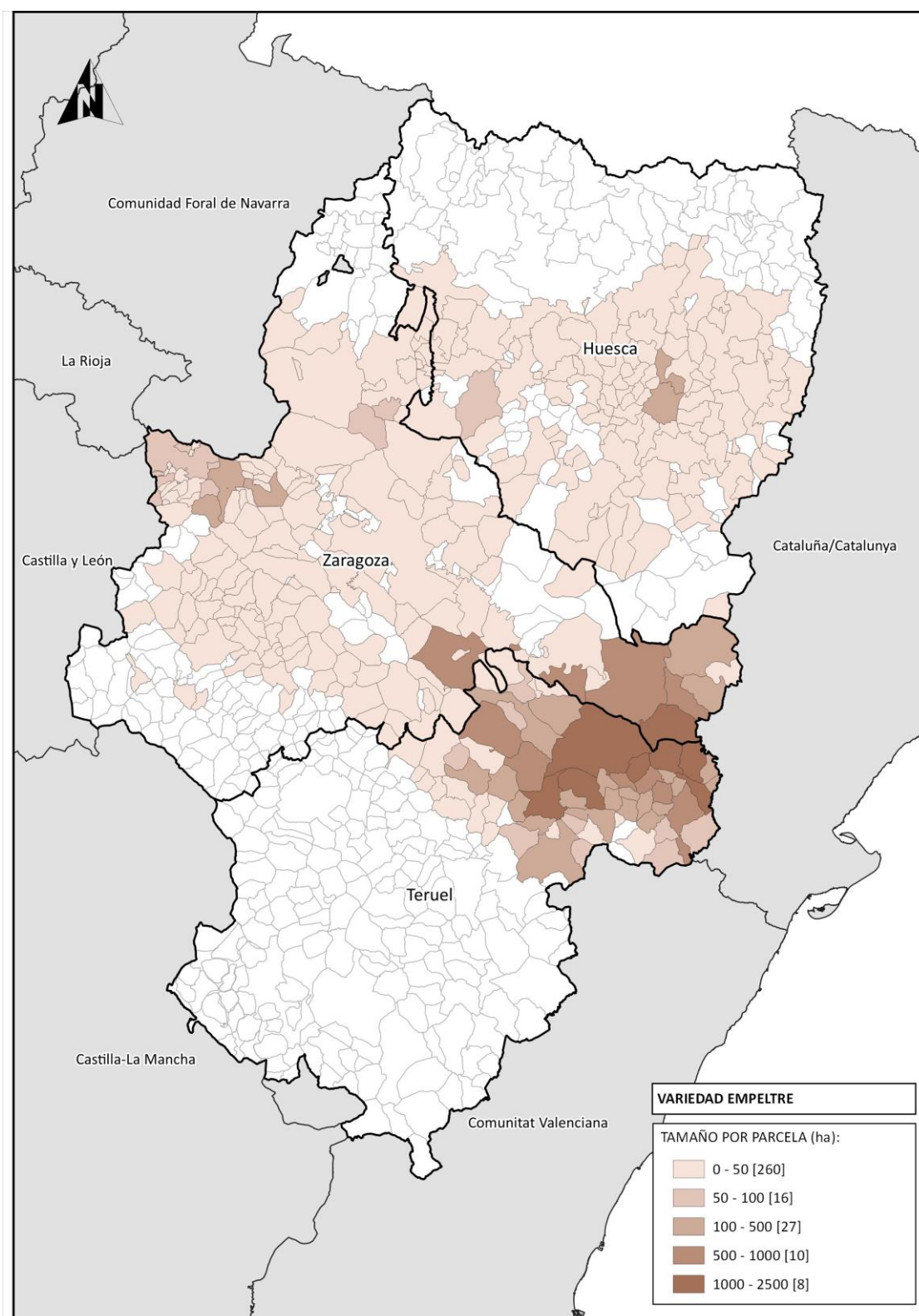
el nombre local para enumerar las variedades. Estas fueron Manzanilla (Alquezrana), Cerecera (Royeta), Negral (Neral), Panseña (Panseñera), Mochuta (Mochuto), Grosal, Olivonera, Verdeña (Royal de Calatayud), Minutesa y Rebordenca. Posteriormente, Priego Jaramillo realizó un importante estudio de catalogación de variedades en base a caracteres morfológicos y agronómicos utilizando la confusa denominación científica de la época (Priego, 1930). Describió 14 variedades en Aragón: 7 variedades generalizadas entre las cuales *O. Europaea* L. *Nigricans* (Empeltre), *O. Europaea* L. *Ilerdensis* (Arbequina), *O. Europaea* L. *Viridula* (Royal de Calatayud) y *Olea Europaea* L. *Atro-rubens* (Negral) además de 4 variedades secundarias (ej. *O. Europaea* L. *pomiformis* o Alquecerana) y tres variedades diseminadas.

Hasta la fecha, el estudio de identificación y catalogación de variedades de Priego es el único estudio completo realizado en Aragón que abarque las tres provincias, aunque se utilizó una metodología antigua que no ha permanecido. Trabajos más recientes de prospección, identificación y catalogación de variedades han sido realizados en distintas zonas oleícolas de Aragón por diversos autores (Viñuales, 2007; Viñuales *et al.*, 2013; Espada *et al.*, 2009; Fernández i Martí *et al.*, 2015). Otros proyectos amparados bajo el Programa de Desarrollo Rural 2014-2020 del Gobierno de Aragón, como el finalizado «Biodiversidad del olivar de la Denominación de Origen Aceite Sierra del Moncayo» o el vigente «Creación de un banco de germoplasma de variedades locales de olivos en Aragón» continúan con la prospección del territorio de Aragón (Gobierno de Aragón, 2023b). En ambos proyectos se han utilizado parámetros morfológicos, principalmente en fruto y hueso, pero combinados con las más actuales técnicas moleculares de ADN para una correcta identificación y denominación de las variedades locales.

Todos estos trabajos ponen de relieve la amplia diversidad varietal existente en el olivar aragonés, con gran cantidad de variedades locales escasamente difundidas fuera de su presunta zona de origen, pero importantes en su área de cultivo. La variedad Empeltre es la excepción; su cultivo tradicional se ha ubicado a lo largo del Valle del Ebro, además de Baleares. La razón de esta excepción reside en su capacidad de

enraizamiento limitada, por lo que se injerta sobre otros pies. Este método de propagación es el motivo por el cual la variedad se llama Empeltre, que proviene de la palabra aragonesa «impelte» o «empelte» cuyo significado es «olivo injertado». Este método de propagación y su práctica en Zaragoza (Aragón) ya se utilizaba antaño y fue descrito profusamente por Diego de Torres, secretario de la Real Sociedad Aragonesa, en una carta dirigida a dicha Sociedad (Martínez, 1785). En esta carta se destacaba el beneficio que reportaban los más de 20.000 Empeltres que los «labradores» vendían anualmente a Navarra, Castilla y pueblos varios de Aragón.

La variedad Empeltre fue, y sigue siendo hoy por hoy, la variedad cultivada en Aragón más importante, un 67% del olivar (29.315 ha) en 2017. Le sigue la variedad Arbequina (20%; 8.922 ha) y, en tercer y cuarto lugar, Royal de Calatayud o Verdeña (5%; 2.287 ha), como se la conoce en el Somontano y Negral de Sabiñán (1%; 518 ha) (Gobierno de Aragón, 2023c). La superficie de las cuatro variedades cultivada en 2017, según los municipios, se aprecia en la Figura 1.14 para las variedades principales, Empeltre y Arbequina y en la Figura 1.15 para las variedades secundarias Royal de Calatayud y Negral de Sabiñán.



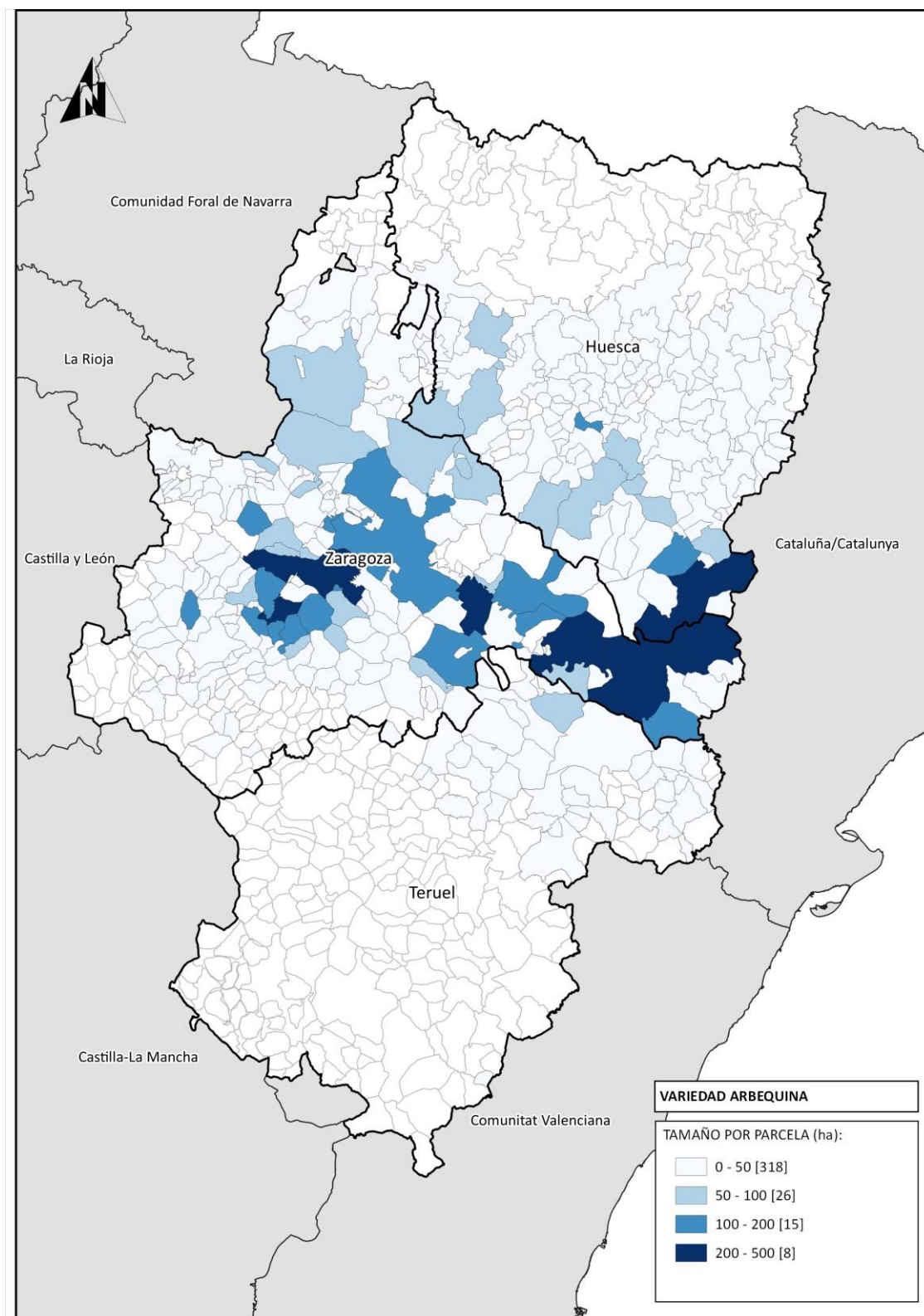
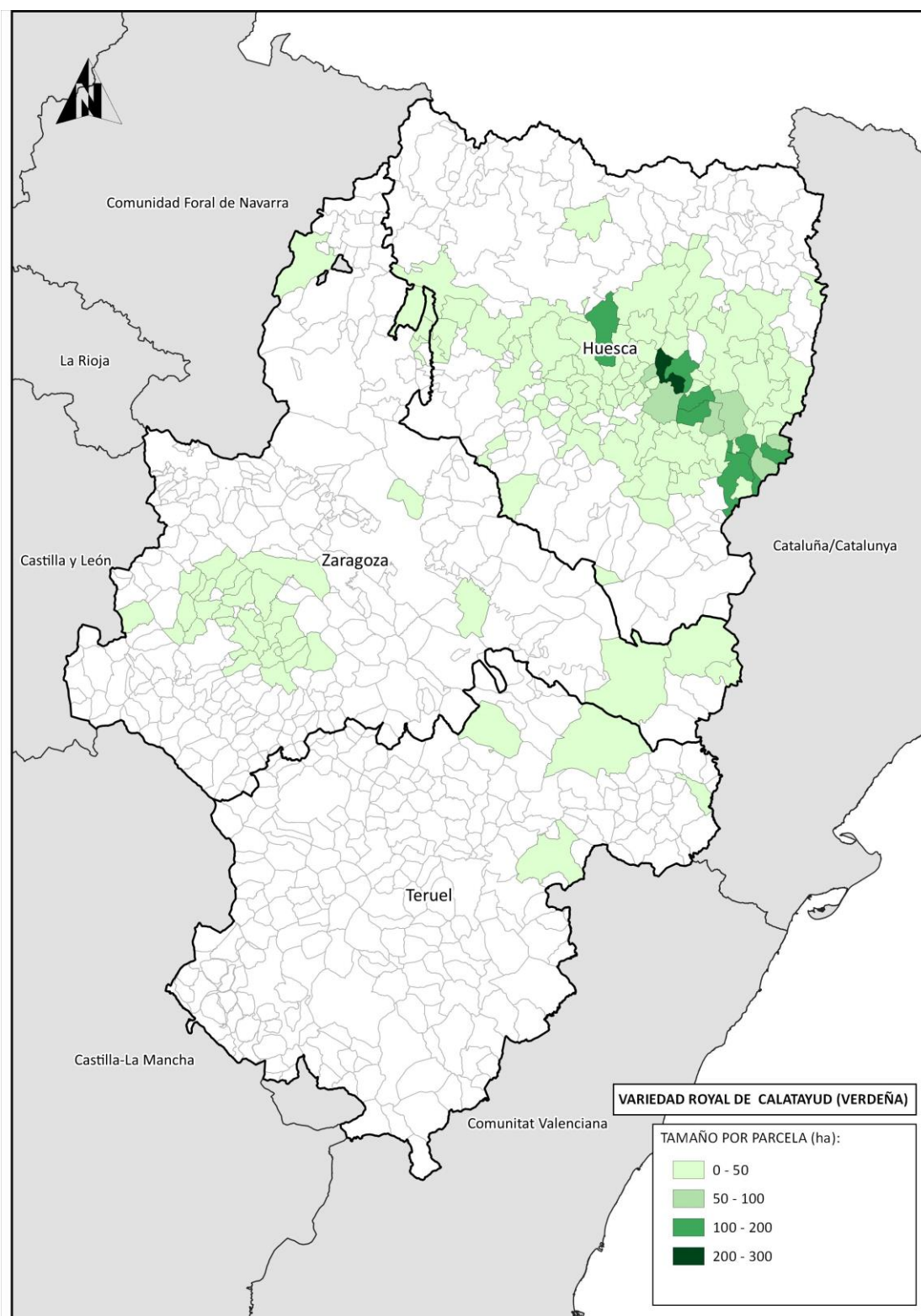


Figura 1.14. Distribución por municipios de cultivo de las dos principales variedades de olivo en Aragón: Empeltre y Arbequina. Elaboración: Gobierno de Aragón (Datos: SIGPAC 2017, <https://www.aragon.es/-/estadisticas-agrarias>).



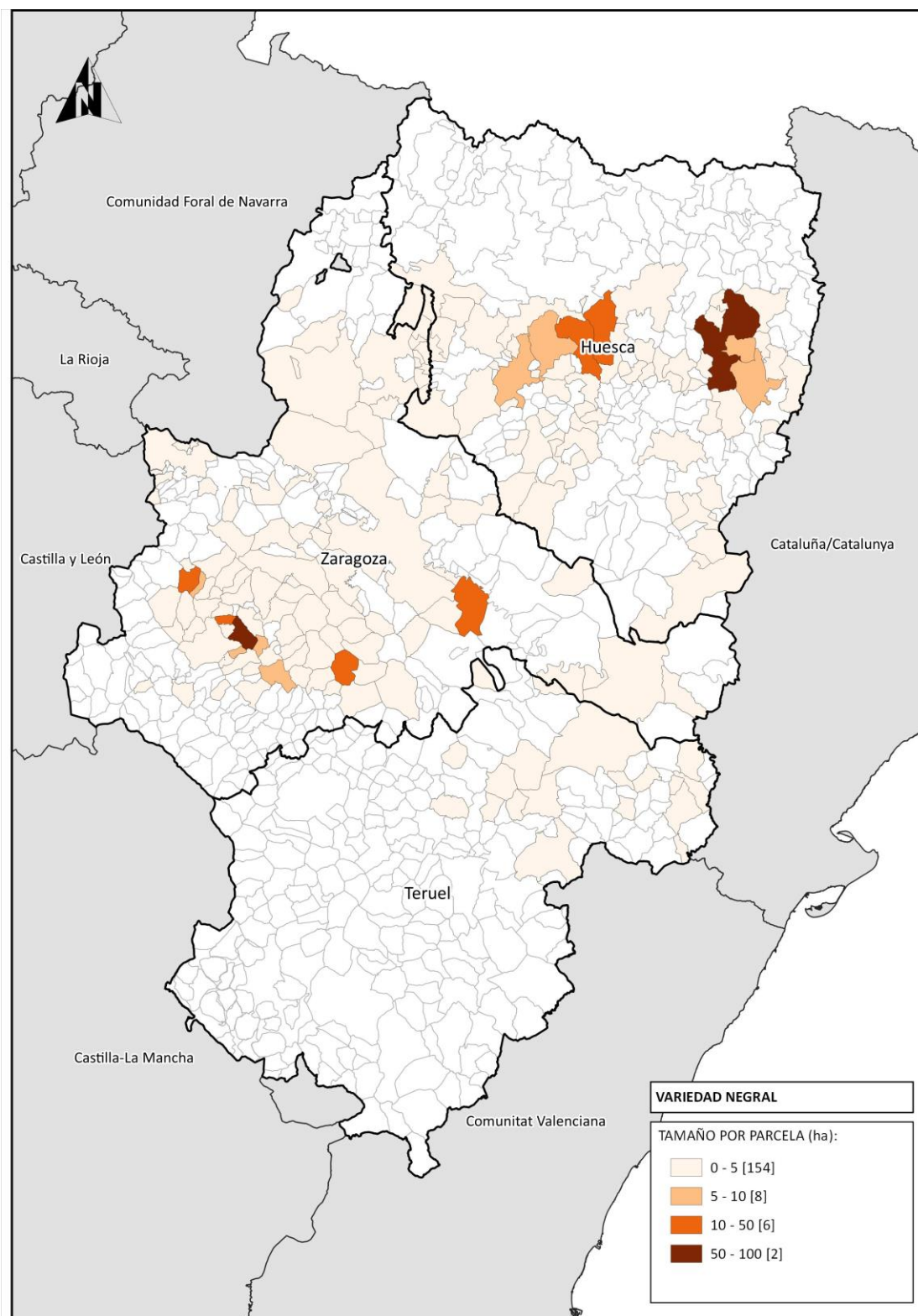


Figura 1.15. Distribución por municipios de cultivo de las variedades secundarias Royal de Calatayud (izquierda) y Negral de Sabiñán (derecha) en Aragón. Elaboración: Gobierno de Aragón (Datos: SIGPAC 2017) <https://www.aragon.es/-/estadisticas-agrarias>.

Empeltre (Figura 1.16), además de ser la variedad autóctona de mayor cultivo en Aragón, es una de las variedades principales de España ocupando unas 70.000 ha del olivar (Rallo *et al.*, 2005). Otras comunidades autónomas que la cultivan son: Baleares, Cataluña, La Rioja, Navarra y Valencia en cuyas Denominaciones de Origen Protegida de aceite de oliva se encuentra también presente. Internacionalmente, esta variedad se puede encontrar en plantaciones reducidas ubicadas en Argentina, Chile, Perú o Uruguay. Centrándonos de nuevo en Aragón, esta variedad se halla presente en las tres provincias, pero es el Bajo Aragón (región ubicada entre Zaragoza y Teruel) en donde el número de hectáreas es mucho mayor (Figura 1.14). El interés comercial del cultivar Empeltre es alto debido a su buen comportamiento agronómico con alta resistencia al repilo, maduración muy precoz, buen rendimiento y alta productividad (Tous *et al.*, 1993, 2004; Rallo *et al.*, 2005).



Figura 1.16. Aceitunas de la variedad Empeltre. Fuente: Imagen propia.

Su fruto, alargado y de peso medio, alcanza el color negro en su maduración. Esta variedad tiene una característica que la diferencia de la gran mayoría, ya que sus aceitunas pueden tener dos destinos: consumo como aceitunas negras de mesa o para obtención de aceite. Como consecuencia, las aceitunas se cosechan habitualmente muy maduras. Esa peculiaridad, tradicional de este cultivo en Aragón, transmite a los aceites de oliva virgen extra de Empeltre ciertas características por las que son reconocidos: frutado maduro, dulzor y suavidad y, por tanto, bajo contenido fenólico, bajo amargor y estabilidad oxidativa media-baja (Gracia, 2001; Gracia *et al.*, 2009; Abenoza *et al.*, 2019). Hoy en día, el aceite tradicional de Empeltre comparte mercado con otros Empeltre más tempranos, en los que el picor y el amargor y las notas olfativas más verdes combinan equilibradamente con el dulzor que caracteriza a los aceites de esta variedad consiguiendo mayor estabilidad oxidativa.

Arbequina (Figura 1.17), es la variedad más importante en Cataluña. En Aragón se encuentra ampliamente difundida, aunque se localiza sobre todo en las provincias de Zaragoza y Huesca (Figura 1.14). En los últimos años, la selección clonal de esta variedad y su porte reducido, lo que permite su mecanización, ha propiciado un aumento exponencial de su cultivo en plantaciones intensivas tanto en España, incluyendo a Aragón, como fuera de España. Su fruto esférico, pequeño y de peso bajo, tiene alto rendimiento graso y su aceite, aunque de excelentes características organolépticas, presenta baja estabilidad oxidativa (Rallo *et al.*, 2005; Gracia *et al.*, 2009; Benito *et al.* 2012b, 2013; Abenoza *et al.*, 2015b).



Figura 1.17. Aceitunas de la variedad Arbequina. Fuente: Imagen propia.

Royal de Calatayud (Figura 1.18) es una variedad local de Aragón mayoritariamente presente en Huesca (Somontano de Barbastro) y Zaragoza (Calatayud, Valle del Jalón) (Figura 1.15). Conocida popularmente como Verdeña en Huesca (otras sinonimias: Royal y Verdilla (Rallo *et al.*, 2005), tiene elevada productividad, pero es muy vecera. El fruto ovoidal y de peso medio, es de maduración tardía, alcanzando el color violeta oscuro sin llegar al negro, y con un rendimiento graso alto (Viñuales, 2007; Espada *et al.*, 2009). El aceite obtenido, más verdoso que el de Empeltre, tiene muy buenas cualidades organolépticas y una estabilidad oxidativa media (Espada *et al.*, 2009; Benito *et al.*, 2012a).



Figura 1.18. Aceitunas de la variedad Royal de Calatayud. Fuente: Imagen propia.

Negral de Sabinán (Figura 1.19.), sinonimia de Negral (Rallo *et al.*, 2005), hace referencia a la precocidad de su maduración que alcanza el color negro. Principalmente se cultiva en la cuenca del Jalón (Zaragoza) y en Huesca (Figura 1.15). De productividad media, sufre mayor vecería que Empeltre. Su fruto es elipsoidal, acercándose a la forma esférica, y es de mayor peso que Empeltre. Al igual que esta variedad, tiene doble aptitud. El aceite se caracteriza por bajo contenido en ácido oleico y alto en linoleico además de muy baja estabilidad oxidativa (Espada *et al.*, 2009).



Figura 1.19. Aceitunas de la variedad Negral de Sabinán. Fuente: Imagen propia.

1.1.4.3. Mejora genética del olivar aragonés

La variedad Empeltre, principal de Aragón y probablemente originaria de la región, participó en un programa de selección clonal para su mejora genética que ha culminado con la comercialización del clon «Farax». Durante el periodo 1998-2002 se llevó a cabo la preselección clonal con la participación de las seis regiones donde tradicionalmente se ha cultivado esta variedad (Aragón, Baleares, Cataluña, La Rioja, Navarra y Valencia). Los 16 clones seleccionados, 8 de ellos procedentes de Aragón (Tous *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2011), se plantaron en dos ensayos comparativos ubicados en dos ambientes diferentes (Gandesa, Cataluña y Alcañiz, Aragón) (Romero *et al.*, 2009, 2012) lugares donde se realizaron estudios sobre la variabilidad de las características del fruto y del aceite de oliva (Romero *et al.*, 2012).

1.1.4.4. Denominaciones de Origen Protegida de aceite en Aragón

Aragón es una comunidad autónoma que abarca regiones olivareras diferenciadas, con características culturales y geográficas propias, las cuales producen aceites de oliva virgen extra únicos y de gran calidad, amparados bajo Denominaciones

de Origen Protegida (DOP), figura instrumental de protección de la política de calidad diferenciada (Gobierno de Aragón, 2023d). La DOP de aceite más antigua de Aragón, reconocida desde el año 2000, es «Aceite del Bajo Aragón». Su zona de producción, situada al sureste de Aragón, comprende 77 municipios de dos provincias: Zaragoza y Teruel. El aceite de oliva virgen extra de esta denominación debe proceder exclusivamente de las variedades de olivo autóctonas: Empeltre (en proporción mínima del 80%), Arbequina y Royal (BOA, 2009). La segunda DOP actualmente reconocida en Aragón es «Aceite Sierra del Moncayo» y protege al aceite de oliva virgen extra producido en 34 municipios de la provincia de Zaragoza, situados al oeste de Aragón. Las variedades incluidas en esta Denominación de Origen Protegida son: Empeltre, Arbequina, Negral, Verdial y Royal (BOA, 2010). Una tercera DOP, «Aceite del Somontano», se encuentra actualmente en trámite de registro (BOA, 2023). Esta nueva Denominación engloba a 42 municipios de la provincia de Huesca, al noreste de Aragón. El aceite de oliva virgen extra «Aceite del Somontano» es un aceite multivarietal que procede en un 85% de una o más variedades autóctonas y locales reconocidas como Albareta, Alcampelina (Verdiell), Alía, Alquezrana (Manzanilla), Blancal, Caspolina (Sevillano), Cerecera (Royeta de Asqué), Cerruda, Gordal del Somontano, Injerto (Empeltre), Mochuto, Negral de Bierge, Neral, Nación, Panseñera, Piga, Verdeña (Royal de Calatayud, Verdilla). Algunas de ellas tienen otras denominaciones, sinonimias u homonimias, por las que se reconoce en otros lugares de Aragón (Rallo *et al.*, 2005; Viñuales, 2007; Espada *et al.*, 2009).

1.2. LA ACEITUNA

El fruto del olivo se denomina, según la Real Academia Española (RAE), oliva o aceituna. Aunque en el sector oleícola el uso de la palabra aceituna tiene mayor aceptación formal, en Aragón y en otras comunidades autónomas situadas en el litoral mediterráneo se prefiere el uso de la palabra «oliva», derivada del latín *oliva* que a su vez deriva de griego clásico, *ελαία* (elaia). En cambio, la palabra «aceituna» deriva de la palabra árabe *azzaytúna*. En la etimología de ambas palabras se visualiza la influencia de la cultura oleícola de las distintas civilizaciones que colonizaron la Península.

1.2.1. Descripción y desarrollo del fruto

La botánica describe a la aceituna como una drupa de forma esférica o elipsoidal que contiene una sola semilla. Su tamaño y su peso variable, incluso en el mismo árbol, depende de factores como la variedad, la carga de frutos, la fertilidad del suelo, la cantidad de agua disponible y las prácticas culturales agronómicas empleadas (Lavee y Wodner, 1991, 2004; Beltrán *et al.*, 2004a).

La drupa está compuesta por tres tejidos principales, cada uno de los cuales sigue una forma muy distinta de crecimiento y diferenciación en el desarrollo del fruto. El epicarpio o piel, tejido más externo que contiene los estomas; el mesocarpio o pulpa, tejido comestible del fruto; y el endocarpio o hueso, que incluye la semilla con el embrión (Figura 1.20).

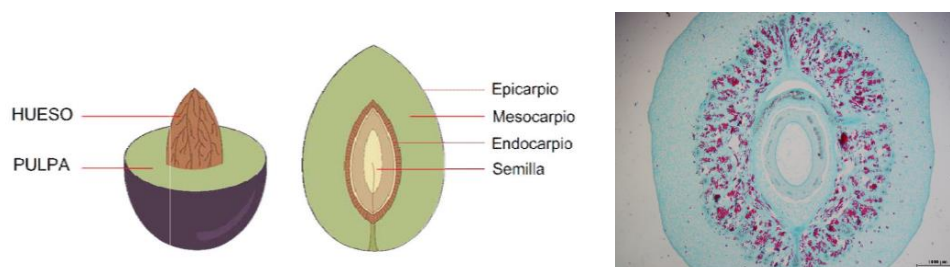


Figura 1.20. Partes estructurales de la aceituna (izquierda). Imagen microscópica transversal del fruto de la variedad Barnea (derecha). Fuente: Nissim *et al.*, 2020.

En variedades destinadas a la obtención de aceite, el peso de la aceituna suele oscilar entre 1,5 y 5,0 g del que un 70-90% corresponde al mesocarpio, un 9-27% al endocarpio y un 2-3% a la semilla (Beltrán *et al.*, 2008).

Como drupa, el crecimiento de la aceituna se ajusta a una doble curva sigmoidea en la que las distintas fases, dependientes de la variedad y factores ambientales o agronómicos, están representadas (Frías *et al.*, 1991). La duración aproximada del proceso es de 4 a 5 meses (Connor y Fereres, 2010) durante los cuales la aceituna pasa del estado fenológico 71 al 89 (EF) (Sanz-Cortés *et al.*, 2002) (Figura 1.21).

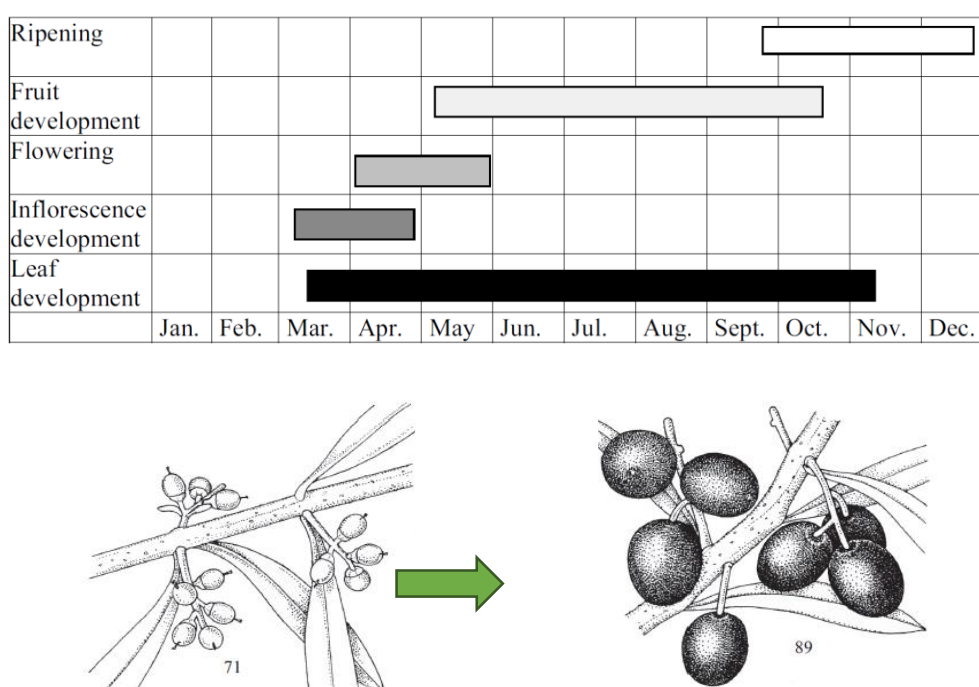


Figura 1.21. Desarrollo del olivo durante las estaciones (arriba). Estados fenológicos (EF) del olivo durante el desarrollo del fruto (izquierda: EF71, derecha: EF89; escala BBCH) (Debajo). Fuente: Sanz-Cortés *et al.*, 2002.

El aumento de tamaño del fruto durante la primera fase de crecimiento (fase I), aunque apenas perceptible en las primeras semanas, se debe a la división y expansión celular de todos los tejidos del fruto. En esta fase, es el endocarpio el tejido que principalmente se desarrolla, llegando a alcanzar un 80% del volumen del fruto. Tras un período durante el cual el crecimiento se ralentiza o se detiene, el fruto experimenta un nuevo incremento de tamaño debido al ensanchamiento de las células del mesocarpio que determina su tamaño final en una segunda fase de crecimiento (fase II). El

crecimiento de la aceituna concluye aproximadamente con el endurecimiento completo del endocarpio. Durante esta fase comienza además la lipogénesis o biosíntesis de aceite y su acumulación en las células parenquimáticas del mesocarpio. El enverado o cambio de color de la epidermis, que determina el comienzo de la maduración, es el culmen de esta fase. En una última fase (fase III), tienen lugar los procesos derivados de la maduración del fruto. Mientras, el crecimiento del fruto y la lipogénesis se ralentizan notablemente.

1.2.2. Maduración. Cambios fisiológicos y bioquímicos asociados.

A lo largo del proceso de maduración que sufre la aceituna, se producen en ella una serie de cambios. Fisiológicamente, se modifica el color, la textura, la dureza del fruto o la resistencia al desprendimiento. Los cambios químicos se aprecian en la variación de la composición en ácidos grasos, esteroides, compuestos que conforman los aromas, pigmentos o fenoles por citar algunos de los compuestos más representativos presentes en los tejidos de la aceituna. La genética, propia de cada variedad, los factores ambientales, y otros factores agronómicos son claves en el desarrollo de los procesos que finalmente sucederán mientras la aceituna alcanza la madurez.

1.2.2.1. Cambio de color

La aceituna cambia su coloración del verde al negro-violáceo durante el proceso de maduración (Figura 1.22). Esto es debido al cambio en la concentración de los diferentes pigmentos, ya que desciende el contenido de clorofilas (Fernández Díez, 1971) y, por el contrario, se incrementan las antocianinas (Vázquez-Roncero *et al.*, 1970). El cambio de color se inicia en el mesocarpio, generalmente desde la zona apical de la aceituna continuando hacia el extremo opuesto (pedúnculo), y extendiéndose en el endocarpio.

Muchos han sido los parámetros propuestos como indicadores de la maduración de la aceituna, pero el cambio de coloración ha sido el más utilizado. En ocasiones, este parámetro ha sido motivo de discusión, ya que hay variedades que no alcanzan la coloración negra-violácea total del fruto debido a que puede haber células de algún

tejido que no llegan a sintetizar antocianinas, como en la variedad Arbequina, o incluso no sintetizan antocianinas en modo alguno como la variedad Leucocarpa Margareta.



Figura 1.22. Evolución de la coloración de la aceituna de la variedad Empeltre a lo largo de su maduración. Fuente: Imagen propia.

1.2.2.2. Biosíntesis de ácidos grasos y de lípidos. Lipogénesis.

La aceituna, durante el periodo de desarrollo y maduración, almacena lípidos en forma de triacilglicérols o grasas de reserva (TAGs), producto de la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga y su esterificación posterior con glicerol. Para describir el proceso de lipogénesis o biosíntesis de lípidos (TAGs) hay que considerar, además de la fuente de carbono, las dos vías de biosíntesis: la síntesis de novo de ácidos grasos y su posterior ensamblaje en lípidos complejos (TAGs).

1.2.2.2.1. Biosíntesis de los ácidos grasos

A diferencia de las semillas oleaginosas, las cuales utilizan únicamente las hojas como fuente de carbono, los frutos también pueden fijar dióxido de carbono por su capacidad fotosintética ya que tienen cloroplastos activos. Así, la aceituna, como fruto que es, utiliza las dos fuentes de carbono de las que dispone: las hojas como fuente principal (Pérez-Arcoiza *et al.*, 2022), desde donde importan los fotoasimilados, y el propio fruto. El olivo es una de las pocas especies capaces de sintetizar en las hojas tanto polioles (manitol) como oligosacáridos (rafinosa y estaquiosa), por lo general vías sintéticas excluyentes (Sánchez y Harwood, 2002). En ambas situaciones, los azúcares son catabolizados en el mesocarpio de la oliva mediante la glucólisis para formar piruvato, que se convierte en acetil-CoA, el precursor necesario para la biosíntesis de ácidos grasos (Sánchez y Harwood, 2002). Esta degradación de los azúcares se aprecia en la correlación inversa que existe entre el contenido de aceite y de azúcares en la oliva a lo largo de su maduración (Wodner *et al.*, 1988).

La biosíntesis de ácidos grasos (Figura 1.23), denominada *de novo*, es un proceso que ocurre en los plastidios de las células, a partir del acetil-CoA. Precisa principalmente de la actividad combinada de dos complejos multienzimáticos: la acetil-CoA carboxilasa (ACCase, EC 6.4.1.2) y la ácido graso sintasa vegetal (FAS II), complejo formado por 6 enzimas monofuncionales (KAS I, EC 2.3.1.41; KAS II, EC 2.3.1.179; KAS III, EC 2.3.1.180; KAR, EC 1.1.1.100; DH, EC 4.2.1.59; ENR, EC 1.3.1.9), además de una proteína transportadora de grupos acilo (ACP) (Sánchez y Harwood, 2002; Aparicio y Harwood, 2013).

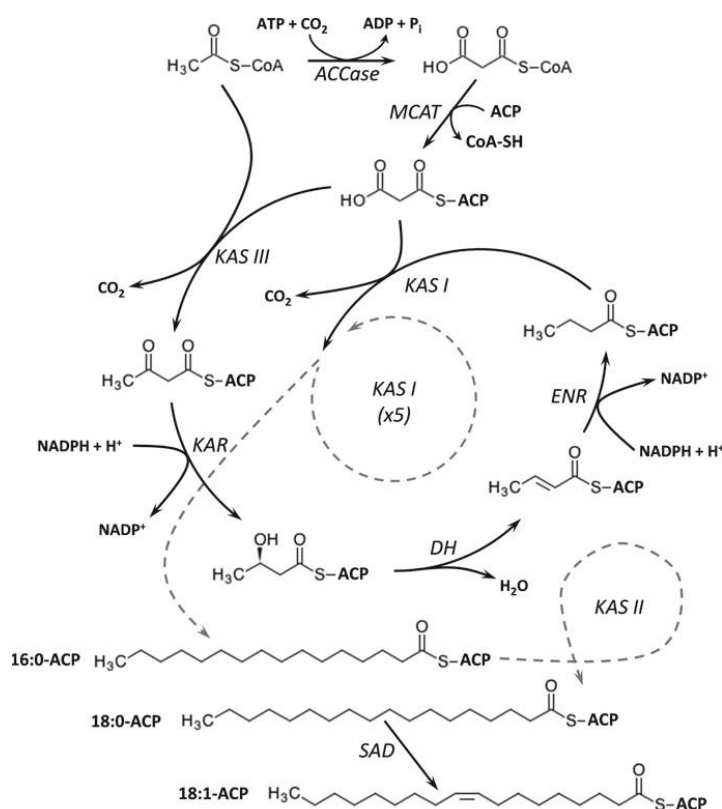
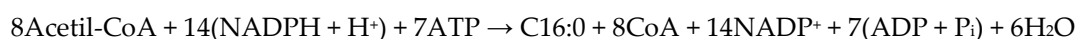


Figura 1.23. Biosíntesis de novo de los ácidos grasos. Fuente: Aparicio y Harwood, 2013.

La biosíntesis de ácidos grasos engloba las sucesivas reacciones de condensación, reducción del grupo carbonilo, deshidratación y reducción del doble enlace, por la intervención de la ácido graso sintasa (actuando KAS III en primer lugar), de dos átomos de carbono que se añaden a una cadena de ácido graso (acilo) en elongación hasta completar la síntesis del ácido palmítico de 16 átomos de carbono (C16:0). El ciclo de reacciones que cataliza la FAS II se repetirá hasta completar la cadena del ácido graso.

El malonil-CoA, obtenido a partir de acetil-CoA tras la actividad de la enzima acetil-CoA carboxilasa, es el donador de todos los carbonos del ácido palmítico excepto de dos, que provienen directamente de una molécula de acetil-CoA. La participación de la última enzima condensadora para la biosíntesis del ácido esteárico (C18:0) a partir del palmítico, KAS II, es especialmente relevante ya que determinará la relación C16/C18 resultante en la composición final de ácidos grasos (Aparicio y Harwood, 2013). Durante el proceso de síntesis, la cadena de ácido graso o acilo en elongación está unida a la ACP. La biosíntesis de novo finaliza con la liberación de los restos acilo de los derivados de ACP por la acción de otras enzimas dentro del plastidio. La reacción global de la biosíntesis de los ácidos grasos es la siguiente:



Ecuación 1.1. Reacción global de la biosíntesis de novo del ácido palmítico. Fuente: Lehninger y Cox, 2009.

Los productos finales de la biosíntesis de novo son los ácidos grasos saturados palmítico (C16:0) y esteárico (C18:0) pero los aceites de oliva tienen altos contenidos de ácidos grasos insaturados como oleico (C18:1n-9), linoleico (C18:2n-6) y α -linolénico (C18:3n-3). Estos ácidos grasos, cuyo contenido relativo caracteriza al aceite de oliva, se sintetizan a través de distintas desaturaciones catalizadas por un tipo de enzimas denominados desaturasas de los ácidos grasos (FADs).

El ácido graso más abundante en el aceite de oliva, el ácido oleico, se forma a partir del esteárico por la acción de una desaturasa muy activa en los plastos, la Δ^9 -desaturasa (SAD, EC 1.14.99.6) (Figura 1.23), lo que explica por qué el oleico es el principal ácido graso sintetizado (Sánchez y Harwood, 2002). Se han descrito 4 genes que codifican la enzima SAD: OeSAD1 (Haralampidis *et al.*, 1998), OeSAD2, OeSAD3 (Parvini *et al.*, 2016) y OeSAD4 (Contreras *et al.*, 2020). Se ha confirmado que OeSAD2 es el gen principal que contribuye a la síntesis de ácido oleico en el mesocarpio del olivo y, por tanto, a su contenido en el aceite de oliva (Parvini *et al.*, 2016; Contreras *et al.*, 2020; Hernández *et al.*, 2020).

Los ácidos grasos insaturados, linoleico y linolénico, se sintetizan en el retículo endoplasmático mediante otras enzimas desaturasas. La acción de dos enzimas oleato desaturasas, FAD2 y FAD6, dan lugar al ácido linoleico a partir del ácido oleico mientras que el linoleico se obtiene a partir del linoleico por la acción de otras dos desaturasas diferentes, las linoleato desaturasas FAD3 y FAD7. Hasta la fecha, se han aislado y caracterizado 6 genes que codifican las oleato desaturasas (OeFAD2-1 a OeFAD2-5 y OeFAD6) (Hernández *et al.*, 2005, 2009, 2011, 2020; Banilas *et al.*, 2005) y cuatro genes para linoleato desaturasa del olivo, (OeFAD3A, OeFAD3B, OeFAD7-1, OeFAD7-2) (Poghosyan *et al.*, 1999; Banilas *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2016). Dos genes, OeFAD2-2 y OeFAD2-5, son los principales responsables de la biosíntesis de ácido linoleico en el mesocarpio del olivo durante el desarrollo del fruto y, por tanto, del contenido de ácido linoleico del aceite de oliva (Hernández *et al.*, 2009, 2020, 2021a; Parvini *et al.*, 2015; Contreras *et al.*, 2020). La variabilidad entre cultivares de la relación C18:1/C18:2 se debe no solo a OeFAD2-2 y OeFAD2-5, sino también a las diferentes especificidades de otro tipo de enzimas, las aciltransferasa extraplastidiales (Hernández *et al.*, 2021a). En el caso de la biosíntesis del ácido linolénico, los datos indican que los genes de OeFAD7 (OeFAD7-1 y OeFAD7-2), y no OeFAD3, serían los principales responsables del contenido de ácido linolénico en el mesocarpio y, por tanto, en el aceite de oliva en las diversas variedades utilizadas en los estudios (Poghosyan *et al.*, 1999; Banilas *et al.*, 2007, Matteuci *et al.*, 2011; Hernández *et al.*, 2016, 2021b).

Se han realizado grandes avances en la identificación y caracterización de los genes que regulan las enzimas implicadas en la biosíntesis de los ácidos grasos. Sin embargo, el conocimiento sobre el control genético que regula los contenidos relativos de estos compuestos, lo cual genera variabilidad entre los cultivares de olivo, sigue siendo limitado.

El resto de ácidos grasos, de cadena larga, que conforman la composición del aceite de oliva, ácidos araquídico (C20:0), behénico (C22:0) y lignocérico (C24:0), se sintetizan en el retículo endoplasmático mediante la adición secuencial de unidades de

dos carbonos catalizada por complejos multienzimáticos de elongasas de ácidos grasos (FAEs, Fatty Acid Elongase) (Cassagne *et al.* 1994).

1.2.2.2.2. Biosíntesis de triglicéridos

Los ácidos grasos sintetizados en los plastidios (acil-CoAs), y no incorporados en los fosfolípidos que conforman las membranas celulares, son utilizados junto con el glicerol-3-fosfato para la formación de lípidos complejos de almacenamiento, los triacilglicéridos o triglicéridos (TAGs). Estos lípidos neutros están formados por tres grupos acilo de ácidos grasos esterificados a una molécula de glicerol en las posiciones *sn*-1, *sn*-2 y *sn*-3. Su síntesis implica principalmente la incorporación secuencial de cada acil-CoA en el esqueleto del glicerol, lo que se conoce como la ruta de Kennedy. Cada incorporación está catalizada por una de las tres aciltransferasas específicas de cada acil-CoA: GPAT (EC 2.3.1.15) cataliza la acilación de la posición *sn*-1, LPAAT (EC 2.3.1.51) la posición *sn*-2 y DGAT (EC 2.3.1.20) la posición *sn*-3, el paso más crítico (Harwood, 1996). Se han descrito otras vías alternativas para el último paso de la biosíntesis de TAG a partir de DAG catalizada por otro enzima (PDAT) (Stobart *et al.*, 1997; Dahlqvist *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2009), aunque la ruta de Kennedy es la considerada como la vía central de la biosíntesis de TAGs. La especificidad y actividad de cada enzima junto con las reservas disponibles de cada acil-CoA dicta las especies moleculares de los TAGs sintetizados y por tanto la calidad del aceite (Sánchez y Harwood, 2002). En olivo, se han identificado y caracterizado varios genes DGAT, OeDGAT1-1, OeDGAT1-2, OeDGAT1-3 y OeDGAT2, los cuales muestran patrones de expresión distintos durante el crecimiento del mesocarpio del olivo (Banilas *et al.*, 2011; Unver *et al.*, 2017), y tres genes PDAT (OePDAT1-1, OePDAT1-2 y OePDAT2) que también contribuyen a la síntesis de aceite en el fruto del olivo (Hernández *et al.*, 2021a). Investigaciones recientes realizadas por Hernández *et al.* (2021b) han proporcionado información relevante para comprender los factores que influyen en el contenido y la acumulación de aceite en las aceitunas. Según estos estudios, se ha observado que la expresión de los genes PDAT en la aceituna desempeña un papel importante en la

respuesta de las aceitunas a diversos estreses abióticos como el régimen hídrico, la temperatura, la luz y las heridas.

1.2.2.2.3. Lipogénesis

La lipogénesis en la aceituna sigue un patrón sigmoidal en el que se diferencian tres etapas (Frías *et al.*, 1991). En una primera fase, desde la formación del fruto hasta la lignificación del endocarpio o endurecimiento del hueso, tiene lugar una biosíntesis lipídica lenta en la que no hay acumulación de lípidos. Es decir, no se produce la síntesis de triglicéridos sino una síntesis de lípidos estructurales del fruto, los fosfolípidos. Tras la lignificación del hueso, aproximadamente dos meses después de la plena floración (10-12 WAF), se sintetizan los lípidos de reserva: los diglicéridos (DAG) y triglicéridos (TAG), lo que hace aumentar rápidamente el contenido en aceite y su almacenamiento en las células parenquimáticas del mesocarpio, donde no existen cuerpos oleosos (oleosomas) apropiados como en las semillas (Figura 1.24). Los TAGs tienden a unirse para formar gotas de aceite hasta un tamaño de aproximadamente 30 μm , probablemente por la ausencia de oleosinas, proteínas estabilizantes de los cuerpos grasos.

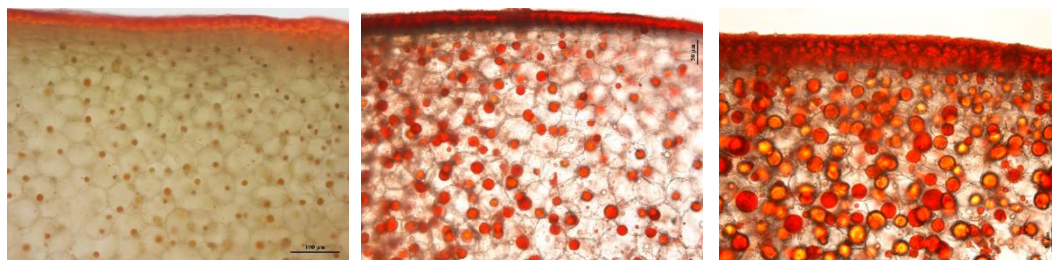


Figura 1.24. Acumulación de aceite en las células del mesocarpio, variedad Barnea (izquierda, junio; centro, julio; derecha, septiembre) cultivada en Israel. Imágenes obtenidas por microscopía. Fuente: Nissim *et al.*, 2020.

El momento máximo de acumulación de aceite ocurre durante el viraje de color del epicarpio de verde a verde-amarillento (19-22 WAF) (García y Mancha, 1992). En la última etapa de la lipogénesis, cuando el fruto ha alcanzado la maduración (28 WAF), prácticamente todo el aceite se ha formado, por lo que ocurre una ralentización en la síntesis lipídica hasta su finalización.

Aunque el patrón de acumulación varía según el cultivar, el estado hídrico del árbol y el clima, el periodo de máxima acumulación es similar entre variedades. Mientras tiene lugar la lipogénesis, se ralentiza la expansión celular del mesocarpio por lo que se frena el crecimiento del fruto (Lavee, 1977; Rallo y Rapoport, 2001)

Estudios más actuales han simplificado el patrón sigmoideo de acumulación de aceite a un modelo bilineal: una primera etapa donde el aceite aumenta hasta alcanzar su máximo mediante una tasa constante, y una segunda etapa donde el contenido de aceite permanece constante (Trentacoste *et al.*, 2010). Este modelo bilineal permite determinar tres parámetros críticos en la acumulación de aceite y de gran interés para el agricultor: tasa de acumulación de aceite, contenido máximo de aceite de oliva y fecha en la que se alcanza el máximo contenido de aceite.

1.2.2.3. Rendimiento graso

La biosíntesis de triglicéridos en las células del mesocarpio es la que determina el rendimiento graso de la aceituna.

El agua y el aceite son los componentes mayoritarios tanto del mesocarpio como de la semilla en la aceituna en el momento habitual de la cosecha. Aunque los porcentajes son muy variables en función de la variedad, condiciones ambientales, prácticas agronómicas, etc., el contenido de agua puede alcanzar el 50-60% en la pulpa mientras que el aceite lograría un 10-35% (Vossen, 2005). Entre ambos componentes existe una relación inversa (Beltrán *et al.*, 2008): el contenido de aceite aumenta mientras que, previsiblemente, el contenido de agua disminuye según madura la aceituna. Debido a que las variaciones climáticas, como la pluviometría y las heladas, influyen en el contenido de agua del fruto y, por tanto, repercuten en la expresión del contenido graso del fruto, es preferible referir el contenido graso al contenido en aceite sobre peso seco eliminando la interferencia que supone el agua. El contenido en aceite sobre peso seco permanece constante una vez que ha finalizado la lipogénesis ya que, sobre el periodo otoñal en el que ocurre, el fruto se deshidrata y pierde humedad.

1.2.2.4. Biosíntesis de esteroides

Los esteroides vegetales (4-desmetilesteroides), también conocidos como fitoesteroides, forman parte de una extensa familia de compuestos llamados terpenos, más concretamente triterpenos. Aunque en su forma libre pueden formar parte de la estructura de las membranas celulares, las formas esterificadas con ácidos grasos, generalmente asociados con los triacilglicéridos, tienen funciones de almacenamiento y transporte. Estos compuestos tienen una estructura similar al colesterol, principal esteroide en células animales, aunque incluyen un grupo metilo o etilo en C-24 en su estructura que los diferencia (Figura 1.25).

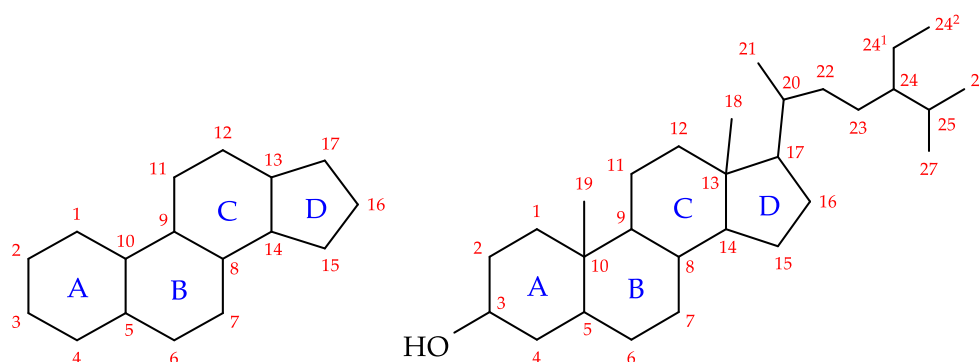


Figura 1.25. Estructura química del anillo tetracíclico, ciclopenta[a]fenantreno (izquierda) y estructura química básica del esteroide (derecha). Numeración recomendada según IUPAC. Fuente: Moss, 1989.

En los últimos años, se han descrito muchos estudios sobre la ruta de biosíntesis de esteroides vegetales en plantas superiores, aunque el conocimiento sobre la regulación de la expresión genética de los enzimas que intervienen en la biosíntesis de los principales esteroides y su acumulación todavía no se ha dilucidado. Los modelos de plantas como el olivo no han sido el objetivo principal de estos estudios a diferencia de otros modelos de plantas como el tomate, la *Arabidopsis* o el tabaco (Du *et al.*, 2022).

La biosíntesis de todos los terpenoides, o ruta biosintética del isoprenoide, catalizada por una gran diversidad de enzimas, comienza con la síntesis en un primer paso de mevalonato a partir de acetil-CoA, seguida por la polimerización de pirofosfato de isopentenilo (IPP) que culmina en la síntesis del escualeno, y finaliza con la ruta post-escualeno (McCaskill y Croteau, 1998; Piironen *et al.*, 2000; Schaller, 2004). En esta

última ruta, los esteroides vegetales se sintetizan a partir de un alcohol triterpénico denominado cicloartenol, un 4,4'-dimetilesterol. En esta ruta, el cicloartenol se transforma en otros 4,4'-dimetilesteroides, los que se convierten a su vez en 4-metilesteroides, y estos últimos se desmetilan para producir esteroides (4-dimetilesteroides) como producto final. Los 4-desmetilesteroides se sintetizan en este último paso en proporciones genéticamente determinadas y en el siguiente orden: Δ^7 -esteroides, $\Delta^{5,7}$ -esteroides y Δ^5 -esteroides (Schaller, 2004).

La actividad catalítica de dos enzimas diferentes sobre el gramisterol bifurca la ruta biosintética que, tras sucesivas reacciones, conducen a la síntesis diferenciada de los 24-metilesteroides (campesterol) y 24-etilesteroides (Δ^5 -avenasterol, β -sitosterol y estigmasterol) principales en la aceituna. Una de estas dos enzimas, la esteroil C24-metiltransferasa (SMT1, EC 2.1.1.41) ejerce un papel regulador importante en la biosíntesis de esteroides, ya que determina la proporción de 24-metil- y 24-etilesteroides, lo que afecta a varios procesos de desarrollo en las plantas (Bouvier-Nave *et al.*, 1997; Schaeffer *et al.*, 2001). Otra enzima importante en la síntesis de esteroides es la esteroil C22-desaturasa (EC 1.14.19.41) la cual ha sido ampliamente caracterizada, aunque no en olivo, por catalizar la síntesis de estigmasterol a partir de β -sitosterol. La sobreexpresión de la enzima resultó en un aumento importante en los contenidos de estigmasterol (Morikawa *et al.*, 2006, 2009; Arnqvist *et al.*, 2008; Gutiérrez-García *et al.*, 2021).

1.2.2.5. Biosíntesis de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son un grupo muy diverso de metabolitos vegetales secundarios que presentan en su estructura un anillo aromático sustituido por uno o varios grupos hidroxilo. Se encuentran en todos los tejidos de las plantas, aunque su naturaleza y concentración difiere según el tejido (Ryan *et al.*, 2002). Las rutas metabólicas en la que estos compuestos participan, al igual que los esteroides, presentan una gran complejidad debido a que pueden presentar distintos destinos metabólicos alternativos además de acumular a su vez productos intermedios. Factores externos como la modulación de las actividades de las enzimas que participan de las rutas o la

posible degradación de ciertos fenoles pueden influir en la composición fenólica de la aceituna y dificultan aún más si cabe el estudio de su biosíntesis.

La vía metabólica para la biosíntesis de la mayor parte de los compuestos fenólicos comienza con la ruta del ácido siquímico, de la que el aminoácido aromático fenilalanina es uno de sus productos finales. Los reactivos iniciadores, fosfoenolpiruvato y eritrosa-4-fosfato, provienen de la metabolización de la glucosa (Ryan *et al.* 2002). La fenilalanina es el precursor de la mayoría de los compuestos fenólicos en plantas superiores. El metabolismo general fenilpropanoide, como se le conoce a la serie de reacciones que se suceden a partir de fenilalanina, da lugar a diversos compuestos fenólicos simples, como cumarinas, flavonoides, lignanos, ácidos benzoicos y derivados hidroxicinámicos (Figura 1.26).

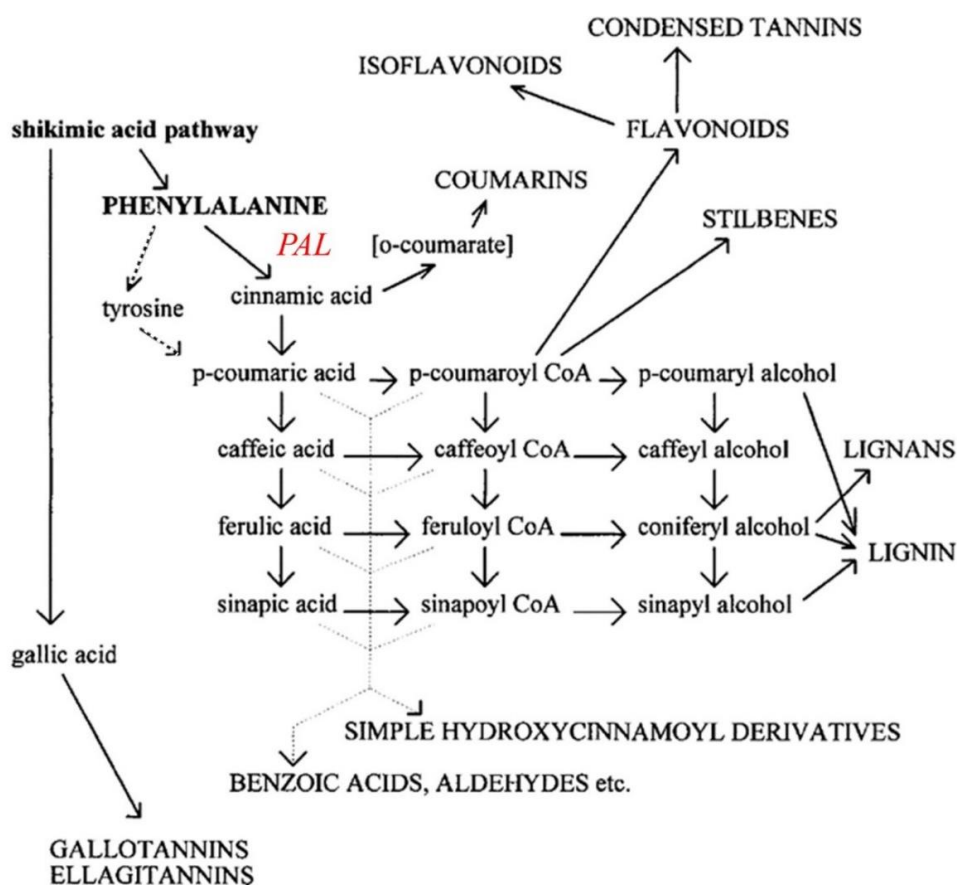


Figura 1.26. Rutas metabólicas de síntesis de compuestos fenólicos derivados de fenilpropanoides (Parr y Bolwell, 2000).

Aunque son diversas las enzimas que intervienen, la fenilalanina amoniaco liasa (PAL, EC 4.3.1.24) se considera la enzima clave en la biosíntesis fenólica al ser la enzima iniciadora que controla el flujo hacia los compuestos fenólicos totales (Parr y Bolwell, 2000). La actividad de PAL es muy sensible a factores abióticos que generan estrés, como la temperatura, las heridas en el fruto y la luz ultravioleta, aunque su actividad también varía mucho en función del estado de maduración de la aceituna (Ryan *et al.* 2002).

Otros compuestos fenólicos muy importantes son los secoiridoides. Estos compuestos están presentes únicamente en las oleáceas, familia de plantas en las que se incluye el olivo. La biosíntesis de estos compuestos es compleja y no ha sido dilucidada completamente (Damtoft *et al.*, 1993; Ryan *et al.*, 2002; Obied *et al.*, 2008). La oleuropeína, principal glucósido en aceitunas y hojas del olivo, pero con apenas presencia en los aceites de oliva vírgenes (Ryan *et al.*, 2002) se produce en las primeras fases de crecimiento del fruto acumulándose en la aceituna verde. Durante la maduración de la aceituna, la concentración de oleuropeína disminuye llegando a niveles mínimos cuando la aceituna alcanza la coloración negra-violácea debido a la síntesis de antocianinas. Se ha relacionado la degradación de la oleuropeína y la producción de antocianinas en las olivas maduras debido al hallazgo del ácido elenólico, uno de los productos finales de la degradación de la oleuropeína, sumado a la creciente demanda de azúcares libres en la biosíntesis de las antocianinas (Amiot *et al.*, 1989; Ryan *et al.*, 1999, 2002). Numerosos derivados de los secoiridoides principales oleuropeína y ligustrósido se han hallado en diferentes estados de maduración de la aceituna y, especialmente, durante la extracción del aceite de oliva, debido a la actividad enzimática de esterasas y β -glucosidasas. (Obied *et al.*, 2008). Concretamente, la enzima β -glucosidasa fue hallada en compartimentos diferentes a la oleuropeína, dentro de las células del mesocarpio de la aceituna (Mazzuca *et al.*, 2006). Es el daño de las estructuras de las células (incluyendo la molienda y batido durante el proceso de obtención del aceite) lo que permite el contacto entre la enzima y el secoiridoide, produciéndose la degradación del compuesto fenólico.

1.3. EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

Según la actual norma comercial del Consejo Oleícola Internacional (COI) que se aplica a los aceites de oliva (COI, 2022a), «los aceites de oliva vírgenes son aquellos que se obtienen del fruto del olivo (*Olea europaea* L.) únicamente por medios mecánicos u otros procedimientos físicos, en condiciones, sobre todo térmicas, que no impliquen la alteración del aceite, y que no hayan sufrido tratamiento alguno distinto del lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado». Dado que no es necesario un tratamiento agresivo y químico para su obtención, en contraste con otros aceites vegetales, los aceites de oliva virgen preservan la integridad de sus componentes menores como los antioxidantes (biofenoles), vitaminas liposolubles (tocoferoles), así como los compuestos volátiles que le confieren su característico aroma.

El aceite de oliva virgen es el zumo del fruto del olivo, la aceituna. Como tal debe de ser considerado durante todo el proceso de obtención, desde la recolección de la aceituna hasta la conservación del aceite de oliva virgen, para asegurar sus características fisicoquímicas y organolépticas hasta su consumo.

1.3.1. Obtención del aceite de oliva virgen

Hoy en día, la producción de aceite de oliva virgen en España, en su mayor parte, utiliza sistemas de extracción en continuo (Figura 1.27). Estos sistemas, a diferencia de los tradicionales, prescinden de la preparación manual de capachos utilizados en el prensado y emplean la centrifugación en lugar del prensado para separar el aceite. Aunque el proceso se encuentra altamente optimizado, automatizado y se han implementado controles en continuo, lo que reduce los costes y permite la obtención de aceites de elevada calidad con un sistema completamente trazable, la investigación y la mejora de la producción continúan (Beltrán, *et al.*, 2021; Leone, *et al.*, 2022; Martínez-Beamonte, *et al.*, 2022; Taticchi, *et al.*, 2022; Vallone, *et al.*, 2022).



Figura 1.27. Sistema continuo de Pieralisi. Molino (1), elevador de pasta (2), batidora de dos cuerpos (3), decanter (4) y centrifuga vertical o decanter (5). Fuente: Pieralisi.

En general, y sin entrar en grandes detalles, la producción de aceite de oliva virgen se divide, principalmente, en tres procesos: la molienda, el batido y la separación de fases o centrifugación. El proceso realmente es mucho más complejo (Figura 1.28) y conlleva mayor número de etapas, todas ellas claves para la obtención de diversos tipos de aceites de oliva virgen en cuanto a su calidad y composición química (Di Giovacchino *et al.*, 2002b).

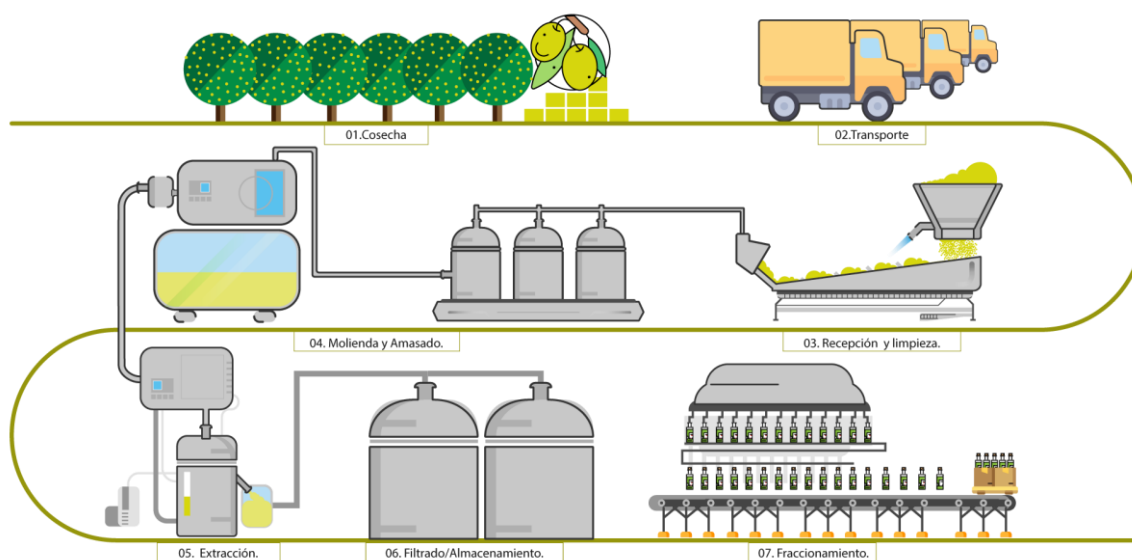


Figura 1.28. Etapas en la producción de aceite de oliva virgen. Fuente: <https://agroaceitunera.com.ar/agroa/aceites.php>

Las malas prácticas, que pueden afectar tanto a la aceituna durante las operaciones previas a la molienda (ej. la aparición de hongos u otros microorganismos y procesos fermentativos) como al aceite durante las etapas posteriores a su centrifugación (ej. oxidación), perjudican la calidad de los aceites de oliva virgen (Uceda *et al.*, 2006; Rallo *et al.*, 2018; Mousavi *et al.*, 2021).

1.3.1.1. Molienda

La molienda es un proceso mecánico fundamental en la producción de aceite de oliva, ya que permite la liberación de las gotas de aceite, situadas principalmente dentro de las vacuolas del mesocarpio de la aceituna, al destruir los tejidos vegetales. Además, durante esta fase se inician importantes reacciones químicas y enzimáticas, que continúan después durante el batido, cuyo resultado incide sobre la calidad del aceite.

Con este fin, pueden utilizarse distintos tipos de molinos o trituradores que suelen ser metálicos, de acero inoxidable, aunque aún se emplean molinos de piedra en algunas almazaras para una molienda menos agresiva. Los molinos más habituales son los de martillos metálicos (Figura 1.29), combinados con un tamiz o criba con un diámetro de paso determinado que fija el tamaño final de las partículas de la pasta que pasarán mediante una bomba a la batidora. Las cribas de diámetro de paso menor se utilizan a principio de la campaña, para la aceituna más verde y con mayor humedad (>50%), debido a la mayor dificultad para extraer el aceite por formación de emulsiones. Las pastas que se forman en estos casos se denominan «pastas difíciles». Conforme avance la campaña, la molienda deberá realizarse menos fina (Beltrán *et al.*, 2010). La velocidad de giro de los martillos y el diámetro de paso de la criba tienen efectos sobre la calidad final del aceite a causa del aumento de la temperatura de la pasta y de la formación de emulsiones (Caponio *et al.*, 2003; Beltrán *et al.*, 2010; Inarejos-García *et al.*, 2011; Di Giovacchino, 2013).

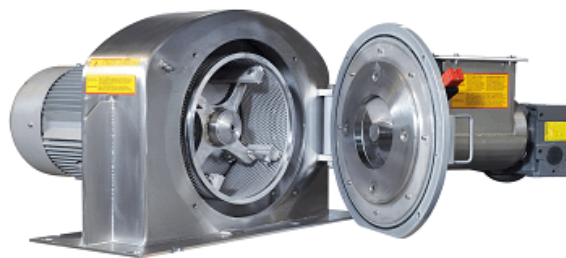


Figura 1.29. Molino de martillos. Fuente: <https://www.alfalaval.es/>

1.3.1.2. Batido

Durante el batido o malaxado, las gotas de aceite formadas en la molienda y dispersas en la pasta de la aceituna molida se unen formando una fase oleosa lo que facilita después la separación sólido-líquido. Es por ello por lo que esta etapa es clave en cuanto al rendimiento industrial de una almazara, aunque sin olvidar la calidad (Polari *et al.*, 2018). Como ejemplo, los compuestos volátiles que diferencian a los aceites de oliva se producen principalmente por oxidación de los ácidos grasos durante el batido. La ruta de la lipoxigenasa (LOX), gracias a la liberación de enzimas tras la rotura de los tejidos vegetales (Kalua *et al.*, 2007), es otra vía de formación de volátiles durante el batido. El contenido y la tipología de compuestos fenólicos del aceite de oliva también resulta afectado debido al incremento de la actividad de enzimas como β -glucosidasas, esterasas, oxidasas y fenoloxidasas (Miho *et al.*, 2020).

El tiempo de batido puede depender de las emulsiones que se hubieran formado en la pasta tras la molienda, especialmente si la molienda ha sido violenta. Estas emulsiones, debidas en parte a las lipoproteínas que rodean las gotas de aceite que impiden su coalescencia (Di Giovacchino, 2013), conducen a una baja extractabilidad debido a que parte del aceite se pierde con los residuos. La adición de talco natural (silicato magnésico hidratado) o arcilla caolinítica, únicos coadyuvantes tecnológicos permitidos (BOE, 2015), facilitan la extracción en pastas demasiado húmedas (aceitunas muy verdes, lluvias recientes, exceso de riego, etc.). El aumento de la temperatura también sirve de ayuda a la extracción, disminuyendo la viscosidad de la fase oleosa, por lo que el batido de la pasta suele ser termorregulado (25-30 °C) para facilitar la

coalescencia. Así, las batidoras (Figura 1.30) disponen de un sistema de calefacción situado en una doble pared.

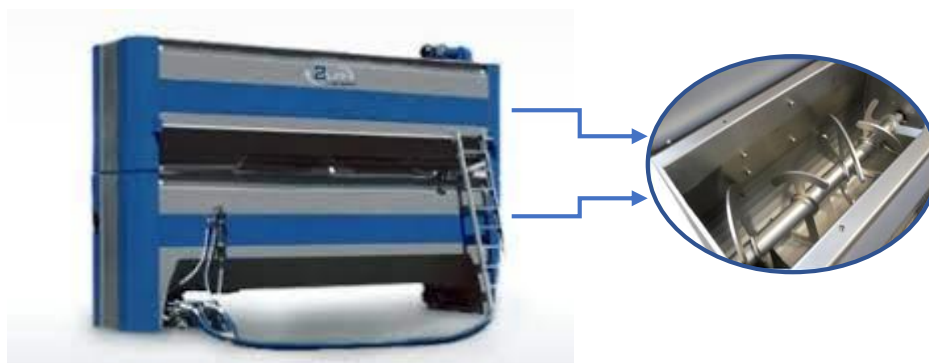


Figura 1.30. Batidora horizontal de dos cuerpos, con detalle ampliado de las paletas, para extracción de aceite de oliva. Fuente: Pieralisi.

En general, la mezcla de la pasta de aceituna se realiza entre 30 y 60 minutos, y la temperatura oscila entre 25 °C y 32 °C. (Di Giovacchino *et al.*, 2002a; Inarejos-García *et al.*, 2009). Tiempos excesivamente largos de batido y temperaturas elevadas incrementan el rendimiento en la extracción de aceite de oliva, pero pueden afectar a la composición de compuestos volátiles, aunque de distinta manera dependiendo del cultivar, lo que influiría en la calidad organoléptica del aceite de oliva (Kalua *et al.*, 2007; Lukić *et al.*, 2017). Aceites más amargos y astringentes, por aumento del contenido de fenoles se dan en aceites obtenidos con temperaturas superiores a 30 °C (Inarejos-García *et al.*, 2009; Lukić *et al.*, 2017) mientras que la concentración de estos compuestos se reduce al utilizar tiempos de batido largos (Civantos, 1999; Di Giovacchino *et al.*, 2002a; Inarejos-García *et al.*, 2009). Investigaciones realizadas en compuestos fenólicos individuales, no sobre el contenido total de éstos, hallaron que el aumento del tiempo de batido no afecta por igual a los diferentes compuestos fenólicos (Lukić *et al.*, 2017; Miho *et al.*, 2020).

1.3.1.3. Centrifugación

Los sistemas de extracción en continuo utilizan la centrifugación para la separación sólido-líquido, es decir, para separar el aceite de la pasta de la aceituna. La centrífuga horizontal o «decanter» utiliza la fuerza centrífuga generada por un rotor que gira a determinadas revoluciones por minuto y separa las distintas fases que contiene la

pasta de la aceituna gracias a la diferente densidad de cada una de ellas. En España, el sistema de extracción en continuo mayoritariamente es de dos fases, es decir, el decanter sólo dispone de dos salidas: una de ellas para la salida de la mezcla de orujo y alpechín (alpeorujo) y la otra, para la salida del aceite (Figura 1.31). Otro tipo de decanter son los de 3 fases, en los que hay tres salidas para separar el aceite de los sólidos u orujo y del alpechín líquido. Con esta tecnología, en desuso en España, se obtienen orujos con menor grado de humedad, pero a su vez mayor volumen de alpechín lo cual menos es sostenible desde el punto de vista medioambiental.

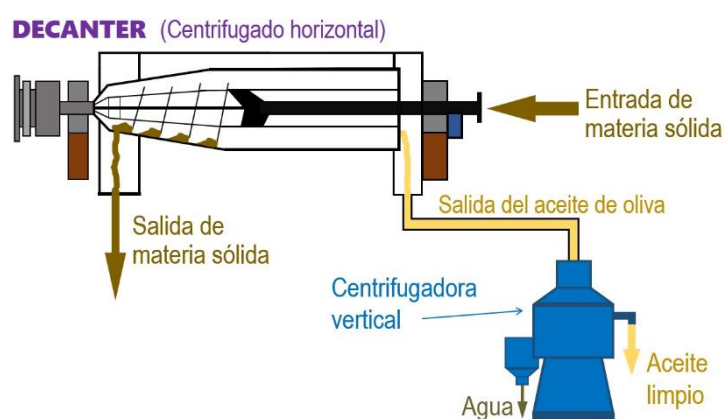


Figura 1.31. Esquema del proceso de centrifugación (horizontal y vertical) del aceite de oliva en una almazara.

Una cierta cantidad de agua, mucho menor que en los sistemas de tres fases, se adiciona al decanter para mejorar la eficacia de la extracción de aceite, especialmente cuando la humedad de las aceitunas es baja. Aunque, se puede adicionar agua tanto en el molino como en la termobatidora, la adición en el decanter es más común. Debido al carácter hidrofílico de los compuestos fenólicos, la adición de agua en el proceso de extracción del aceite de oliva podría reducir su contenido (Jiménez *et al.*, 1995) aunque, en resultados obtenidos en laboratorio, se ha observado que estos compuestos polares se eliminan junto con el agua cuando se aplica la fuerza centrífuga sin necesidad de adición de agua externa (Gila *et al.*, 2022).

La clarificación del aceite, o eliminación del agua y de las impurezas sólidas residuales en suspensión del aceite, antes de su almacenamiento suelen realizarse

mediante centrifugación vertical, aunque aún quedan almazaras que utilizan la decantación natural. Una vez filtrados, los aceites se almacenan en recipientes adecuados, como tanques de acero inoxidable, para protegerlos de la luz, el calor y el aire, preservando así su calidad y propiedades organolépticas.

1.3.2. Composición química del aceite de oliva virgen

El aceite de oliva virgen (AOV) está constituido por una fracción mayoritaria compuesta principalmente por triglicéridos (TAGs), aproximadamente un 99% (Boskou *et al.*, 2015a), y una fracción minoritaria. Ciertos componentes de la fracción minoritaria, como los compuestos fenólicos, los pigmentos o los compuestos volátiles, son muy importantes ya que diferencian los aceites de oliva virgen del resto de aceites vegetales que deben de refinarse, ya que estos compuestos se pierden durante los procesos de refinado.

1.3.2.1. Fracción mayoritaria

Esta fracción del aceite de oliva virgen ha sido tradicionalmente conocida como fracción saponificable, denominada así ya que forma jabones cuando se trata con un hidróxido alcalino. Agrupa principalmente triglicéridos (TAGs).

1.3.2.1.1. Triglicéridos

Los triglicéridos (TAGs) se forman a partir de la esterificación de cada grupo hidroxilo del glicerol por ácidos grasos, según la especificidad enzimática, durante la lipogénesis que tiene lugar a lo largo del desarrollo de la aceituna. Las rutas de biosíntesis de triglicéridos en la aceituna (ver sección 1.2.2.2.2) permiten la formación únicamente de ciertos tipos de TAGs.

Se han identificado y cuantificado veinte tipos diferentes de triglicéridos, aunque solo cinco de ellos están presentes en proporciones significativas: oleico-oleico-oleico (OOO), que representa aproximadamente la mitad de la porción total de TAG que se encuentra en el AOVE, palmítico-oleico-oleico (POO), oleico-oleico-linoleico (OOL), palmítico-oleico-linoleico (POL) y esteárico-oleico-oleico (SOO) (León-Camacho *et al.*,

2013; Boskou *et al.*, 2015a). El análisis de la composición de TAGs en los AOV es una de las herramientas para la identificación de adulteraciones con otros tipos de aceites o grasas (León-Camacho *et al.*, 2013; Gómez-Coca *et al.*, 2020; Conte, 2020a).

1.3.2.1.2. Ácidos grasos

En los aceites de oliva virgen, los ácidos grasos no se encuentran generalmente en sus formas libres, sino que, en su mayor parte, forman ésteres con otros compuestos, principalmente triglicéridos, en los que los ácidos grasos son el 94-96% del peso total de los TAGs.

La composición en ácidos grasos de los aceites de oliva, al igual que la mayoría de los aceites vegetales, está constituida por ácidos grasos que tienen entre 14 y 24 átomos de carbono. La característica que diferencia al aceite de oliva del resto de aceites es la composición relativa entre los ácidos grasos, fundamentalmente por el alto contenido en ácido oleico (C18:1) (55,00-85,00%), principal ácido graso monoinsaturado. Otros ácidos grasos importantes en el aceite de oliva son: palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2) y linolénico (C18:3) (Tabla 1.6).

Tabla 1.6. Límites de composición (%) de ácidos grasos de las distintas categorías de aceites de oliva virgen.

Nombre común (símbolo)	Contenido relativo (%)
Mirístico (C14:0)	≤ 0,03
Palmítico (C16:0)	7,00–20,00
Palmitoleico (C16:1)	0,30–3,50
Heptadecanoico (C17:0)	≤ 0,40
Heptadecenoico (C17:1)	≤ 0,60
Esteárico (C18:0)	0,50–5,00
Oleico (C18:1)	55,00–85,00
Linoleico (C18:2)	2,50–21,00
Linolénico (C18:3)	≤ 1,00
Araquídico (C20:0)	≤ 0,60
Eicosenoico (C20:1)	≤ 0,50
Behénico (C22:0)	≤ 0,20
Lignocérico (C24:0)	≤ 0,20

Fuente: UE, 2022a; COI, 2022a.

La variabilidad que se aprecia en la composición relativa de los ácidos grasos puede ser debida a la zona de producción, la latitud, el clima, la variedad y el grado de madurez del fruto (Beltrán *et al.*, 2004a; Ripa *et al.*, 2008; Inglese *et al.*, 2011). De hecho, la influencia del origen geográfico, entendido como un conjunto de factores (cultivar, zona de producción, prácticas culturales agronómicas), sobre el perfil de los ácidos grasos ha permitido utilizarlos como uno de los parámetros discriminadores entre AOV de distintas zonas productoras (Noorali *et al.*, 2014; Borges *et al.*, 2017). Con este criterio, la composición relativa de los ácidos grasos principales se ha introducido en pliegos de condiciones de algunas DOP (MAPA, 2023b). El conocimiento de la composición en ácidos grasos, tanto cualitativamente como cuantitativamente, de los aceites de oliva también es uno de los puntos clave en la identificación de posibles adulteraciones (Conte *et al.*, 2020b; UE, 2022a; COI, 2022a; Codex Alimentarius, 2021).

1.3.2.2. Fracción minoritaria

La fracción minoritaria representa únicamente un 1-2% del peso del aceite de oliva virgen, pero está constituida por una amplia variedad de compuestos de distinta naturaleza y estructura química, lo que confiere al AOV sus propiedades diferenciadoras organolépticas y biológicas, entre otras. Muchos de estos compuestos no producen jabones en presencia de hidróxidos alcalinos, en cambio son solubles en disolventes como hexano o éter después de la saponificación. Por ello, a esta fracción tradicionalmente se le ha denominado fracción insaponificable.

Debido a la singularidad de ciertos compuestos minoritarios, éstos son utilizados como «huella dactilar» para demostrar la autenticidad de los AOV, así como para la identificación de la variedad y del origen geográfico del aceite (Noorali *et al.*, 2014; Conte *et al.*, 2020b). Este es el caso de los esteroides. Otros componentes, como los compuestos fenólicos, juegan un papel fundamental en la estabilidad frente a la oxidación de los AOV.

Dentro de esta fracción pueden establecerse dos grupos (Boskou *et al.*, 2015a): aquellos compuestos derivados de los ácidos grasos, como mono- y diglicéridos, ácidos

grasos libres, fosfolípidos, ceras y ésteres de esteroides, y otros compuestos no relacionados químicamente con ellos, como hidrocarburos, compuestos terpénicos, esteroides, compuestos fenólicos, alcoholes alifáticos, y pigmentos (Tabla 1.7).

Tabla 1.7. Algunos de los componentes minoritarios en el AOV.

Compuesto	Concentración (mg/kg)
Hidrocarburos	1.500–8.000
Terpenos	1.000–3.000
Esteroides	800–2.600
Fenoles	20–1.000
Alcoholes alifáticos	100–200
Tocoferoles	50–300
Clorofilas	0,2–5
Feofitinas	0,2–20

Fuente: Surra *et al.*, 2015.

1.3.2.2.1. Ceras

La esterificación de los ácidos grasos con alcoholes grasos de estructura lineal da lugar a la formación de ceras (León-Camacho *et al.*, 2013), compuestos ubicados en la piel de la aceituna y claves en la identificación de fraudes en el aceite de oliva (Conte *et al.*, 2020b; UE, 2022a; COI, 2022a; Codex Alimentarius, 2021). Las principales ceras halladas en el aceite de oliva son ésteres del ácido oleico o palmítico, con número de carbonos entre 36 y 46. Las ceras contempladas como criterio legislativo para los AOV son las ceras de 42 a 46 átomos de carbono (UE, 2022a; COI, 2022a).

El contenido en ceras (≤ 150 mg/kg en AOV) puede oscilar según la variedad, el año de cosecha, el proceso tecnológico utilizado o incluso las condiciones de almacenamiento (Ranalli y Angerosa, 1996). Por ello, este criterio debe combinarse con otros como el contenido en dialcoholes triterpénicos (eritrodiol y uvaol) o la concentración de alcoholes alifáticos.

1.3.2.2.2. Mono- y diglicéridos

Los mono- y diglicéridos (1,2- y 1,3-isómeros) se encuentran en el aceite de oliva en cantidades muy pequeñas (diglicéridos, entre 1,0 y 2,8%; monoglicéridos, menos del 0,25%). El contenido de 1,2-diglicéridos es atribuido a la biosíntesis incompleta de los

triglicéridos. Mientras, los 1,3-diglicéridos proceden de la degradación de los TAGs, por una hidrólisis enzimática o química, que podría ocurrir antes o durante el proceso de extracción del aceite (León-Camacho *et al.*, 2013; Boskou *et al.*, 2015a).

1.3.2.2.3. *Hidrocarburos*

Los hidrocarburos son una extensa familia de compuestos que pueden estar presentes en mayor o menor medida según las categorías de los aceites de oliva y de orujo de oliva. En los aceites de oliva virgen, el hidrocarburo más importante es el escualeno, precursor de la biosíntesis de los esteroides. El aceite de oliva virgen es una de las principales fuentes de obtención de este hidrocarburo (Fernández-Cuesta *et al.*, 2013; Boskou *et al.*, 2015a) cuyas acciones biológicas están siendo objeto de numerosos estudios por su importancia (Lou-Bonafonte *et al.*, 2018).

1.3.2.2.4. *Esteroides (4-desmetilesteroides)*

Los esteroides son una familia de más de 250 compuestos con una estructura básica común compuesta por un anillo tetracíclico, el ciclopenta[a]fenantreno, un grupo hidroxilo en la posición C-3 (anillo A) y una larga cadena lateral flexible en C-17 del anillo D (Figura 1.25) (Piironen *et al.*, 2000).

Por razones estructurales y biosintéticas, según el número de grupos metilo ($-\text{CH}_3$) que figuren en la posición C-4, estos compuestos se clasifican en: 4,4-dimetilesteroides (dos grupos metilo), 4 α -metilesteroides (un grupo metilo) o 4-desmetilesteroides (ningún grupo metilo). Las dos primeras familias, 4 α -metilesteroides y 4,4'-dimetilesteroides (o alcoholes triterpénicos), son los precursores de los esteroides, término común con el que se conoce a los 4-desmetilesteroides (ver sección 1.2.2.4) (León-Camacho *et al.*, 2013). Este último grupo de esteroides es el de mayor concentración en el aceite de oliva virgen, aunque el resto también tiene su importancia. Los 4-desmetilesteroides se agrupan en el AOV en esteroides Δ^5 - o Δ^7 -, según la posición del doble enlace en el anillo B (Figura 1.32), y, además, en 24-metil- o 24-etilesteroides, según tengan un sustituyente metilo adicional en el C-24 (Figura 1.25) (Piironen *et al.*, 2000).

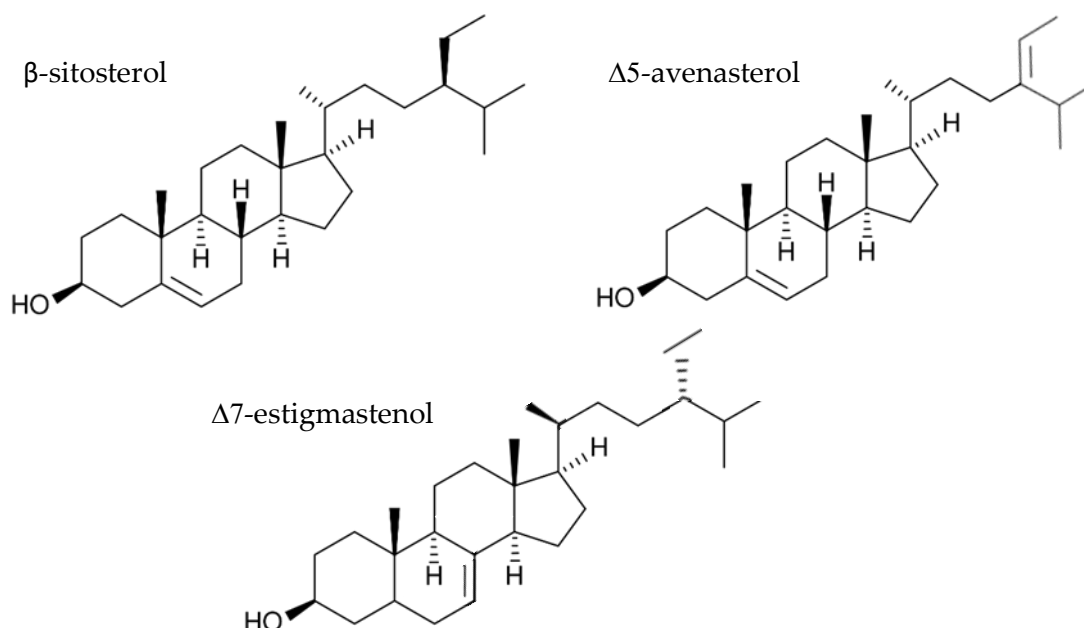


Figura 1.32. Estructura química de algunos de los 24-etilesteroles (Δ^5 - y Δ^7 -) que contiene el aceite de oliva. Fuente: Imagen propia.

Siendo la fracción esterólica similar en todos los aceites vegetales, la proporción de cada uno de ellos varía de una especie vegetal otra. Así, los esteroides predominantes en el aceite de oliva son β -sitosterol (75-90%), Δ^5 -avenasterol (5-36%), campesterol (2-4%) y estigmasterol, en orden decreciente (Boskou *et al.*, 2015a). Otros esteroides identificados, pero en menores concentraciones, son colesterol, 24-metilencolesterol, campesterol, campestanol, Δ^7 -campesterol, $\Delta^{5,23}$ -estigmastadienol, clerosterol, sitostanol, $\Delta^{5,24}$ -estigmastadienol, Δ^7 -estigmasterol y Δ^7 -avenasterol (UE, 2022a; COI, 2022a) (Tabla 1.8). Algunos de ellos, como el $\Delta^{5,23}$ -estigmastadienol, se encuentran a nivel traza en los aceites de oliva virgen pero su concentración aumenta con el refinado del aceite (León-Camacho *et al.*, 2013).

La proporción relativa de cada esteroide en los aceites de oliva es una herramienta fundamental para la detección de adulteraciones con otros aceites vegetales. Pero, la concentración de los 4-desmetilesteroides, al igual que otros compuestos en el aceite de oliva virgen, está influenciada por la variedad, la calidad, el ambiente y factores tecnológicos entre otros (Lukić y Lukić, 2021). A pesar de haber tenido en cuenta esta variabilidad en el establecimiento de los criterios de pureza (UE, 2022a; COI, 2022a), hay

aceites de oliva virgen que podrían categorizarse como aceites genuinos fuera de norma por superar estos límites (Gracia, 2001; Rivera del Álamo *et al.*, 2004; Sevim *et al.*, 2022).

Tabla 1.8. Contenido relativo de esteroides individuales y contenido total de esteroides en las distintas categorías de aceites de oliva virgen.

Esterol	Contenido
Colesterol	≤ 0,5%
Brassicasterol	≤ 0,1%
Campesterol	≤ 4,0%
Estigmasterol	< Campesterol
β-sitosterol aparente*	≤ 93,0%
Δ7-estigmastenol	≤ 0,5%
Total esteroides	≥ 1.000 mg/kg

*Suma de los esteroides individuales: Δ5,24-estigmastadienol, clerosterol, β-sitosterol, sitostanol, Δ5-avenasterol y Δ5,25-estigmastadienol. Fuente: UE (2022a); COI (2022a); Codex Alimentarius (2021).

1.3.2.2.5. Dialcoholes triterpénicos

Entre los compuestos terpenicos del aceite de oliva destacan dos dialcoholes triterpénicos pentacíclicos, el eritrodiol y el uvaol (Figura 1.33), abundantes en el epicarpio o piel de la aceituna. Por ello, se utilizan conjuntamente para la detección de adulteración del aceite de oliva virgen por adición de aceite de orujo evaluando su contenido, en porcentaje, respecto al total de esteroides (UE, 2022a; COI, 2022a). El eritrodiol es el dialcohol más relevante y está principalmente influenciado por la variedad de la aceituna. Se han hallado contenidos de este triterpeno que oscilan entre 6 y 74 mg/kg en aceites monovarietales (Aparicio y Luna, 2002; Allouche *et al.*, 2009).

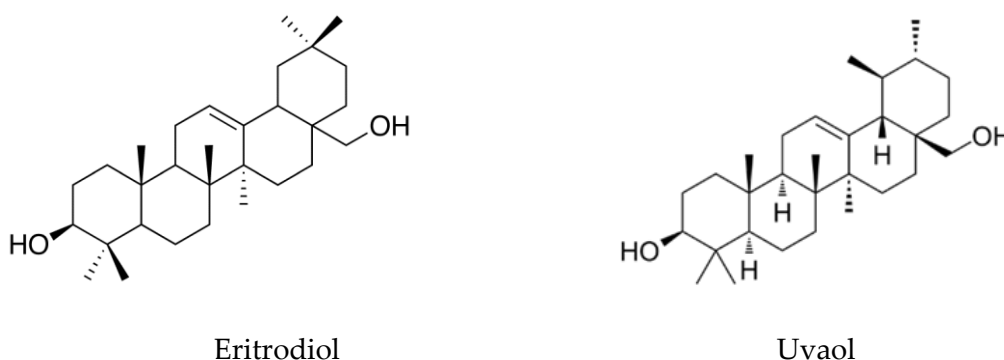


Figura 1.33. Estructura química de eritrodiol y uvaol. Fuente: Imagen propia.

1.3.2.2.6. *Alcoholes alifáticos o alcoholes grasos*

Los alcoholes alifáticos son alcoholes saturados de cadena lineal con longitudes que oscilan entre 18 y 28 números de carbonos. En el aceite de oliva predominan los de número par de carbonos, a diferencia de los aceites de semillas. Estos son: docosanol (C22), tetracosanol (C24), hexacosanol (C26) y octacosanol (C28). Como precursores de otros compuestos presentes en los aceites de oliva, las ceras, podría ocurrir un aumento del contenido de ceras en aceites de oliva debido a un almacenamiento prolongado si, inicialmente, el aceite presentara altos contenidos de alcoholes alifáticos.

1.3.2.2.7. *Compuestos fenólicos*

Químicamente los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen pueden ser definidos como sustancias con un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (-OH). Tradicionalmente se les ha denominado con el término polifenoles, pero no es el más adecuado. Esta terminología probablemente ha sido heredada de los polifenoles del vino, los cuales sí que poseen al menos dos anillos fenólicos en la molécula como es el caso del resveratrol, pero estos compuestos no coinciden con los que conforman el aceite de oliva virgen (Mastralexi *et al.*, 2014a; Tsimidou y Boskou, 2015).

Los compuestos fenólicos están relacionados principalmente con la actividad antioxidante de los aceites vegetales, aportando estabilidad ante la oxidación, pero también es muy importante su actividad biológica. Se encuentran en cantidades totales e individuales muy variables dependiendo de diversos factores como la variedad, el ambiente, las condiciones agronómicas o factores tecnológicos (Servili *et al.*, 2009; Boskou *et al.*, 2015a).

Según su carácter polar, algunos autores los clasifican en fenoles no polares o lipofílicos y en fenoles polares o hidrofílicos.

A) *Fenoles no polares*

Los tocoferoles son los compuestos fenólicos lipofílicos mayoritarios que pueden encontrarse en los aceites vegetales en general. Se han descrito en la naturaleza ocho compuestos pertenecientes a la familia de tocoferoles, sin embargo, más del 90% de la

concentración total de tocoferoles en el AOV contiene α -tocoferol (Figura 1.34) (Servili *et al.*, 2009).

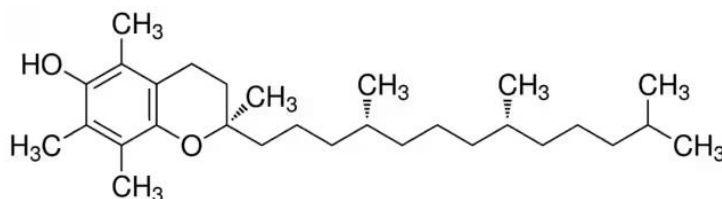


Figura 1.34. Estructura química del α -tocoferol. Fuente: Imagen propia.

B) Fenoles polares

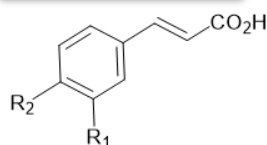
Los fenoles polares del AOV, también denominados biofenoles, constituyen un grupo muy numeroso y diverso de compuestos que están presentes en el mesocarpio de la aceituna. Son metabolitos secundarios y se consideran como parte del sistema químico defensivo del fruto. Tras el proceso de extracción, una pequeña parte de estos compuestos se transfiere al aceite de oliva virgen por un reparto de los componentes entre la fase oleosa y el agua de vegetación (Artajo *et al.*, 2006, 2007; Abenoza *et al.*, 2019). Estos compuestos confieren al AOV las propiedades organolépticas que le caracterizan, concretamente el sabor amargo y las sensaciones cinestésicas de astringencia y picor, además de propiedades saludables (Kiritsakis, 1998; Gutiérrez-Rosales *et al.*, 2003; Mateos *et al.*, 2004; Servili *et al.*, 2014). Su concentración es mínima en otros aceites y grasas al ser sometidos a procesos de refinado (Boskou *et al.*, 2015b). Aunque se han determinado en el AOV amplios rangos en el contenido total de compuestos fenólicos polares (50-1.000 mg/kg), los valores más habituales son 100-300 mg/kg (Boskou *et al.*, 2015b).

Caracterizar esta fracción polar de los aceites de oliva virgen, determinando a su vez la concentración total e individual de cada compuesto, ha presentado considerables desafíos. Existe una gran variabilidad de compuestos fenólicos inherente en el AOV (El Riachi *et al.*, 2011a; Miho *et al.*, 2021). A esto se le suman nuevos compuestos generados por las variadas reacciones químicas y enzimáticas que experimentan los biofenoles durante el proceso de extracción del aceite (Angerosa *et al.*, 2001; El Riachi *et al.*, 2011b; Taticchi *et al.*, 2013) y posteriormente, según el tiempo y condiciones de su

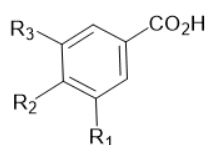
almacenamiento (Brenes *et al.*, 2001; Morelló *et al.*, 2004; Gómez-Alonso *et al.*, 2007; Daskalaki *et al.*, 2009; Abenoza *et al.*, 2015b). Los fenoles en su forma libre o hidrolizados predominan en los aceites almacenados, mientras que los aceites recién elaborados contienen fenoles más complejos de agliconas secoiridoideas (Brenes *et al.*, 2001; Servili *et al.*, 2014). Otro inconveniente añadido ha sido la dificultad en realizar comparativas entre los resultados obtenidos en una amplia gama de estudios llevados a cabo, tanto del contenido de fenoles totales como de fenoles individuales, debido a los numerosos métodos diferentes aplicados para su análisis y para la expresión de resultados.

La gran diversidad estructural de los compuestos fenólicos polares (Figura 1.35) puede agruparse en función de los grupos más importantes que están presentes en el aceite de oliva virgen como (El Riachy *et al.*, 2011):

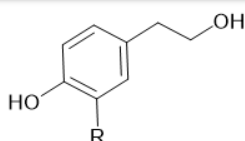
- a) Ácidos fenólicos: derivados del ácido benzoico (ácido vanílico, sirínico, p-hidroxibenzoico y gálico) y derivados del ácido cinámico (ácido cafeico, p-cumárico, o-cumárico y ferúlico).
- b) Fenoles simples: hidroxitirosol (3,4-DHPEA), acetato de hidroxitirosol, tirosol (p-HPEA), acetato de tirosol, glucósido de hidroxitirosol, vainillina.
- c) Secoiridoides y sus derivados: formas aldehídicas del ácido decarboximetil elenólico enlazado a hidroxitirosol (oleaceina o 3,4-DHPEA-EDA) y a tirosol (oleocantal o p-HPEA_EDA), agliconas de oleuropeína (3,4-DHPEA-EA) y de ligustrosido (p_HPEA-EA), formas aldehídicas de oleuropeína y ligustrosido aglicona, ácido elenólico (libre y glucósido).
- d) Flavonoides: luteolina y apigenina.
- e) Lignanós: (+)-1-acetoxipinoresinol y (+)-pinoresinol.
- f) Hidroxil-isocromanós: 1-fenil-6,7-dihidroxiisocromano y 1-(3'-metoxi-4'-hidroxi)fenil-6,7-dihidroxiisocromano.

Ácidos fenólicos

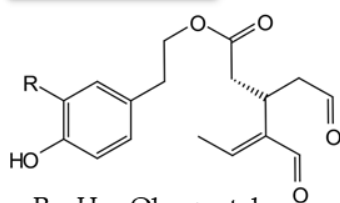
$R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OH}$; ác. cafeico
 $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}$; ác. p-coumárico
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$; ác. ferúlico



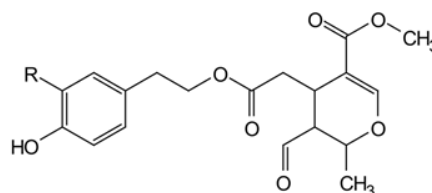
$R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$; ác. gálico
 $R_1 = R_3 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}$; ác. siríngico
 $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$; ác. vanílico

Alcoholes fenólicos

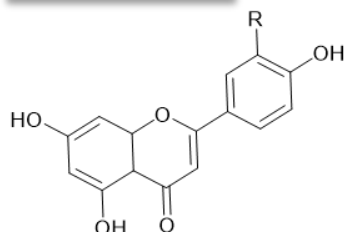
$R = \text{H}$; Tirosol
 $R = \text{OH}$; Hidroxitirosol

Secoiridoides

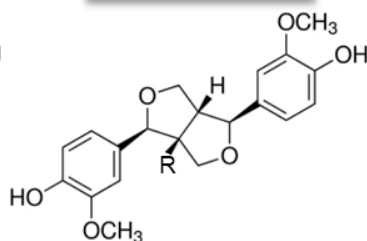
$R = \text{H}$; Oleocantal
 $R = \text{OH}$; Oleaceína



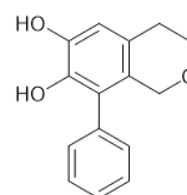
$R = \text{H}$; Aglicona de Ligustrosido monoaldehídica
 $R = \text{OH}$; Aglicona de Oleuropeína monoaldehídica

Flavonoides

$R = \text{H}$; Apigenina
 $R = \text{OH}$; Luteolina

Lignanós

$R = \text{H}$; (+)-Pinoresinol
 $R = \text{OH}$; (+)-Acetoxipinoresinol

Hidroxil-isocromanos

1-fenil-6,7-dihidroxi-isocromano

Figura 1.35. Estructura química de los principales compuestos fenólicos polares en el AOV.
Fuente: Imagen propia.

1.4. LA CALIDAD Y AUTENTICIDAD DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

1.4.1. Calidad y autenticidad

Definir los conceptos calidad y autenticidad o pureza de un alimento, en concreto del aceite de oliva virgen, presenta un desafío debido a la complejidad y la naturaleza, tanto objetiva como subjetiva, de estos términos. La Real Academia Española (RAE), en su Diccionario panhispánico del español jurídico (DPEJ), define la calidad como «conjunto de propiedades de un producto, de un servicio, de una empresa o de una organización que le confieren su aptitud para satisfacer unas necesidades expresadas o implícitas». En este sentido, y respecto al aceite de oliva virgen, cabría destacar de la definición el componente objetivo «necesidades expresadas» entendidas como requisitos regulatorios o normativos. Las «necesidades implícitas» corresponderían a requisitos nutricionales, de seguridad alimentaria, además de ciertas características organolépticas que el consumidor presupone y que, por lo tanto, dependen de la percepción subjetiva de cada individuo.

La autenticidad y la pureza se relacionan con la genuinidad y la integridad del alimento, es decir, la correspondencia entre su identidad declarada y su composición real. En el contexto del aceite de oliva virgen, la autenticidad implica que el producto provenga exclusivamente de aceitunas y se obtenga mediante métodos mecánicos, sin adulteración ni mezclas con otros aceites. La pureza supone la ausencia de impurezas, contaminantes o adulterantes en el aceite.

1.4.2. Calidad y pureza reglamentada del aceite de oliva virgen

El alto precio y el reconocimiento de los aceites de oliva virgen como un producto saludable y de alta calidad lo convierten en un objetivo atractivo para diversas prácticas fraudulentas. Los fraudes pueden implicar la comercialización del aceite en categorías superiores a las que le correspondería según su categoría comercial verificada a través de un etiquetado incorrecto, así como la adulteración mediante la mezcla con otros

aceites vegetales más económicos. Este modo de proceder, ya sea intencionado o no, genera un perjuicio muy significativo, tanto para los consumidores que reciben un producto que no cumple con sus expectativas, como para los diversos actores del sector oleícola que se esfuerzan por mantener altos estándares de calidad en la producción y comercialización de los aceites de oliva virgen. Dadas estas circunstancias, resulta pertinente establecer regulaciones y normas de comercialización rigurosas que garanticen la calidad y autenticidad de los aceites de oliva.

Existen múltiples regulaciones y normativas vigentes que se aplican según el lugar de comercialización de los aceites de oliva. Para ello, diversos organismos, como la Unión Europea (UE 2022a, 2022b), el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2022a) y el Codex Alimentarius (2021), se encargan de establecer y supervisar las principales normativas. Además, algunos Estados productores tienen sus propias regulaciones específicas, como Australia (AS, 2011) o Estados Unidos (USDA, 2010). Dentro de la UE, la legislación concerniente a los aceites de oliva está compuesta por regulaciones de obligado cumplimiento, las cuales están sujetas a sanciones en caso de incumplimiento. Por otro lado, en el comercio internacional, se aplican las normativas establecidas por el COI en los países que las reconocen, o bien pueden regirse por las directrices del Codex Alimentarius, que establece estándares internacionales para el comercio de alimentos. Es importante resaltar que las normas establecidas por estos organismos internacionales representan acuerdos voluntarios aceptados por los países signatarios, con el objetivo de regular el comercio internacional.

Para lograr la diferenciación adecuada entre los diferentes tipos de aceites de oliva, es esencial establecer tanto las propiedades físicas y químicas específicas de cada categoría, como las características sensoriales inherentes a los aceites de oliva vírgenes. Las regulaciones y normativas vigentes proporcionan definiciones claras de las categorías comerciales (como virgen extra, virgen, lampante, entre otras), además de establecer límites específicos para los parámetros químicos relevantes que aseguran la autenticidad y pureza del aceite de oliva.

Las definiciones de las categorías comerciales de aceite de oliva suelen ser similares entre los organismos reguladores o incluso iguales. Pero en algunos casos existen discrepancias en los valores de los parámetros químicos como, por ejemplo, en el contenido de ciertos ácidos grasos o esteroides o incluso en parámetros sensoriales. Esto supone un obstáculo en el comercio internacional al tratar de garantizar la calidad y autenticidad de ciertos aceites de oliva.

El principal desafío actual en la elaboración de normas para el aceite de oliva radica en la consideración de una amplia diversidad de aceites de oliva virgen de diferentes regiones y variedades de olivos. Con la expansión de los olivares más allá del área mediterránea tradicional de cultivo, se han encontrado aceites vírgenes auténticos que no cumplen, en uno o más parámetros químicos, los límites establecidos por las normas comerciales actuales (Ceci y Carelli, 2007; Mailer *et al.*, 2010; Guillaume *et al.*, 2012; Manai-Djebali *et al.*, 2012; Srigley *et al.*, 2016; Chennit *et al.*, 2021). Esto no se limita solo a olivares no mediterráneos, sino que también incluye aceites de oliva de variedades mediterráneas (Gracia, 2001; Salvador *et al.*, 2001, 2003; Rivera del Álamo *et al.*, 2004; Gracia *et al.*, 2009; Kycyk *et al.*, 2016). Estas situaciones han llevado a la actualización de los límites para estos compuestos químicos, en casos particulares, en las sucesivas modificaciones normativas. El desarrollo e implementación de árboles de decisión ha sido considerada como otra estrategia viable, con el propósito de permitir una clasificación efectiva de los aceites genuinos sin poner en riesgo el control sobre la adulteración. Sin embargo, se requiere una adopción más generalizada en las diversas normativas vigentes para su plena eficacia ya que persisten discrepancias entre las regulaciones y normas comerciales vigentes en el ámbito del comercio internacional. El cambio climático podría además plantear nuevos retos en términos del cumplimiento de los límites establecidos en olivares que hasta ahora no habían presentado desviaciones normativas.

En este sentido, tanto la regulación actualmente vigente de la UE (2022a) como las normas del COI (2022a) y del Codex Alimentarius (2021) contemplan árboles decisionales en cuanto a las desviaciones que pudieran producirse respecto a los

contenidos en campesterol (Figura 1.36, Figura 1.37) y $\Delta 7$ -estigmasterol (Figura 1.38, Figura 1.39) en los aceites de oliva virgen y virgen extra. Sin embargo, como se puede observar, no coinciden entre sí.

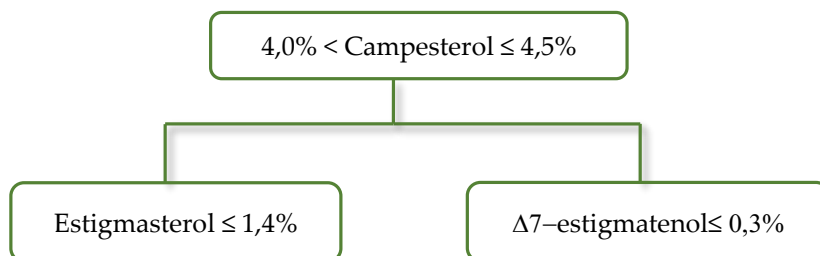


Figura 1.36. Árbol de decisión del campesterol para AOVE y AOV. Fuente: UE (2022a), COI (2022a).

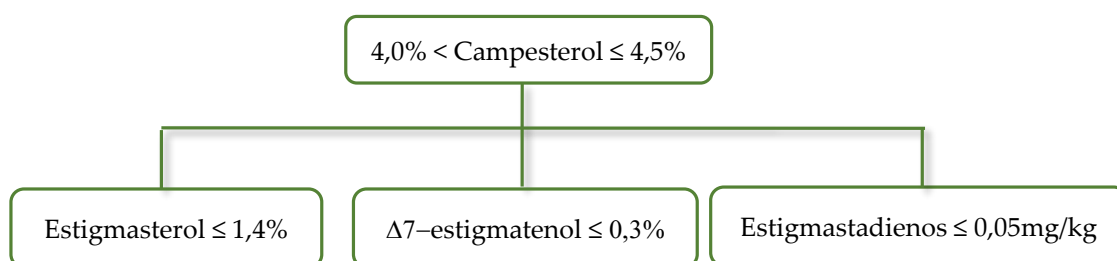


Figura 1.37. Árbol de decisión del campesterol para aceites de oliva en general. Fuente: Codex Alimentarius (2021).

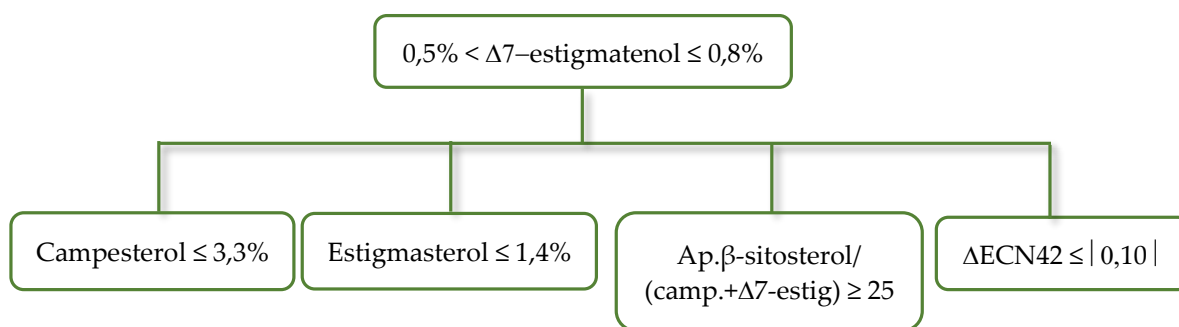


Figura 1.38. Árbol de decisión del $\Delta 7$ -estigmasterol para AOVE y AOV. Fuente: UE (2022a).

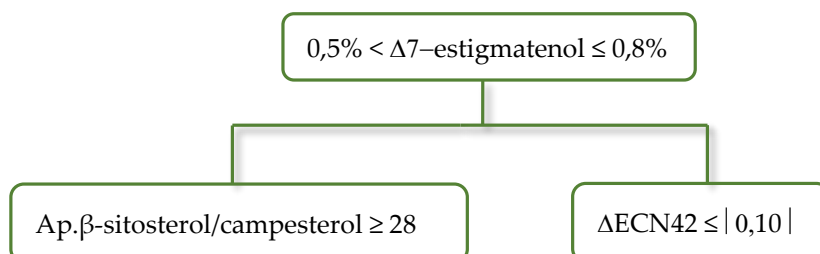


Figura 1.39. Árbol de decisión del $\Delta 7$ -estigmasterol para AOVE y AOV. Fuente: COI (2022a).

La norma Codex Alimentarius (2021) no contiene árbol decisonal en caso de valores de $\Delta 7$ -estigmatenol superiores a 0,5%. Esta situación también se observa en la normativa estadounidense (USDA, 2010) (García-González *et al.*, 2017). Otras normativas podrían aplicar criterios diferentes. En el caso de la legislación europea, los árboles de decisión (Figura 1.38, Figura 1.39) fueron introducidos mediante el Reglamento de Ejecución (UE) n° 1348/2013, por el que se modificaba el Reglamento (CEE) n° 2568/1991, (UE, 2013) y han ido manteniéndose en las diferentes modificaciones del Reglamento (CEE) No 2568/1991 (CEE, 1991).

Las regulaciones de la UE han evolucionado a lo largo del tiempo, estableciendo parámetros, valores límite y métodos analíticos de control para verificar la calidad y pureza de los aceites de oliva. De hecho, a lo largo del desarrollo experimental de la presente Tesis Doctoral, que tuvo lugar entre los años 2017 y 2019, 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 (CEE, 1991), era el que estaba vigente. Su derogación en 2022, tuvo lugar a través del Reglamento Delegado (UE) 2022/2104, el cual mantuvo sin cambios técnicos significativos las características de calidad y pureza de los aceites de oliva según sus categorías comerciales (UE, 2022a). Además, el Reglamento Delegado (UE) 2022/2105 estableció las normas relativas a los controles de conformidad de las normas de comercialización del aceite de oliva y los métodos de análisis de sus características, haciendo referencia a los métodos vigentes publicados por el COI (UE, 2022b). Estos cambios en la legislación europea no han tenido impacto alguno en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral.

Los parámetros establecidos en ambas regulaciones europeas (UE, 2022a, 2022b) son los únicos que pueden emplearse en los controles oficiales en la Unión Europea. De la misma manera, los métodos que se mencionan son los únicos autorizados para los laboratorios designados por cada Estado miembro, como el Laboratorio Agroambiental del Gobierno de Aragón, responsable de llevar a cabo dichos controles en la Comunidad Autónoma de Aragón.

En definitiva, el Reglamento Delegado (UE) 2022/2104, por el que se completa el Reglamento (UE) n° 1308/2013 del Parlamento Europeo y el Consejo, en lo que respecta a las normas de comercialización del aceite de oliva, y por el que se derogan el Reglamento (CEE) n° 2568/91 de la Comisión y el Reglamento de Ejecución (UE) n° 29/2012 de la Comisión (UE, 2022a), es el que establece, en su anexo I, las características de calidad y de pureza que deben de cumplir las distintas categorías de los aceites de oliva virgen comercializados en la Unión Europea.

1.4.2.1. Características de calidad

El aceite de oliva virgen obtenido a partir de aceitunas sanas y recolectadas en un estado óptimo, transportadas y procesadas de manera inmediata y sometidas a proceso de extracción físico no agresivo (tritución, malaxado, centrifugación, filtración) preserva sus propiedades organolépticas y nutricionales, además de su calidad. Este aceite es el resultado fiel de lo que la aceituna ha contenido hasta el momento de su recolección. Cuando la aceituna sufre deterioro debido a diversas causas como microorganismos, plagas, heladas o caída al suelo, o cuando se extrae su aceite utilizando métodos agresivos sin mantener la higiene adecuada, el aceite de oliva resultante adquiere características organolépticas que revelan estas prácticas inadecuadas, y su calidad fisicoquímica se verá alterada.

Las características fisicoquímicas y organolépticas que deben reunir los aceites de oliva virgen se engloban dentro de las características de calidad que deben de cumplir según las distintas categorías de los aceites (UE, 2022a) (Tabla 1.9).

Tabla 1.9. Características de calidad para los aceites de oliva virgen (UE, 2022a).

Parámetro	Aceite de oliva virgen extra	Aceite de oliva virgen	Aceite de oliva lampante
Acidez (% ác. oleico)	≤ 0,8	≤ 2,0	> 2,0
Índice peróxidos (mEq O ₂ /kg)	≤ 20,0	≤ 20,0	—
K ₂₃₂	≤ 2,50	≤ 2,60	—
K ₂₇₀	≤ 0,22	≤ 0,25	—
ΔK	≤ 0,01	≤ 0,01	—
Ésteres etílicos (mg/kg)	≤ 35	—	—
Mediana del defecto (Md)	0,0	≤ 3,5	—
Mediana del frutado (Mf)	> 0,0	> 3,5	—

1.4.2.1.1. *Calidad fisicoquímica*

La calidad fisicoquímica se determina según los parámetros que recoge la Tabla 1.9 y que se detallan a continuación.

A) Acidez

Informa sobre el deterioro en la calidad del aceite de oliva producido por la hidrólisis de los triglicéridos (TAGs), que resulta en la liberación de ácidos grasos al romperse los enlaces éster. Este proceso de hidrólisis se ve favorecido por la lipólisis enzimática o microbiana que ocurre en la aceituna, la cual puede ser causada por plagas, un almacenamiento inadecuado tanto de la aceituna como del aceite de oliva, y condiciones de humedad o temperaturas inapropiadas.

B) Índice de peróxidos

Las insaturaciones de los ácidos grasos son susceptibles de autooxidaciones por la acción del oxígeno, las cuales pueden verse aceleradas por la exposición a la luz (fotooxidación), la presencia de metales como el hierro o el cobre, o incluso por pigmentos como la clorofila.

El índice de peróxidos está relacionado exclusivamente con los productos primarios de oxidación, los hidroperóxidos, que se producen antes de que sea perceptible a nivel organoléptico. A medida que progresa la oxidación, es posible que este parámetro disminuya debido a la formación de otros productos de oxidación intermedia y secundaria, por lo que no proporciona una representación exhaustiva del estado oxidativo de un aceite.

C) Coeficientes de absorción al UV-Visible

Los coeficientes de absorción al UV-Visible engloban tres parámetros: K_{270} , K_{232} y ΔK . El valor de K_{232} , es la medida de la oxidación primaria del aceite de oliva conjuntamente con el índice de peróxidos. Los hidroperóxidos y dienos formados, éstos últimos compuestos corresponden a una oxidación intermedia, absorben cerca de la longitud de onda 232 nm, por lo que pueden cuantificarse. Por otro lado, el parámetro

K₂₇₀ cuantifica los compuestos carbonílicos producidos por un proceso de oxidación secundaria, más avanzada, del aceite de oliva. El valor de K₂₇₀ también proporciona información sobre trienos conjugados generados en procesos de refinado, lo que podría indicar la mezcla de aceites de oliva virgen con aceites refinados. Finalmente, el parámetro ΔK cuantifica otros productos de degradación que absorben en longitudes de onda entre 266 a 274 nm.

D) Ésteres etílicos de los ácidos grasos

El contenido de ésteres etílicos de ácidos grasos está estrechamente relacionado con las aceitunas de baja calidad y los procesos fermentativos en los que participa el etanol, por ejemplo, como producto generado en la fermentación de los azúcares que contiene la pulpa de la aceituna. Estos compuestos se forman por la reacción entre los ácidos grasos libres y el etanol, por lo que aceites con mayor acidez son proclives a tener mayor concentración de estos compuestos.

En el caso de aceites de oliva de baja calidad con ligeros defectos organolépticos, prácticas ilegales como la neutralización y la desodorización suave a baja temperatura se utilizan para ocultar sus características negativas. La desodorización suave, utilizada en estas prácticas fraudulentas no elimina por completo los ésteres etílicos de ácidos grasos, lo que los convierte en marcadores indirectos de estas prácticas. Aunque no todos los aceites sometidos a desodorización suave, como los aceites rancios, presentan niveles elevados de ésteres etílicos de ácidos grasos (Gómez-Coca *et al.*, 2016).

1.4.2.1.2. Calidad organoléptica

Las reacciones que se han descrito como responsables de la pérdida de calidad fisicoquímica del aceite de oliva virgen (hidrólisis de triacilglicéridos, autooxidación y fotooxidación de los ácidos grasos, oxidación microbiana, fermentación de azúcares y degradación de aminoácidos) también generan compuestos orgánicos volátiles que contribuyen en gran medida a los atributos sensoriales negativos (Procida *et al.*, 2005; Moreda *et al.*, 2012; Cayuela *et al.* 2015; Vichi *et al.* 2015; Cecchi *et al.*, 2021). Por otra parte, los atributos positivos propios de los aceites de oliva virgen, como el sabor amargo

(Angerosa *et al.*, 2004) y las percepciones quinesésicas de picor y astringencia, se deben principalmente a la presencia de compuestos fenólicos. El carácter frutado está relacionado principalmente con otras moléculas orgánicas volátiles que se generan a través de la ruta de la lipoxigenasa (LOX) (Salas *et al.*, 2013).

El aceite de oliva virgen es el único producto alimenticio que cuenta con un método normalizado de clasificación comercial basado en atributos sensoriales. Consiste en la identificación y cuantificación de los atributos positivos (amargo, picante y frutado) y los principales defectos (UE, 2022a; COI, 2018). La evaluación organoléptica es un método que combina aspectos cualitativos y cuantitativos, ya que permite clasificar las muestras en función de la mediana del defecto predominante (Md) y la presencia o ausencia del atributo frutado. El método utilizado, desarrollado por el COI (2018) y de aplicación en la legislación europea (UE, 2022b), establece cuatro categorías comerciales de aceites de oliva vírgenes: AOVE, AOV, AO corriente y AO lampante. Ahora bien, la legislación europea solo contempla tres categorías, del tal modo que la categoría AO corriente no está incluida (UE, 2022a). En la Tabla 1.9 figuran los valores de las medianas de los atributos (Md y Mf) según la categoría de los aceites de oliva vírgenes.

El panel de catadores encargado de la evaluación organoléptica debe ser seleccionado, entrenado y supervisado adecuadamente para evaluar la intensidad de los atributos sensoriales, tanto positivos como negativos, asignándoles un valor del 0 al 10 en una ficha de cata que enumera los principales atributos (COI, 2018). Otras normas del COI especifican las definiciones de estos atributos, los requisitos de las copas de cata, la adecuación de las instalaciones y el procedimiento de las sesiones de cata (COI, 2023b).

1.4.2.2. Características de pureza

Con el objetivo de salvaguardar la autenticidad de los aceites de oliva virgen frente a posibles prácticas fraudulentas, como la mezcla con otros aceites vegetales o incluso grasas animales, se establecieron características o criterios de pureza (CEE, 1991; UE, 2022a; COI, 2022a). Los compuestos químicos que se controlan en los AOV para verificar su autenticidad y pureza pueden tener diferentes orígenes: algunos están

naturalmente presentes, aunque dentro de rangos o límites específicos, como ciertos ácidos grasos, mientras que otros son productos de procesos no autorizados en la producción de AOV, como la formación de estigmastadienos o $\Delta 5,23$ -estigmastadienol durante el proceso de refinado del aceite.

En la sección 1.3.2 de la presente Tesis Doctoral se proporciona un análisis detallado de los compuestos químicos naturalmente presentes en los aceites de oliva virgen sujetos a análisis para asegurar la pureza del aceite (Tabla 1.10). Estos compuestos incluyen ácidos grasos, esteroides, ceras, diolcoholes triterpénicos y alcoholes alifáticos. Su presencia o ausencia y contenido se verifica y contrasta con las características de pureza regulada según la legislación europea (UE, 2022a, 2022b) o con cualquier otra normativa que le sea de aplicación. Los valores permitidos en términos de pureza, para la composición de ácidos grasos y esteroides, compuestos que generan mayor controversia, se detallan en la Tabla 1.6 y en la Tabla 1.8, respectivamente.

Tabla 1.10. Detección de adulteración en los aceites de oliva virgen.

Parámetro	Detección
Composición ácidos grasos (%)	Presencia otros aceites vegetales o grasas animales
Isómeros trans ácidos grasos (%)	Presencia aceites refinados
Ceras (mg/kg)	Presencia aceite orujo
Esteroides totales (mg/kg)	Presencia aceites de semillas «desesterolizados»
Composición esteroides (%)	Presencia otros aceites vegetales o grasas animales
Eritrodiol + Uvaol (%)	Presencia aceite orujo
Estigmastadienos (mg/kg))	Presencia aceites refinados
Alcoholes alifáticos (mg/ kg)	Presencia aceite orujo
Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Presencia aceites esterificados
Δ ECN42-TAGs	Presencia de aceites de semillas

Fuente: Aparicio *et al.* (2013), Conte *et al.* (2020b).

Es necesario incidir sobre los esteroides ya que son los compuestos menores más importantes del aceite de oliva a efectos de autenticación y, debido a que su perfil también varía entre distintas variedades de aceites de oliva virgen, se utilizan como «huella dactilar» del aceite de oliva (García-González *et al.*, 2009). Por ejemplo, los aceites de colza contienen niveles significativos de brasicasterol mientras que los aceites de cártamo y girasol contienen niveles altos de $\Delta 7$ -estigmastenol y, en el caso del aceite de oliva, los esteroides tienen un perfil de niveles altos de β -sitosterol y $\Delta 5$ -avenasterol, pero

bajos niveles de campesterol, estigmasterol, brasicasterol y $\Delta 7$ -estigmasterol. La adición de un 5% de aceite de girasol a un aceite de oliva aumenta las concentraciones de estigmasterol, campesterol y $\Delta 7$ -stigmasterol significativamente por encima de las que se encuentran en los aceites de oliva no adulterados (Aparicio García-González, 2013).

1.4.3. Calidad nutricional

Numerosos estudios clínicos avalan las propiedades saludables de los aceites de oliva virgen, especialmente el virgen extra (López-Miranda *et al.*, 2010; EFSA, 2011a, 2011b; Gaforio *et al.*, 2019). La reconocida calidad nutricional de los aceites de oliva virgen radica en su composición química, caracterizada por ser una fuente importante de ácidos grasos monoinsaturados, principalmente ácido oleico, y por la presencia de otros componentes minoritarios como los fenoles o tocoferoles (vitamina E).

A este respecto, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) concluyó que existía una relación causal entre el consumo de polifenoles del aceite de oliva (estandarizados por el contenido de hidroxitirosol y sus derivados) y la protección de las partículas de colesterol LDL (lipoproteínas de baja densidad) contra el daño oxidativo (EFSA, 2011b). La oxidación de las partículas LDL podría desempeñar un papel en el inicio y la progresión de la aterosclerosis entre otras patologías cardiovasculares (Holvoet *et al.*, 2001). En este sentido, un metaanálisis posterior que incluyó 300 estudios experimentales informó que la ingesta de aceite de oliva con alto contenido de fenoles resultó en la disminución de la concentración de LDL oxidada (Hohmann *et al.* 2015).

Posteriormente, la opinión científica de la EFSA se reflejó en la inclusión de una declaración de propiedad saludable al respecto en el Reglamento (UE) nº 432/2012 de la Comisión 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 (UE, 2012). En concreto, la declaración informa que «los polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre frente al daño oxidativo» para el «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».

La publicación de este Reglamento estableció la necesidad de desarrollar métodos de cuantificación precisos exclusivamente para el análisis de los compuestos mencionados en la declaración. No existía un método oficial que permitiera la separación completa de todas las formas de hidroxitirosol y tirosol presentes en los aceites de oliva virgen (Mastralexi *et al.*, 2014^a, 2014b; Purcaro *et al.*, 2014; Tsimidou y Boskou, 2015; Tsimidou *et al.*, 2018, Tsimidou, 2022). Previamente, el Consejo Oleícola Internacional había publicado y revisado un procedimiento analítico para la determinación de los biofenoles, que incluía derivados naturales u oxidados de la oleuropeína y del ligustrósido, lignanos, flavonoides y ácidos fenólicos, presentes en el aceite de oliva, expresándolos en mg/kg de tirosol (COI, 2017). Mientras este método era revisado nuevamente para su aplicación en base al Reglamento (UE) n° 432/2012 (UE, 2012), la comunidad científica desarrolló otros procedimientos para abordar las limitaciones que el método del COI presentaba. Varios autores propusieron hidrolizar las formas enlazadas de hidroxitirosol y tirosol mediante hidrólisis ácida o básica de las fracciones fenólicas aisladas de los aceites de oliva virgen (Mulinacci *et al.*, 2006; Mastralexi *et al.*, 2014a, 2014b; Purcaro *et al.*, 2014; Romero y Brenes, 2012, 2014; Reboredo-Rodríguez *et al.*, 2016). Posteriormente, Tsimidou *et al.* (2019a, 2019b) validaron internamente una metodología basada en la cuantificación del contenido total de hidroxitirosol y tirosol en la fracción polar del aceite de oliva virgen, antes y después de la hidrólisis ácida de sus formas ligadas, con posterior cromatografía líquida de ultraresolución con detección diodo array (UHPLC-DAD). Este procedimiento fue posteriormente sometido a una validación interlaboratorio a través del proyecto Oleum (<http://www.oleumproject.eu/>) para completar su validación. En ella participaron 16 laboratorios, tanto de control oficial como de centros de investigación, entre los que se encontraba el Laboratorio Agroambiental del Gobierno de Aragón.

Finalmente, en el año 2022, el COI aprobó un método diferente al validado por Tsimidou *et al.* (2019a, 2019b), que incluía dos procedimientos referidos a la

determinación de polifenoles mediante HPLC-UV, uno de ellos como método rápido y el otro para aplicación en cuanto a la declaración de propiedad saludable de la EFSA (UE, 2012; COI, 2022b; Tsimidou, 2022).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El olivar en Aragón, cultivo con arraigada tradición en esta región, ocupa una extensión aproximada de 49.000 hectáreas, distribuidas en las tres provincias que conforman la comunidad autónoma. Estas tierras albergan mayoritariamente variedades autóctonas de olivo en plantaciones tradicionales, algunas de ellas incluso todavía poco caracterizadas al ser minoritarias y locales. Sin embargo, se observa claramente el incremento actual de las plantaciones de olivos en sistemas intensivos y superintensivos, especialmente utilizando variedades obtenidas a través de programas de mejora genética. Esta tendencia impide la puesta en valor de la diversidad genética existente en el olivar aragonés en el contexto del mercado globalizado actual, con nuevos escenarios climáticos.

Para poder proteger la calidad y singularidad de los aceites de oliva virgen extra (AOVE) producidos en Aragón, además de las denominaciones de calidad diferenciada (en Aragón existen actualmente dos Denominaciones de Origen Protegidas, DOP, y otra en solicitud de registro), es necesario un estricto control sobre su autenticidad.

La calidad y las propiedades organolépticas sobresalientes de los AOVE sumadas a los más que demostrados beneficios para la salud derivados de su consumo, contribuyen al gran valor añadido y comercial de estos aceites. Por este motivo y por la facilidad de su adulteración con otros aceites de oliva de inferior categoría, o con otros aceites vegetales, este producto es objeto de prácticas fraudulentas en la industria alimentaria. Es por ello, que la legislación europea y otras normas de comercialización de los aceites de oliva, han definido las características de calidad y pureza de cada una de las categorías de los aceites de oliva y de orujo de oliva, así como los métodos de análisis que los laboratorios de control oficial deben aplicar en su inspección y control. Algunos de los compuestos químicos, que definen el perfil lipídico de los aceites de oliva y que son utilizados como «huella dactilar», presentan cierta variabilidad no contemplada en toda su extensión en el establecimiento de los criterios de pureza de estos aceites. Diversos factores agronómicos como la genética (variedad, clon), el ambiente (suelo, ubicación geográfica, clima) o las prácticas agronómicas (fecha de

recogida, riego, etc.), entre otros, pueden influir en el perfil lipídico de un aceite de oliva virgen extra pudiendo no ser considerado genuino, con la consiguiente pérdida de valor económico. Un ejemplo de ello es la variedad Empeltre, cuyos aceites presentan en ocasiones alto contenido de uno de sus esteroides: el Δ^7 -estigmastenol. Esta variedad de aceituna es la predominante en el olivar aragonés y abarca, aproximadamente, el 67% de su superficie oleícola cultivada. Históricamente, por la doble aptitud de sus aceitunas, ya sea para aceituna de mesa o de almazara, se han comercializado principalmente aceites obtenidos a partir de frutos maduros. No obstante, la tendencia actual en la industria del aceite de oliva hacia la producción de aceites de cosecha más temprana ofrece una oportunidad valiosa para su comercialización, tanto en el caso de Empeltre como en otras variedades autóctonas de Aragón.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral ha consistido en el estudio de la diversidad de las variedades de aceitunas de almazara cultivadas en Aragón y de sus aceites de oliva virgen extra a través de un exhaustivo análisis mediante su caracterización fisicoquímica. Este estudio permitirá valorizar la identidad propia de los aceites de oliva virgen extra de Aragón, al resaltar sus características fisicoquímicas y nutricionales singulares. Para llevar a cabo esta investigación, se ha empleado tanto material vegetal de variedades autóctonas cultivadas en Aragón, como aceites de oliva virgen extra procedentes de variedades autóctonas de almazaras y cooperativas agrarias ubicadas en la comunidad autónoma.

Para la consecución del objetivo principal, se plantearon los siguientes objetivos parciales:

1. Estudiar la influencia de factores agronómicos (genéticos, ambientales y maduración) sobre las características de las aceitunas de variedades autóctonas de Aragón destinadas a almazara.
2. Estudiar la evolución de la calidad y perfil lipídico de los aceites de oliva virgen extra de variedades autóctonas de Aragón destinadas a almazara a lo largo de la maduración del fruto y su efecto en la obtención de aceites de oliva diferenciados.

3. Estudiar la influencia de factores agronómicos en la calidad, el perfil lipídico y autenticidad de los aceites de oliva virgen extra de variedades autóctonas de Aragón destinadas a almazara y en la obtención de aceites de oliva con características fisicoquímicas singulares.
4. Establecer la diferenciación de los aceites de oliva virgen extra de distintas zonas productoras de Aragón a través de su perfil lipídico e identificar las características específicas para cada zona productora.
5. Evaluar el cumplimiento de la declaración de propiedad saludable referida a los polifenoles en los aceites de oliva virgen extra de variedades autóctonas de Aragón.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIA PRIMA Y DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1.1. Ensayos en Finca Experimental

Todo el material vegetal del que se han obtenido los aceites analizados en el desarrollo de esta Tesis Doctoral se obtuvo de la Finca Experimental de Cultivos Leñosos perteneciente al Gobierno de Aragón, ubicada en Alcañiz (Teruel), en la cual había ensayos sobre el olivar plantados con anterioridad. Entre estos ensayos, se seleccionaron los olivos procedentes de los ensayos denominados «Selección clonal de Empeltre» y «Variedades».

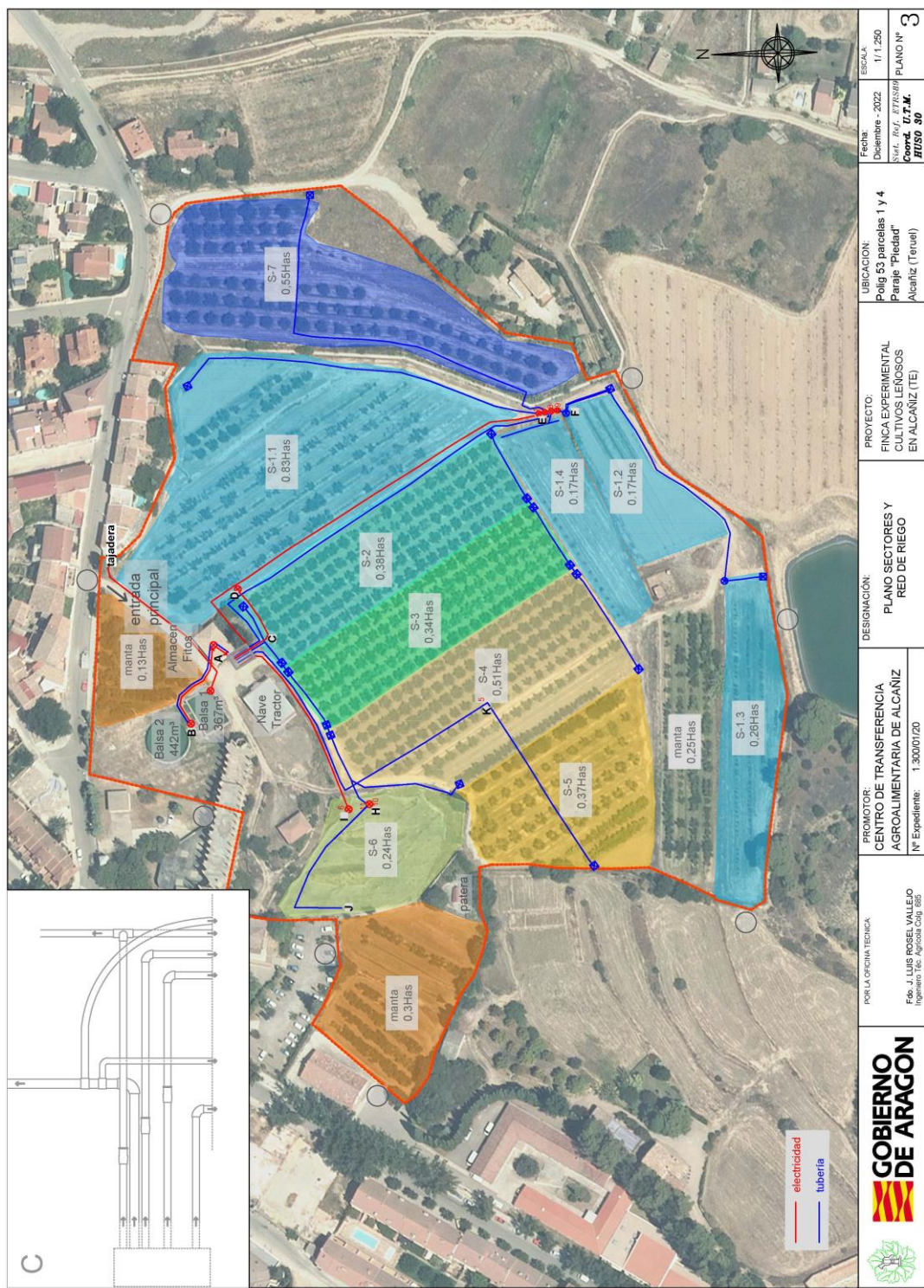
Los estudios sobre el material vegetal seleccionado se realizaron durante los años 2017, 2018 y 2019, es decir, durante las campañas oleícolas 2017/18, 2018/19 y 2019/20. Por tanto, los datos ambientales concernientes a la meteorología y edafología corresponden a los obtenidos durante ese periodo de tiempo.

La materia vegetal procedente de esta finca se utilizó para la consecución de los objetivos 1, 2, 3 y 5 planteados en la sección «Justificación y objetivos».

3.1.1.1. Caracterización agronómica de la zona de estudio

3.1.1.1.1. Situación geográfica

La Finca Experimental de Cultivos Leñosos se encuentra situada en la localidad de Alcañiz, en la comarca del Bajo Aragón de la provincia de Teruel, Aragón. Actualmente forma parte del casco urbano, sin identificación en el Sistema de Información Geográfica de Parcelas Agrícolas (SIGPAC). Se trata de una finca de aproximadamente 1.000 m² de superficie. Tiene una ligera pendiente en dirección sur y se encuentra abancalada (Figura 3.1).



Los ensayos realizados se han llevado a cabo en dos parcelas diferentes situadas dentro de la finca (Figura 3.2: C, «ensayo clones»; V, «ensayo variedades»).

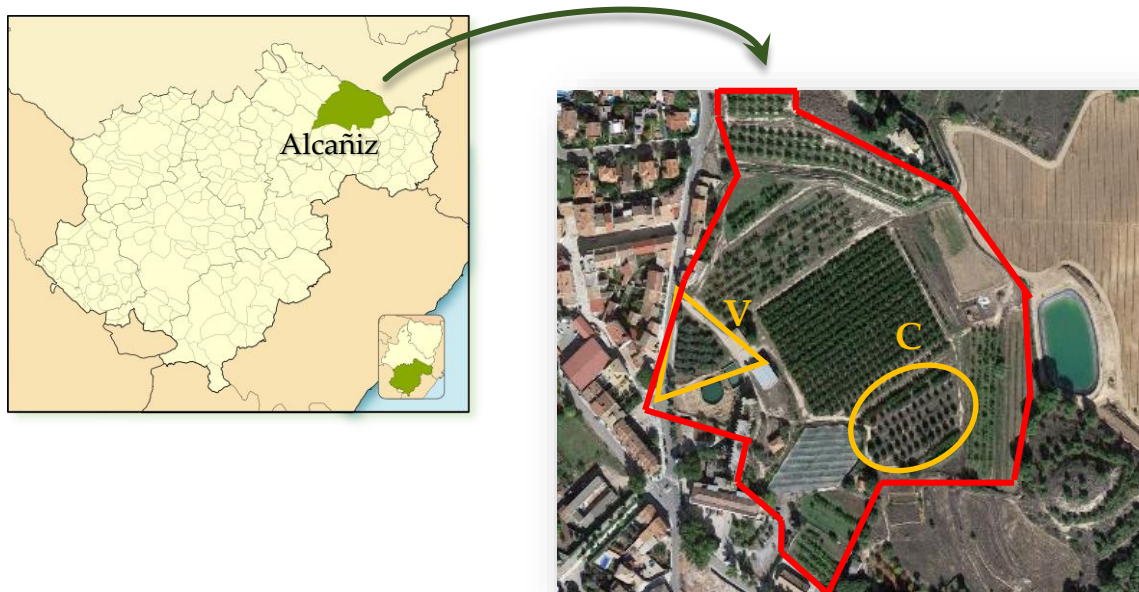


Figura 3.2. Localización de la Finca Experimental Cultivos Leñosos del Gobierno de Aragón en Alcañiz (Teruel). Coordenadas geográficas DMS: 41°03'27.00"N 0°08'36.00"W. Fuente: Google, 2021 ©. Instituto Geográfico Nacional. España.

3.1.1.1.2. Características climáticas

El municipio de Alcañiz (Teruel), a 307 m sobre el nivel del mar, tiene un tipo de clima seco estepario (BSk: B = clima seco; S = estepa; k = frío, según la clasificación climática de Köppen-Geiger) con un marcado carácter continental y mediterráneo, a causa de la proximidad a la costa mediterránea. Las precipitaciones, además de irregulares, son de las más escasas de la Península situando su máximo en primavera. En cuanto a las temperaturas, son extremas en invierno y en verano con una gran amplitud térmica absoluta a causa de la continentalidad térmica.

Según los datos obtenidos del Atlas Climático Digital de Aragón (Tabla 3.1), las precipitaciones anuales en Alcañiz se sitúan en 375 mm, declarando un balance hídrico deficitario al relacionarlo con la evotranspiración potencial de la región. El mes más lluvioso es mayo, siendo la primavera y el otoño las estaciones con mayor pluviometría. El régimen térmico del municipio se caracteriza por una temperatura media anual de

14,9 °C, con veranos cálidos (julio es el mes más cálido con una temperatura media de 25,0 °C) e inviernos fríos (temperatura media del mes de enero es de 6,4 °C).

Tabla 3.1. Tabla climática del municipio de Alcañiz (Teruel). Temperaturas medias, precipitaciones, evapotranspiración potencial y balance hídrico totales anuales y mensuales. Periodo estudio: 1970-2000.

Parámetro	Anual	E	F	M	A	M	Jun	Jul	A	S	O	N	D
T med (°C):	14,9	6,4	8,1	10,4	12,8	16,8	21,5	25,0	24,5	20,7	15,4	10,6	6,8
T min (°C):	9,5	1,8	3,0	5,1	7,2	10,9	15,3	18,4	18,2	14,8	10,4	5,8	2,5
T máx (°C):	20,4	11,0	13,2	15,6	18,5	22,7	27,8	31,6	30,8	26,7	20,4	15,3	11,1
P (mm)	375	29	18	25	34	51	34	16	28	38	41	30	33
ET ₀ (mm)	1213	32	45	75	104	147	175	200	173	118	71	42	29
B.H. (mm):	-838	-3	-28	-51	-71	-95	-141	-184	-146	-80	-30	-12	4

Fuente: Elaboración propia a partir del Atlas climático digital de Aragón.
<https://opengis.grumets.cat/wms/aragon/index.htm>

3.1.1.1.3. Meteorología

Los datos agrometeorológicos utilizados para el estudio durante el periodo 2017-2019 proceden de una estación agroclimática gestionada por la Oficina del Regante y perteneciente al Sistema de Información Agroclimática para el Regadío (SIAR, 2020) del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. La estación se encuentra ubicada en Puig Moreno (Tabla 3.2), a 14 km de la finca experimental.

Tabla 3.2. Localización estación agroclimática de la red SIAR.

Identificación	Altitud (m)	Latitud	Longitud	Municipio
TE02 Puig Moreno	323	41°05'49" N	0°14'20" W	Alcañiz

Fuente: SIAR (2020).

Tabla 3.3. Datos anuales medios de temperatura y radiación solar y datos anuales totales de pluviometría, evotranspiración potencial y balance hídrico en los años de estudio 2017, 2018 y 2019.

Campaña	T media (°C)	T min media (°C)	T máx media (°C)	Rad. solar med. (MJ/m²)	P total (mm)	ET ₀ total (mm)	Bal. hídrico total (mm)
2017	15,6	8,9	22,8	17,4	222,6	1325,3	-1103
2018	15,5	9,7	21,9	16,7	507,7	1227,1	-719
2019	16,0	9,3	23,0	18,0	216,0	1359,3	-1143

Fuente: Elaboración propia a partir de datos de SIAR (2020).

Comparando los datos meteorológicos anuales de los años de estudio (Tabla 3.3) con los datos climatológicos (Tabla 3.1) se aprecia una temperatura media anual superior durante los años de estudio influida principalmente por un aumento en la media de las temperaturas máximas.

De los tres años estudiados, el año 2018 fue el de menor amplitud térmica, es decir, con temperaturas mínimas más elevadas y máximas más bajas (Figura 3.3).

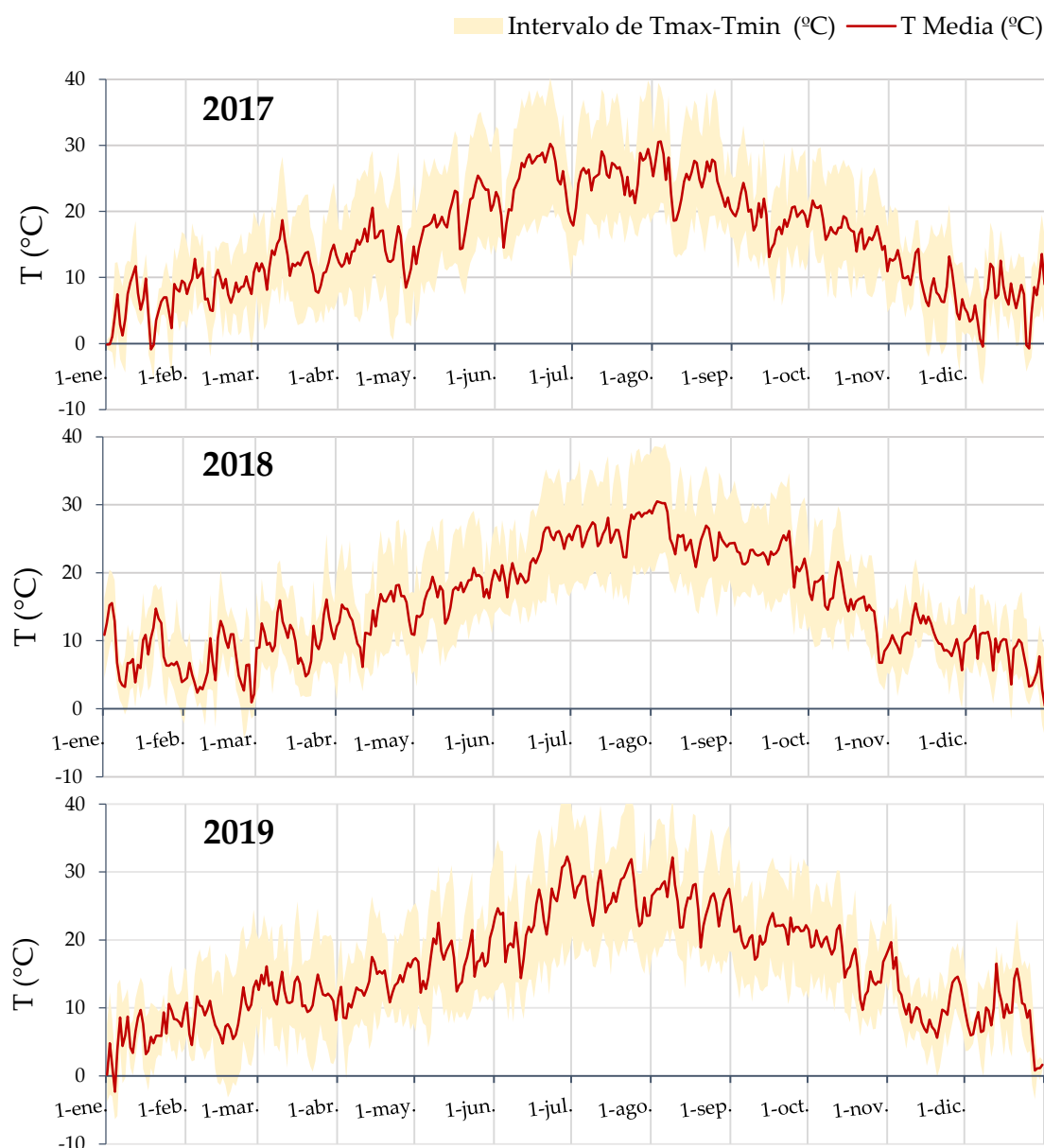


Figura 3.3. Régimen de temperaturas diarias (media, oscilación entre temperatura máxima y mínima) durante el periodo de muestreo de los años 2017, 2018 y 2019. Fuente: Elaboración propia a partir de datos de SIAR (2020).

En cuanto al régimen hídrico, los años 2017 y 2019 fueron mucho más secos de lo esperado. En cambio, durante el año 2018 las precipitaciones fueron muy abundantes, llegando a duplicar la pluviometría registrada en 2017 y 2019 (Figura 3.4). La distribución de lluvias en 2017, con un otoño extremadamente seco, fue muy diferente respecto a 2018 y 2019, cuyos otoños tuvieron unas precipitaciones dentro de lo esperable. El balance hídrico, aunque negativo en los tres años de estudio como cabría de esperar (Tabla 3.3), fue aún más negativo durante los años 2017 y 2019 dejando patente la extrema aridez de esta zona comparable con zonas del sudeste de la península (Almería).

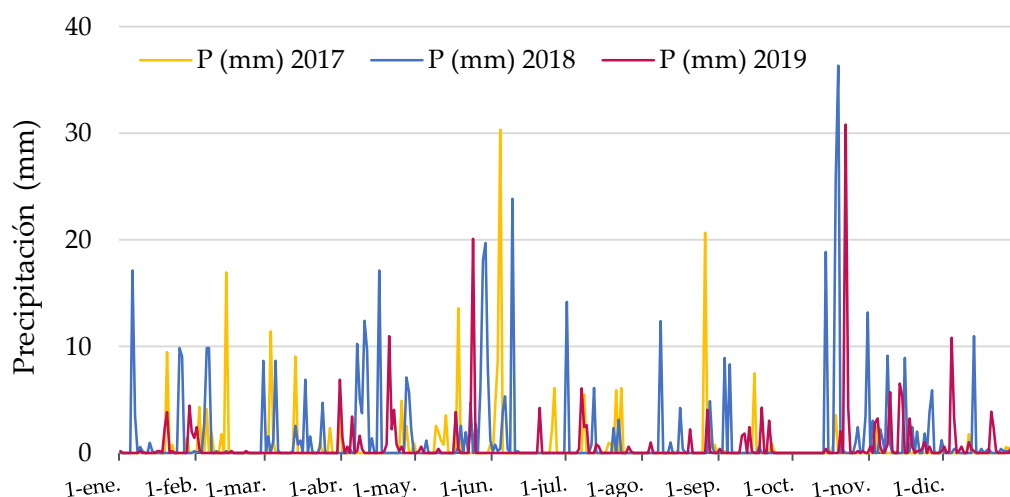


Figura 3.4. Precipitaciones diarias (mm) durante los años 2017, 2018 y 2019. Fuente: Elaboración propia a partir de datos de SIAR (2020).

3.1.1.1.4. Descripción edafológica

El Laboratorio Agroambiental (Gobierno de Aragón) realizó un reconocimiento y muestreo del suelo de la finca caracterizando un solo pedión (unidad de estudio del suelo) situado en el centro de la finca, dada la escasa superficie y la aparente homogeneidad del suelo (Tabla 3.4).

El suelo caracterizado, de textura fina y franco-arcillosa, tiene una alta capacidad de retención de agua y nutrientes debido a su alto contenido de arcilla y la ausencia de elementos gruesos. Tiene una buena estructura y un contenido relativamente alto de

materia orgánica lo que hace que globalmente el comportamiento físico del suelo sea muy favorable. El pH del suelo es moderadamente básico en todos los horizontes analizados. Pese a que los pH elevados pueden causar problemas de disponibilidad de nutrientes, el olivo está bien adaptado a estos suelos. La principal limitación del suelo de la finca es un contenido ligeramente alto de sales solubles. No obstante, la profundidad a la que se sitúa este problema queda por debajo de la zona de raíces del olivo. Por otro lado, el suelo muestra un contenido alto de fósforo, potasio y magnesio, pero un bajo contenido de nitrógeno mineral en el momento del muestreo. Es importante tener en cuenta que estos niveles, especialmente el del nitrógeno, pueden cambiar dependiendo de las prácticas de fertilización, las condiciones específicas del cultivo y el momento del muestreo.

Tabla 3.4. Datos analíticos (expresados sobre suelo seco al aire) correspondientes al suelo de la finca experimental.

Parámetros		Horizonte; profundidad (cm)			
		A _p (0-30)	B _{w1} (30-60)	B _{w2} (60-90)	C (90-120)
Granulometría (USDA)	Arena	32,44	39,14	36,34	43,37
	Limo grueso (%)	7,12	6,62	6,44	6,14
	Limo fino (%)	29,08	24,83	24,68	21,58
	Arcilla (%)	31,36	29,41	30,54	28,91
	Clase textural	Franco arcillosa	Franco arcillosa	Franco arcillosa	Franco arcillosa
Nutrientes (extr. acetato amónico)	CE1:5 (dS/m)	0,3	0,4	0,6	1,1
	pH 1:2,5	8,4	8,4	8,2	8,2
	m.o. (%)	2,11	1,16	0,83	0,79
	Ca ₂ CO ₃ eq. (g/100g)	44	45	44	46
	Caliza activa (g/100g)	12,35	11,88	10,5	10,78
	P Olsen	25	7	5	5
	K (mg/kg)	422	204	176	158
	Mg (mg/kg)	376	319	310	417
	N-NO ₃	6	3	2	2
Cationes solubles (en extracto de pasta saturada)	CEe (dS/m)	-	2,06	4,13	6,19
	Saturación de agua.	-	39,35	40	37,5
	Ca	-	18,88	37,78	40,56
	Mg	-	5,86	11,22	25,59
	Na	-	1,5	4,3	14,98
	S.A.R.	-	0,42	1,54	2,62

Fuente: Elaboración propia a partir de datos del Laboratorio Agroambiental del Gobierno de Aragón.

Según los resultados, el suelo de la finca experimental es de tipo Cambisol (IUSS, 2015). El olivo prospera muy bien en estos suelos con buena estructura, cuya fertilidad se puede mejorar con fertilización y enmiendas orgánicas.

3.1.1.1.5. Descripción de plantaciones

A) Ensayo «Selección clonal de Empeltre»

El olivar, plantado en 2004, se ubica en la parcela C de 0,29 hectáreas (Figura 3.2). La plantación incluyó un total de 16 clones, con tres árboles por clon, que han sido colocados aleatoriamente. El marco de plantación es de 8 x 6 m. El riego fue realizado mediante goteo y el aporte de agua se adaptó a la evapotranspiración. El sistema de poda fue en vaso. Anualmente se realizó un abonado de fondo con un aporte de 100 kg de fertilizante 15-15-15+2 al suelo, y vía foliar según necesidades nutricionales. Además, se utilizó herbicida en las líneas y se mantuvo la cubierta vegetal segada en la calle. Se realizaron los tratamientos fitosanitarios pertinentes contra el repilo, prays y mosca del olivo. Así, los olivos estuvieron bien mantenidos, supervisados y no mostraron deficiencias nutricionales ni daños por plagas.



Figura 3.5. Parcela ensayo «Selección clonal de Empeltre» en la finca experimental de cultivos leñosos del Gobierno de Aragón, en Alcañiz (Teruel). Fuente: imagen propia.

B) Ensayo «Variedades»

Este ensayo, dispuesto de forma aleatoria en la parcela V de 0,13 hectáreas (Figura 3.2), fue plantado en el año 2001, en un marco de plantación 6 x 5 m, con tres

olivos por variedad, con un total de nueve variedades. El sistema de poda fue en vaso. El riego se realizó a manta ya que no disponía de instalación de riego por goteo, cada 15 días, según la evapotranspiración. Se realizó un abonado de fondo con un aporte de 75 kg de abono 15-15-15+2 y vía foliar según necesidades nutricionales. Al igual que en el ensayo de clones, se utilizó herbicida en línea y se mantuvo la cubierta vegetal segada en las calles. Se realizaron los mismos tratamientos fitosanitarios que en el ensayo clonal de Empeltre al estar ubicado en la misma finca y, también en este caso, los olivos presentaron un correcto estado sanitario.

3.1.1.2. Diseño experimental

3.1.1.2.1. Ensayo «Selección clonal de Empeltre»

El origen del ensayo «Selección clonal de Empeltre» fue la preselección clonal para la mejora genética del cultivar Empeltre, con la participación de las seis comunidades autónomas donde tradicionalmente se cultiva esta variedad (Aragón, Cataluña, La Rioja, Navarra, Valencia y las Islas Baleares), durante el periodo 1998-2002. De 158 olivos estudiados inicialmente, 16 fueron preseleccionados como «cabeza de clon» y propagados, por estaquillado semileñoso, y plantados en dos fincas para la realización de ensayos comparativos. Una de estas fincas fue la Finca Experimental de Cultivos Leñosos, en Alcañiz, donde fue plantado el ensayo «Selección clonal de Empeltre» en el año 2004 (Tous *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2011).

Para los estudios desarrollados en esta Tesis Doctoral, se seleccionaron únicamente ocho de los dieciséis clones de Empeltre plantados en la parcela en donde se enclava este ensayo. La razón de esta selección fue el lugar de origen de los clones, es decir, que la procedencia de origen fuera alguna localidad perteneciente a Aragón (Tabla 3.5).

En el estudio inicial de preselección clonal, el clon 5 fue identificado como estándar (Tous *et al.*, 2006) pero, posteriormente, un estudio de ADN por microsatélites no encontró diferencias entre los clones 1, 5 (estándar) y 8 (Romero *et al.*, 2012) en cuanto

a los clones procedentes de Aragón; como resultado, las aceitunas muestreadas de estos tres clones se agruparon en una única muestra que se identificó como clon «Std».

Tabla 3.5. Origen geográfico de los clones seleccionados para su estudio.

Identificación clon	Municipio	Provincia
1	Barbastro	Huesca
2	Barbastro	Huesca
3	Valderrobres	Huesca
4	Caspe	Zaragoza
5	Cretas	Teruel
6	Calanda	Teruel
7	Calaceite	Teruel
8	La Codoñera	Teruel

Fuente: Tous *et al.*, 2006.

La toma de muestras fue realizada desde primeros de octubre hasta mediados de diciembre, en intervalos quincenales, durante los años 2017, 2018 y 2019. Para cada fecha de cosecha, se recolectaron a mano y de forma aleatoria alrededor del árbol, aproximadamente 4 kg de aceitunas por clon, de los clones 2, 3, 4, 6, 7 y Std.

Las muestras de aceitunas se transportaron inmediatamente al Laboratorio Agroambiental para su procesamiento utilizando mallas perforadas, facilitando así la evapotranspiración del fruto, y en neveras refrigeradas, para minimizar los procesos fermentativos que pudieran ocurrir durante el transporte.

3.1.1.2.2. Ensayo «Variedades»

La finalidad del origen de esta plantación en la Finca Experimental de Cultivos Leñosos, en Alcañiz, fue la comparación entre sí de diferentes variedades ubicadas en el mismo suelo y con las mismas condiciones ambientales. La minimización de la variable ambiental, en cuanto al suelo y a la meteorología, en un estudio sobre variedades de olivo ha sido clave en la elección de este ensayo para el estudio propuesto en esta Tesis Doctoral.

Así, se seleccionaron únicamente las tres variedades autóctonas de Aragón de las nueve variedades de diferentes orígenes plantadas en este ensayo. De esta manera, se procedió al muestreo de tres variedades: una principal, como Arbequina, y dos locales

como Royal de Calatayud y Negral de Sabiñán, siendo Arbequina utilizada como control. El procedimiento de muestreo y tratamiento de los frutos hasta su llegada al Laboratorio Agroambiental fue idéntico al realizado en el estudio de clones de Empeltre. Las tres variedades fueron muestreadas (aproximadamente 4 kg de aceitunas por variedad) desde primeros de octubre hasta mediados de diciembre, cada quince días y coincidiendo con los muestreos de los clones de Empeltre, durante los años 2017, 2018 y 2019. El procedimiento del transporte del material hasta el Laboratorio Agroambiental se realizó de la misma manera que en el ensayo de clones al realizarse de forma conjunta.

La identificación genotípica de la variedad Royal de Calatayud fue realizada por el Banco Mundial de Germoplasma del Olivo (BMGO) (Córdoba, España), utilizando la técnica de marcadores moleculares de polimorfismos de nucleótido único (SNPs-EST), para disipar las dudas sobre su correcta identificación y denominación.

3.1.2. Estudio sobre la diferenciación de los aceites de oliva virgen extra de distintas zonas productoras de Aragón a través de su perfil lipídico e identificación de las características específicas para cada zona productora

3.1.2.1. Caracterización agronómica zona de estudio

3.1.2.1.1. Situación geográfica y caracterización de las zonas oleícolas

Aragón, es una región interior situada en el nordeste de la Península Ibérica, compuesta por las provincias Huesca, Zaragoza y Teruel (Figura 3.6).

El olivar aragonés se ha concentrado tradicionalmente en zonas oleícolas situadas en el noreste, en el Somontano de la provincia de Huesca; en el oeste, alrededores de la Sierra del Moncayo de Zaragoza; y en el sureste de Aragón, en la zona del Bajo Aragón de Teruel (Figura 3.6). Estas zonas geográficas a su vez están cultural y geográficamente bien definidas.



Figura 3.6. Localización de Aragón en España. Coordenadas geográficas DMS: 41°0'0"N 1°0'0"O. Localización del olivar en Aragón (1: zona noroeste, «Somontano»; 2: zona oeste, «Moncayo»; 3: zona sureste, «Bajo Aragón») (izquierda). Fuente: elaboración propia.

Los aceites de la zona 1 suelen ser multivarietales, con un alto número de variedades autóctonas minoritarias y locales, cultivadas principalmente en secano. La variedad principal Arbequina puede encontrarse también en esta zona y, en menor medida, la variedad Empeltre. En cambio, en las otras dos zonas predominan las variedades Empeltre y Arbequina, también tradicionalmente en secano.

Por tanto, se ha dado preferencia a los aceites de oliva virgen procedentes de estas zonas oleícolas en cuanto a la selección realizada para la investigación sobre la diferenciación varietal y geográfica de los aceites producidos en Aragón.

3.1.2.1.2. Características climáticas

El clima en Aragón se corresponde, de forma generalizada, con un clima mediterráneo continental caracterizado por inviernos fríos y veranos cálidos y por escasas precipitaciones concentradas principalmente en primavera y otoño. En las comarcas más orientales de Aragón el máximo de precipitaciones se desplaza de la primavera al otoño debido a la influencia mediterránea del clima. La topografía de Aragón ejerce tal influjo sobre la pluviometría y las temperaturas de las distintas regiones que permite establecer una clasificación climática de Aragón en 7 tipos climáticos distintos según los criterios de Köppen (Figura 3.7). Los olivares de Aragón (Figura 3.6) se desarrollan en lugares en donde predominan los tipos climáticos seco

estepario y mediterráneo continental, siendo el sector central de Aragón y los somontanos, respectivamente, las zonas que los representan.

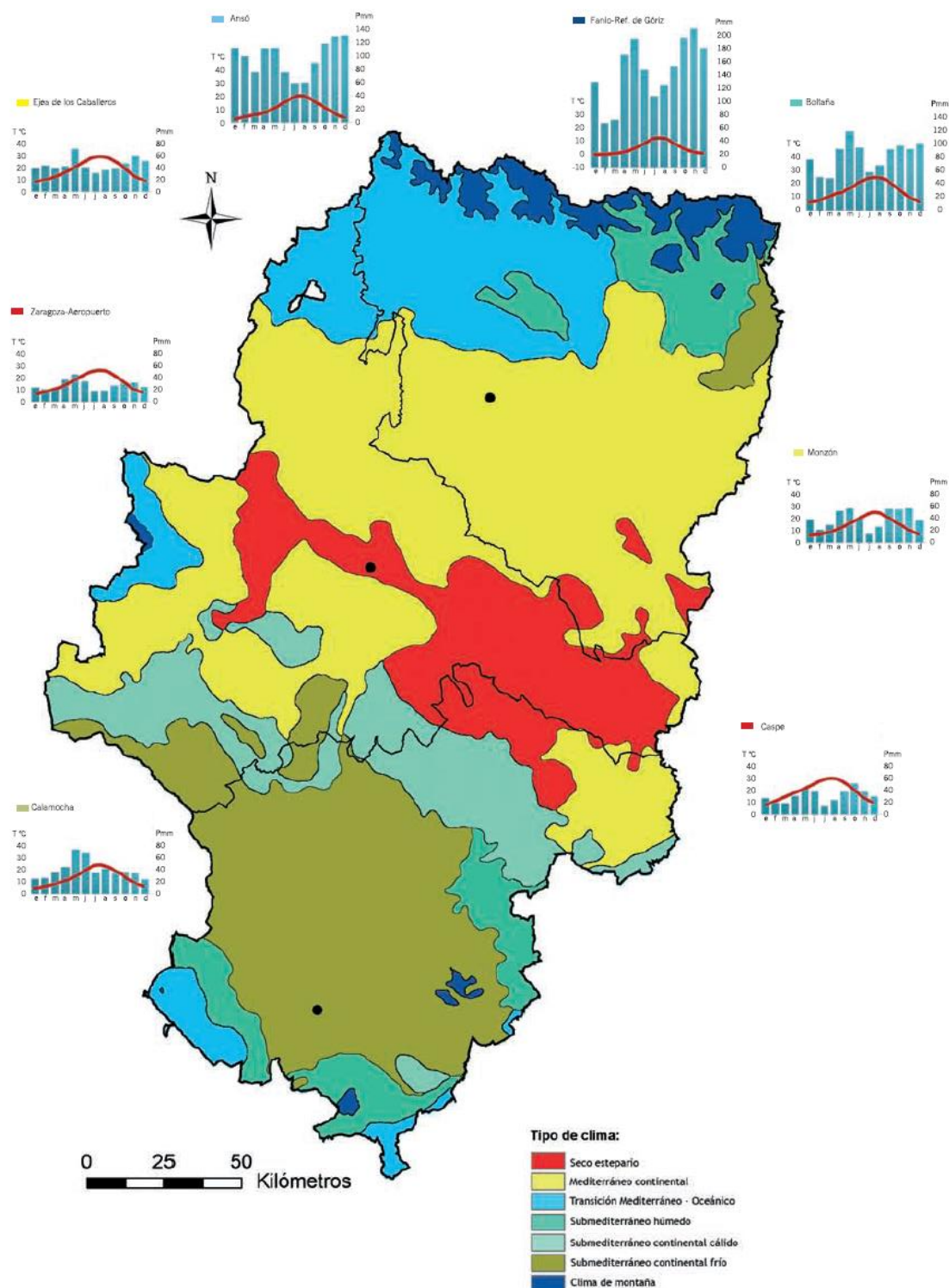


Figura 3.7. Clasificación climática de Aragón según criterios de Köppen. Fuente: López *et al.*, 2007.

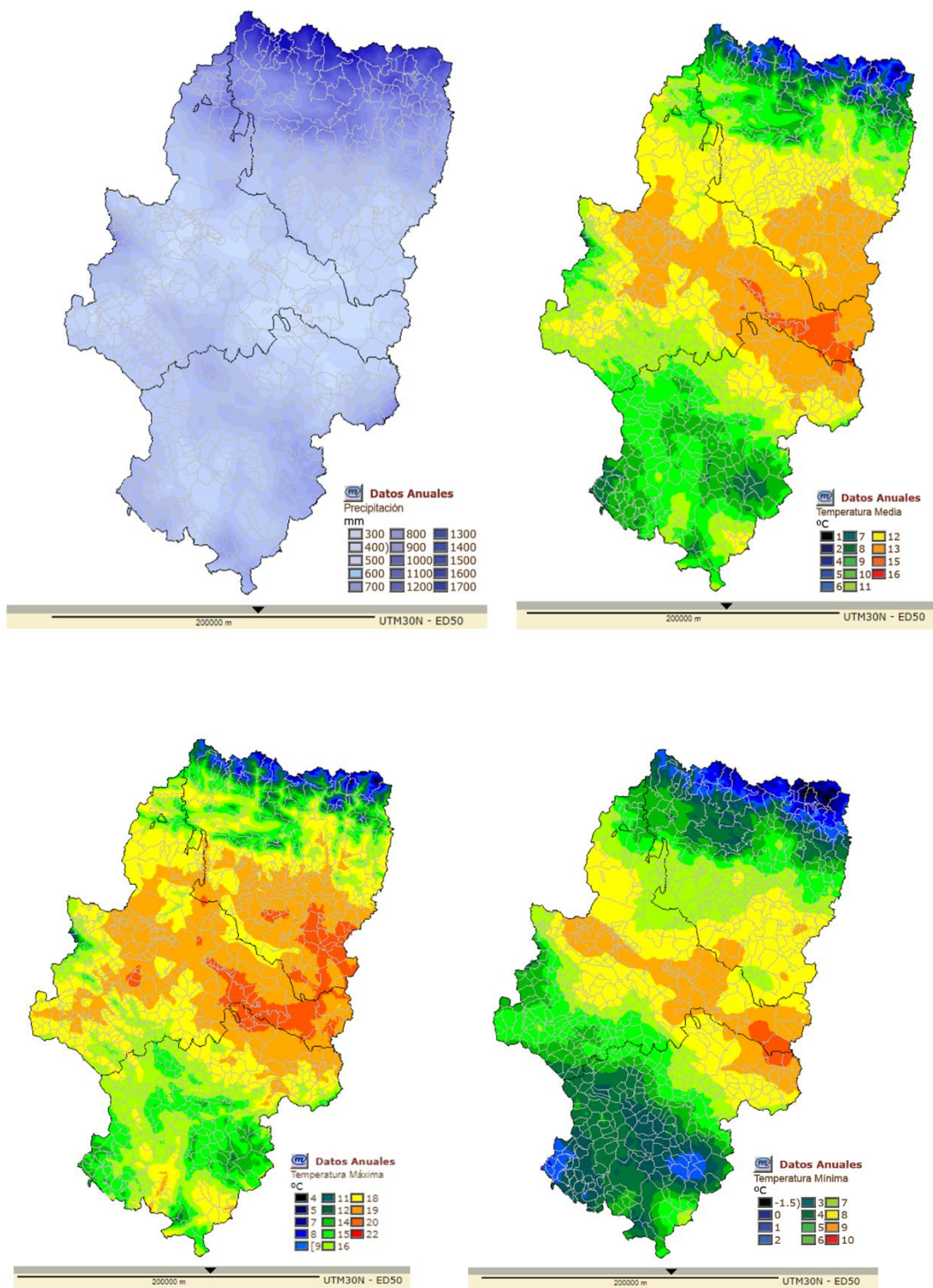


Figura 3.8. Datos climáticos anuales en Aragón, periodo 1971-2000. Precipitaciones (arriba, izquierda) y temperaturas medias (arriba, derecha), máximas (abajo, izquierda) y mínimas (abajo, derecha). Fuente: Atlas climático digital de Aragón. Departamento de Medio Ambiente. Gobierno de Aragón. <https://opengis.grumets.cat/wms/aragon/index.htm>.

En la zona central, situada en la depresión del Ebro, las precipitaciones, además de muy irregulares, son las más bajas de la Península Ibérica, no alcanzando los 300 mm anuales, y las temperaturas son extremas tanto en verano como en invierno (Figura 3.8). El carácter árido y continental por tanto es máximo.

El tipo climático mediterráneo continental se da en los somontanos pirenaico e ibérico, hacia el norte y el sur del sector central de Aragón. Se produce un ligero aumento en el régimen de precipitaciones (450 mm), algo mayor en el somontano pirenaico, aunque éstas siguen siendo muy escasas e irregulares. Las temperaturas en ambos somontanos son algo menos extremas que en la zona central, aunque sigue siendo la época estival muy cálida (Figura 3.8).

3.1.2.1.3. Meteorología

Los datos agrometeorológicos del periodo 2017-2019 utilizados para este estudio proceden de tres estaciones meteorológicas del Sistema de Información Agroclimática para Riego (SIAR) del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación de España (<https://eportal.mapa.gob.es>), situadas en zonas oleícolas representativas del olivar aragonés (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Datos meteorológicos de las zonas noreste, oeste y sureste de Aragón durante los años 2017, 2018 y 2019.

Datos	Noreste			Oeste (Borja*)			Sureste (Alcañiz*)		
	2017	2018	2019	2017	2018	2019	2017	2018	2019
T ^a anual media (°C)	14,4	14,4	14,6	14,7	14,4	14,8	15,6	15,5	16,0
T ^a max. media (°C)	27,6	27,0	27,9	27,5	26,2	28,4	22,8	21,9	23,0
T ^a min. media (°C)	1,5	2,9	2,4	2,3	3,1	2,3	8,9	9,7	9,3
Precipitaciones tot. (mm)	473	699	442	332	546	365	223	508	216
Altitud (m)	341			448			381		

*Los datos se refieren a las localidades Barbastro, Borja, Alcañiz, principales ciudades en las zonas oleícolas estudiadas.

3.1.2.1.4. Descripción edafológica

El olivo es una especie resistente que se adapta a diversas condiciones del suelo, como la escasez de agua, la pobreza de nutrientes, la acidez moderada, la alcalinidad y

cierto grado de salinidad. Su distribución está más determinada por factores climáticos que por condicionantes edáficos, pero es el conjunto del medio físico, básicamente climatología y edafología, el que determina la productividad del olivar en las diferentes regiones olivareras.

En Aragón, siguiendo la Base de Referencia Mundial (WRB) (IUSS, 2015), la mayor parte del olivo se encuentra, sobre todo, en Regosoles (a menudo en bancales), Cambisoles y Calcisoles, aunque también sobre Gipsisoles (Badía *et al.*, 2021). En esos grupos de suelos se encuentra a menudo limitaciones de agua o de nutrientes. Donde es capaz de otorgar las más altas producciones es en los más escasos Fluvisoles, que son fértiles y húmedos.

3.1.2.2. Diseño experimental

Las muestras de aceites de oliva virgen que se utilizaron en el estudio fueron suministradas al Laboratorio Agroambiental del Gobierno de Aragón, para su análisis fisicoquímico, por almazaras y cooperativas agrícolas de Aragón. De todas las muestras de aceites recibidas, se seleccionaron en base a su calidad fisicoquímica determinada (AOVE) y en base, según la documentación aportada, a su variedad (autóctona de Aragón) y zona de procedencia (Figura 3.6). Además, el ensayo se realizó únicamente con los aceites producidos durante las campañas oleícolas 2017/18, 2018/19 y 2019/20. A lo largo del estudio y durante la redacción de esta Tesis Doctoral se ha mantenido la confidencialidad de los datos suministrados por los clientes al Laboratorio Agroambiental.

Teniendo en cuenta todo ello, 260 muestras de aceites de oliva virgen extra producidos en las tres zonas oleícolas tradicionales de Aragón y durante tres campañas consecutivas fueron seleccionadas para el estudio de diferenciación varietal y geográfica basada en parámetros físico-químicos. En cuanto a las variedades seleccionadas, se eligieron Empeltre y Arbequina, como variedades principales, y Royal de Calatayud, Royeta de Asqué y Alquezrana como variedades locales. Muestras de aceites coupage de diferentes variedades de aceitunas, característicos de las zonas de producción,

también se incluyeron en el estudio. Así, el conjunto de muestras de aceite quedó distribuido como se refleja en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7. Muestras de aceite y variable de estudio.

Variables		Aceites
Zona geográfica producción	Noreste	87
	Oeste	74
	Sureste	99
Campaña oleícola de producción	2017/18	83
	2018/19	94
	2019/20	83
Variedad	Arbequina	97
	Empeltre	115
	Royal de Calatayud	8
	Royeta de Asqué	7
	Alquezrana	5
	Coupage	28

3.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.2.1. Determinaciones en la aceituna

Las aceitunas recolectadas en la finca experimental fueron trasladadas inmediatamente al Laboratorio Agroambiental para proceder, en el menor tiempo posible, a la realización de las determinaciones en el fruto para su caracterización y a la extracción del aceite de oliva virgen.

3.2.1.1. Peso de la aceituna

Una vez homogeneizada la muestra de aceitunas recolectada, se tomaron 100 frutos de forma aleatoria y se pesaron en un granatario. El peso medio del fruto se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Peso medio del fruto (g)} = \frac{P}{100} \quad \text{Ecuación 3.1.}$$

siendo P el peso total de los 100 frutos en gramos.

3.2.1.2. Índice de madurez

El índice de madurez (IM) se determinó según la metodología descrita por Hermoso *et al.* (1991). El procedimiento está basado en la evaluación y clasificación de la pigmentación del epicarpio-piel y del mesocarpio-pulpa de la aceituna (Figura 3.9) en ocho categorías como se indica en la Tabla 3.8.

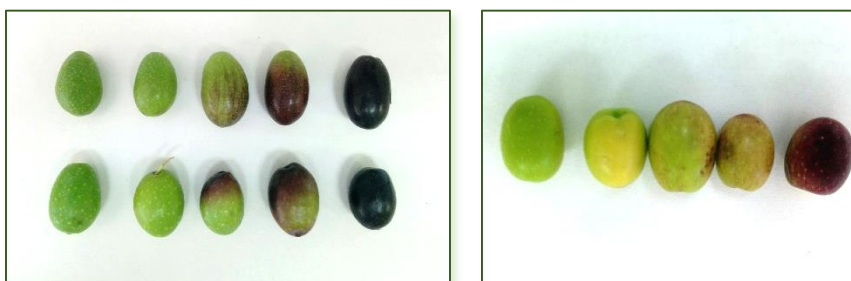


Figura 3.9. Pigmentación del epicarpio en distintos estadios de maduración en la variedad Empeltre (izquierda) y en la variedad Royal de Calatayud (derecha). Fuente: imagen propia.

Tabla 3.8. Categorías de pigmentación piel/pulpa de la aceituna.

Categoría	Pigmentación
0	Piel verde intenso
1	Piel verde amarillento
2	Piel verde con manchas rojizas en menos de la mitad del fruto. Inicio de envero
3	Piel rojiza o morada en más de la mitad del fruto. Final de envero
4	Piel negra y pulpa blanca
5	Piel negra y pulpa morada sin llegar a la mitad de la pulpa
6	Piel negra y pulpa morada sin llegar al hueso
7	Piel negra y pulpa morada totalmente hasta el hueso

Fuente: Hermoso *et al.* (1991).

Para su cálculo se tomaron aleatoriamente 100 frutos del conjunto de la muestra, se clasificaron según la evaluación de la pigmentación y se aplicó la fórmula siguiente:

$$IM = \frac{A \cdot 0 + B \cdot 1 + C \cdot 2 + D \cdot 3 + E \cdot 4 + F \cdot 5 + G \cdot 6 + H \cdot 7}{100} \quad \text{Ecuación 3.2.}$$

siendo A, B, C, D, E, F, G y H el número de frutos clasificados en las categorías 0 a 7 respectivamente.

3.2.1.3. Rendimiento graso

El rendimiento graso sobre materia natural (GSM), o contenido total de aceite, el rendimiento graso sobre materia seca (GSS) y el contenido en humedad (HUM) de las muestras de aceitunas se obtuvieron utilizando un analizador de infrarrojo cercano (NIR) (FoodScan Lab, Type 78800, Foss, Reino Unido) (Figura 3.10).

**Figura 3.10.** Analizador NIR de pasta de aceituna. Fuente: imagen propia.

La pasta de aceituna molida se depositó, con la ayuda de una espátula, sobre un disco de material transparente el cual permite la transmisión de los rayos infrarrojos a través de la muestra. Después, se introdujo en el analizador NIR (Figura 3.10). El equipo suministró directamente los rendimientos, expresados en porcentaje, de grasa sobre materia natural (GSM), grasa sobre materia seca (GSS) y de humedad (HUM).

La determinación del rendimiento graso se realizó por triplicado para cada muestra. Se tomó como resultado la media aritmética de las tres medidas para cada parámetro analizado.

3.2.1.4. Extracción de aceite de oliva virgen. Rendimiento industrial.

El aceite de oliva virgen se obtuvo mediante el sistema Abencor® (MC2, Ingeniería y Sistemas, S.L., Sevilla) (Figura 3.11) a partir de las muestras de aceituna recogidas tras los muestreos realizados en la finca experimental de Alcañiz. Este sistema reproduce, a escala de laboratorio, el proceso industrial de obtención de aceite de oliva virgen, siguiendo las mismas fases de molienda, batido, centrifugación y decantación.



Figura 3.11. Sistema Abencor®. Fuente: imagen propia.

El procedimiento utilizado fue el descrito por Martínez *et al.* (1975), con algunas modificaciones y sin añadir agua ni otros aditivos durante el proceso. Las aceitunas se molieron a 3.000 rpm mediante un molino de martillo de acero inoxidable con una criba de 3 mm. La pasta resultante se batió en una termobatidora a 28-30 °C durante 30 minutos. Posteriormente, la pasta se centrifugó mediante una centrifuga vertical tipo

cesta, a una velocidad de giro de 3.500 rpm y durante 1 minuto. Finalizada la centrifugación, la fase líquida se recogió, a través de un orificio de la parte inferior de la centrífuga, en una probeta graduada. Mientras, el residuo sólido quedó adherido a las paredes de la centrifuga. Tras un tiempo de espera, y una vez separado por decantación el aceite mientras permanecía en la probeta, se procedió a la lectura y registro del volumen de aceite (Figura 3.12).

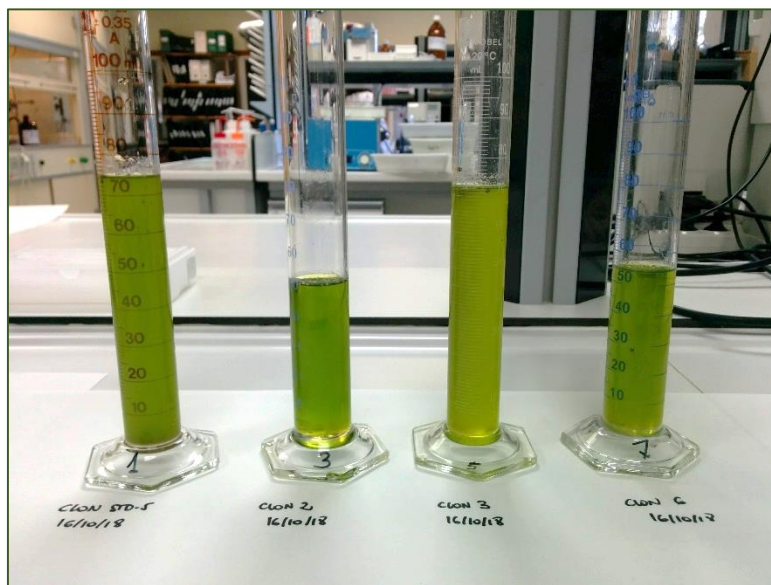


Figura 3.12. Aceite de oliva virgen obtenido mediante Abencor® de la variedad Empeltre. Campaña 18/19. Fuente: imagen propia.

El rendimiento industrial Abencor® se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento industrial Abencor® (\%)} = \frac{\rho \cdot V}{P} \quad \text{Ecuación 3.3.}$$

siendo,

ρ : densidad del aceite de oliva a 20 °C (0,915 g/ml).

V: volumen de aceite obtenido (ml).

P: peso de pasta de aceituna utilizada (g).

El aceite obtenido, después de decantarlo de la probeta, se filtró a través de filtros de celulosa y se almacenó en botellas de vidrio ámbar, en atmósfera de nitrógeno, a -20 °C hasta su análisis.

3.2.1.5. Extractabilidad

La extractabilidad se calculó como el porcentaje de aceite extraído mediante el sistema Abencor® respecto del aceite total contenido en la pasta y analizado mediante NIR (GSM).

$$\text{Extractabilidad (\%)} = \frac{\text{Rendimiento Abencor}}{\text{GSM}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.4.}$$

3.2.2. Determinaciones en el aceite de oliva virgen

Las determinaciones en el aceite se realizaron en el Laboratorio Agroambiental del Gobierno de Aragón, laboratorio reconocido por el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) para el control oficial de aceites de oliva y por el Consejo Oleícola Internacional (COI). Se siguieron los métodos de análisis validados por el Laboratorio Agroambiental y acreditados por la Entidad Nacional de Acreditación (ENAC) según la UNE-EN ISO/IEC 17025, de requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración (ISO, 2017). Además de incorporar controles de calidad internos que verifican el correcto desarrollo de los métodos de análisis, los resultados emitidos estaban asociados a una incertidumbre la cual incluía las desviaciones en la exactitud y precisión del método.

Todas las determinaciones se realizaron por duplicado. De esta manera, la media aritmética de los resultados de dos alícuotas distintas procedentes de la misma muestra, realizadas en condiciones de repetibilidad, fue tomada como resultado final para cada parámetro.

3.2.2.1. Características de calidad fisicoquímica

Para la determinación de los criterios de calidad del aceite de oliva virgen, se siguieron métodos de análisis del Laboratorio Agroambiental que incorporan la metodología descrita en el Reglamento (CEE) nº 2568/91, y sus posteriores modificaciones, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis (CEE, 1991), vigente en el momento de estudio.

3.2.2.1.1. *Acidez o ácidos grasos libres*

La acidez de un aceite es la expresión del contenido en ácidos grasos libres presentes en el aceite, en porcentaje en peso de ácido oleico, como ácido graso mayoritario en el aceite de oliva.

El método oficial utilizado para su determinación fue el descrito en el anexo II del Reglamento (CEE) nº 2568/91 y sus posteriores modificaciones (CEE, 1991; UE, 2016a).

Se pesaron, de forma aproximada, 10 g de aceite en un matraz Erlenmeyer. A continuación, la muestra se disolvió en aproximadamente 50 ml de una solución neutralizada de éter dietílico y etanol (1:1, v/v) y se procedió a su valoración, utilizando una solución etanólica valorada de hidróxido potásico 0,1 mol/l, con fenolftaleína como indicador. La concentración exacta de la solución de hidróxido potásico se confirmó mediante valoración con hidrógeno ftalato de potasio como patrón primario.

La acidez, expresada en porcentaje de ácido oleico, se calculó mediante la fórmula siguiente:

$$\text{Acidez (\% ac. oleico)} = \frac{V \cdot c \cdot M}{m} \quad \text{Ecuación 3.5.}$$

siendo,

- V: volumen (ml) de la solución valorada de hidróxido de potasio utilizada.
- c: concentración (mol/l) de la solución de hidróxido de potasio utilizada.
- M: masa molar del ácido en que se expresa el resultado, ácido oleico (282 g/mol).
- m: peso (g) de la alícuota de la muestra de aceite.

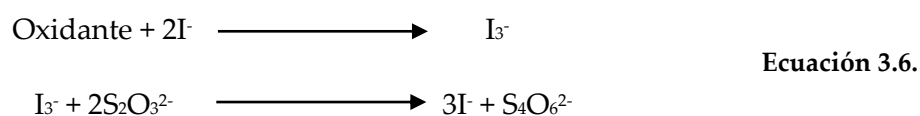
3.2.2.1.2. *Índice de peróxidos*

El índice de peróxidos es la cantidad de peróxidos presentes en la muestra, expresada en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de aceite, que causan la

oxidación del yoduro potásico en las condiciones de trabajo descritas a continuación. Indica el grado de oxidación primaria de un aceite.

Para esta determinación se utilizó el método oficial descrito en el anexo III del Reglamento (CEE) nº 2568/91 y sus posteriores modificaciones (CEE, 1991; UE, 2016b).

La muestra de aceite, disuelta en ácido acético y cloroformo, se trata con una solución de yoduro potásico. El yodo liberado (en forma de triyoduro en el medio) por los peróxidos presentes en el aceite se valora con solución valorada de tiosulfato sódico según las reacciones globales siguientes:



De forma previa a la pesada del aceite, se pasó una corriente de nitrógeno en un matraz Erlenmeyer de 250 ml con cuello esmerilado. Una vez asegurada la atmosfera inerte en el matraz, se tapó de forma inmediata con un tapón de vidrio. En ese mismo matraz se pesó, de forma rápida y aproximada, entre 2,0 y 5,0 g de aceite, tapando el matraz de nuevo hasta su análisis. La muestra de aceite se disolvió, mediante agitación, en primer lugar, en 10 ml de cloroformo y después en 15 ml de ácido acético glacial, intentando mantener en todo momento la atmosfera de nitrógeno. Se añadió 1 ml de solución acuosa saturada de yoduro potásico, se agitó durante 1 min y se mantuvo durante 5 minutos en oscuridad. Tras añadir 75 ml de agua destilada, el yodo liberado se valoró con una solución acuosa valorada de tiosulfato sódico 0,01 mol/l, utilizando almidón como indicador. La concentración exacta de la solución tiosulfato sódico se confirmó mediante la valoración con yodato potásico como patrón primario.

El índice de peróxidos del aceite se calculó a partir de la expresión:

$$\text{Índice de peróxidos (meqO}_2\text{/kg aceite)} = \frac{V \cdot c \cdot 1000}{m} \quad \text{Ecuación 3.7.}$$

siendo,

- V : volumen (ml) de la solución valorada de tiosulfato de sodio.
 c: concentración (mol/l) de la solución de tiosulfato de sodio.
 m : peso (g) de la alícuota de la muestra de aceite.

3.2.2.1.3. Coeficientes de extinción en el ultravioleta (K_{232} , K_{270} , ΔK)

El análisis espectrofotométrico en el ultravioleta (UV) informa, al igual que el índice de peróxidos, sobre el estado de oxidación y, por tanto, de conservación del aceite. La absorción de radiación ultravioleta que presenta el aceite, a las longitudes de 232 nm y 270 nm, se debe a dienos y trienos conjugados (dobles y triples enlaces) y compuestos carbonílicos que se generan durante la oxidación de los aceites. Los valores de estas absorciones se expresan en extinciones específicas $E_{1\text{ cm}}^{1\%}$ (extinción de una solución de la materia grasa al 1% en el disolvente determinado, en un espesor de 1 cm) que se expresará convencionalmente como K (también denominado coeficiente de extinción).

Los coeficientes de absorción al UV de los aceites se determinaron según el método oficial descrito en el anexo IX del Reglamento (CEE) nº 2568/91 y sus posteriores modificaciones (CEE, 1991; UE, 2015) utilizando un espectrofotómetro de Ultravioleta-Visible con bomba peristáltica (Specord 205, Analytikjena, Alemania).

Para la determinación del coeficiente de absorción K_{270} y ΔK , se pesó aproximadamente 0,6 g de la muestra de aceite en un matraz aforado de 25 ml disolviéndola posteriormente con ciclohexano hasta su enrase. Después, se tomó 1 ml de esta disolución mediante una pipeta y se diluyó con ciclohexano en un matraz aforado de 10 ml hasta su enrase. Esta segunda disolución se utilizó para la determinación del coeficiente K_{232} . En ambas determinaciones se utilizó ciclohexano como referencia para la medición de la absorbancia.

Los coeficientes de absorción K a una longitud de onda (λ) se calcularon a partir de la siguiente ecuación:

$$K_{\lambda} = \frac{E_{\lambda}}{c \times e} \quad \text{Ecuación 3.8.}$$

siendo,

K_{λ} : extinción específica a la longitud de onda λ (232 nm; 270 nm).

E_{λ} : extinción medida a la longitud de onda λ (232 nm; 270 nm).

c : concentración de la disolución (g/100 ml).

e : espesor de la cubeta en cm.

Por otro lado, la variación de la extinción, ΔK , en valor absoluto se calculó como:

$$\Delta K = \left| \frac{E_{\lambda} - \left(\frac{E_{\lambda-4} + E_{\lambda+4}}{2} \right)}{c \cdot e} \right| \quad \text{Ecuación 3.9.}$$

siendo,

ΔK : variación de la absorción de la extinción específica.

E_{λ} : absorbancia medida a la longitud de onda λ de máxima absorción (ciclohexano, 270 nm).

c : concentración de la disolución (g/100 ml).

e : espesor de la cubeta en cm.

3.2.2.2. Características de pureza

Al igual que para las determinaciones englobadas como criterios de calidad (CEE, 1991), en este apartado se han utilizado métodos de análisis validados por el Laboratorio Agroambiental que incorporan la metodología descrita en la legislación vigente en el momento del estudio (CEE, 1991).

3.2.2.2.1. Composición de ácidos grasos

El perfil de ácidos grasos que forman parte de los triacilglicerol (TAGs), compuestos mayoritarios en el aceite de oliva virgen, se determinó siguiendo el procedimiento indicado en el anexo X del Reglamento (CEE) nº 2568/91 y sus posteriores modificaciones (CEE, 1991; UE, 2015). Este método permite determinar los ésteres metílicos de ácidos grasos desde 12 átomos de carbono hasta 24 átomos de carbono, incluidos los ésteres metílicos de ácidos grasos saturados, cis y trans monoinsaturados y cis y trans poliinsaturados.

El método consiste en una transmetilación previa de los ácidos grasos que conforman los triglicéridos en el aceite y posterior cromatografía gaseosa de los ésteres metilados de los ácidos grasos formados.

Se pesó, aproximadamente, 0,1 g de la muestra de aceite en un tubo de vidrio con tapón de rosca y se añadió 2 ml de n-heptano agitándose en un vortex durante 30 segundos. Para realizar la transmetilación, se añadió 0,2 ml de hidróxido potásico 2 mol/l en metanol y se agitó nuevamente en un vortex durante otros 30 segundos. Se dejó reposar hasta que la solución que contenía los ésteres metílicos de los ácidos grasos quedó nítida lo que indica la completa separación de la glicerina formada.

La solución de ésteres metílicos de ácidos grasos obtenida se analizó mediante cromatografía de gases con detección de ionización de llama (GC-FID). Para ello, se inyectó 1 μ l de la solución en un cromatógrafo de gases (7890N, Agilent Technologies, Estados Unidos) equipado con un inyector split/splitless y un detector de ionización de llama (FID) (Figura 3.13) y una columna SP-2380 de 60 m de longitud, 0,25 mm diámetro interno y 0,2 μ m de espesor de fase estacionaria (Supelco, Bellefonte, PA, USA). El programa de temperaturas utilizado en el horno fue: 170 °C al inicio y, durante 30 minutos, una rampa de calentamiento de 5 °C/min hasta alcanzar los 200 °C, manteniéndose esa temperatura hasta la finalización de la cromatografía. El gas portador que se empleó fue helio con un flujo de 1,2 ml/min. Durante el análisis, las temperaturas de inyección y de detección fueron 250 °C y 260 °C respectivamente.



Figura 3.13. Cromatógrafo de gases con detección de ionización de llama. Fuente: imagen propia.

La identificación individual de los ácidos grasos en el cromatograma obtenido (Figura 3.14) y el control de calidad del análisis se realizó en cada tanda de trabajo mediante un material de referencia procedente del Consejo Oleícola Internacional (COI).

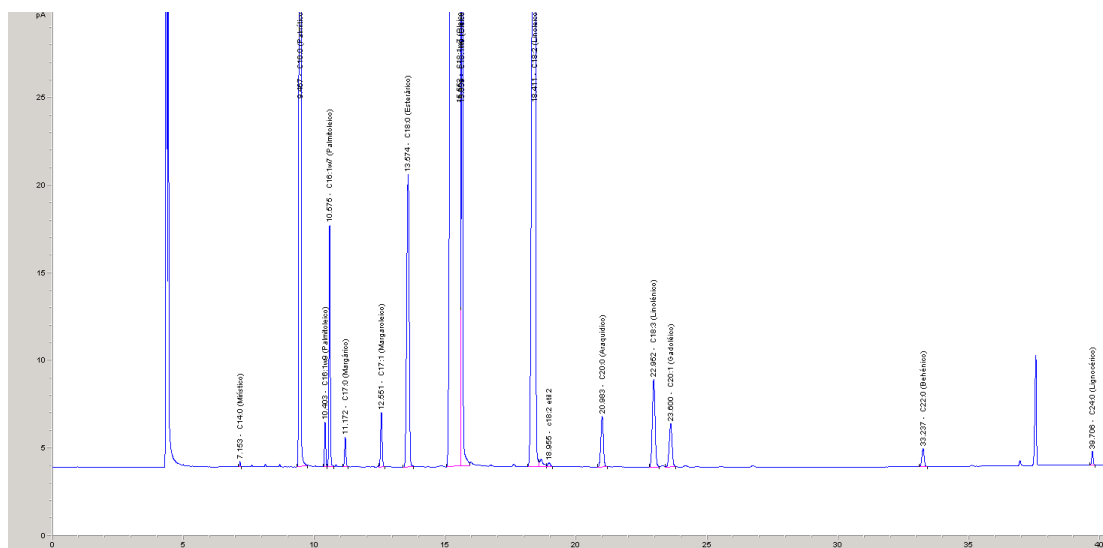


Figura 3.14. Perfil cromatográfico de la composición de ácidos grasos en un AOVE de Empeltre. Fuente: imagen propia.

El contenido de cada uno de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se obtuvo según el método de normalización interna, al considerar que el factor de respuesta de todos los componentes es el mismo, como porcentaje del área de cada ácido graso respecto del total, aplicándose la siguiente fórmula:

$$w_i = \frac{A_i}{\sum A} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 3.10.}$$

siendo,

- w_i : contenido del éster metílico de ácido graso i (%).
- A_i : área del pico de cada éster metílico de ácido graso i .
- $\sum A_i$: suma de las áreas de todos los picos de ésteres metílicos de ácidos grasos identificados en el cromatograma.

Los ácidos grasos identificados y cuantificados en este estudio fueron: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), heptadecanoico (C17:0), heptadecenoico

(C17:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3), araquídico (C20:0), eicosenoico (C20:1), behénico (C22:0) y lignocérico (C24:0).

3.2.2.2.2. *Composición de esteroides y contenido en eritrodiol y uvaol*

El estudio del perfil de esteroides es de gran interés ya que es muy característico para cada tipo de aceite vegetal y, en el caso de los aceites de oliva, para cada variedad. Por ello, se utiliza para demostrar la autenticidad de los aceites de oliva ante posibles casos de adulteración o fraude.

La determinación de la composición individual y contenido total de esteroides y del contenido de dialcoholes triterpénicos (eritrodiol y uvaol) de los aceites se realizó siguiendo el procedimiento indicado en el método oficial publicado en el anexo XIX del Reglamento (CEE) nº 2568/91 y sus posteriores modificaciones (CEE, 1991; UE, 2019). El método consiste en la saponificación previa de la materia grasa con una solución etanólica de hidróxido potásico y posterior extracción del insaponificable con éter etílico. Por cromatografía en placa de gel de sílice básica se separa la fracción esterólica y, tras su derivatización en trimetilsililésteres, se analiza mediante cromatografía de gases.

Se pesó, aproximadamente, 5 g de la muestra de aceite en un matraz de 250 ml el cual contenía previamente α -colestanol (0,5 ml; 0,2%) como patrón interno. Para la saponificación de la muestra, se añadió 50 ml de una solución etanólica de hidróxido de potasio 2 mol/l y se mantuvo a reflujo durante 40 min. Una vez enfriado el contenido del matraz se trasvasó a un embudo de decantación de 250 ml y se procedió a realizar la extracción del insaponificable utilizando distintas fracciones de éter dietílico (80 ml, 70 ml y 60 ml). Las fracciones de éter recogidas se lavaron hasta su neutralización con 50 ml de hidróxido potásico 0,5 mol/l y agua destilada. Tras la eliminación del agua de lavado, la solución se filtró con sulfato de sodio anhidro y se evaporó el disolvente con un rotavapor. El insaponificable obtenido se redisolvió con 2 ml de acetato de etilo y, utilizando una microjeringa, se depositó 0,1 ml en una placa cromatográfica de gel de sílice basificada previamente con una solución etanólica 0,2 mol/l de hidróxido de potásico. La placa cromatográfica se dejó en una cubeta de desarrollo con una mezcla de elución 70:30 de n-hexano/éter dietílico, durante 1 hora. Finalizada la cromatografía, se

pulverizó sobre la placa cromatográfica una solución de 2,7-diclorofluoresceína como revelador para poder identificar la fracción esterólica (Figura 3.15). Tras su revelado, se procedió a rascar, con la ayuda de una espátula, el área de la banda de esteroides y dialcoholes triterpénicos identificada. El residuo obtenido se introdujo en una placa filtrante para proceder a su lavado con tres fracciones de 15 ml de acetato de etilo cada una. El filtrado recogido se evaporó en un rotavapor.

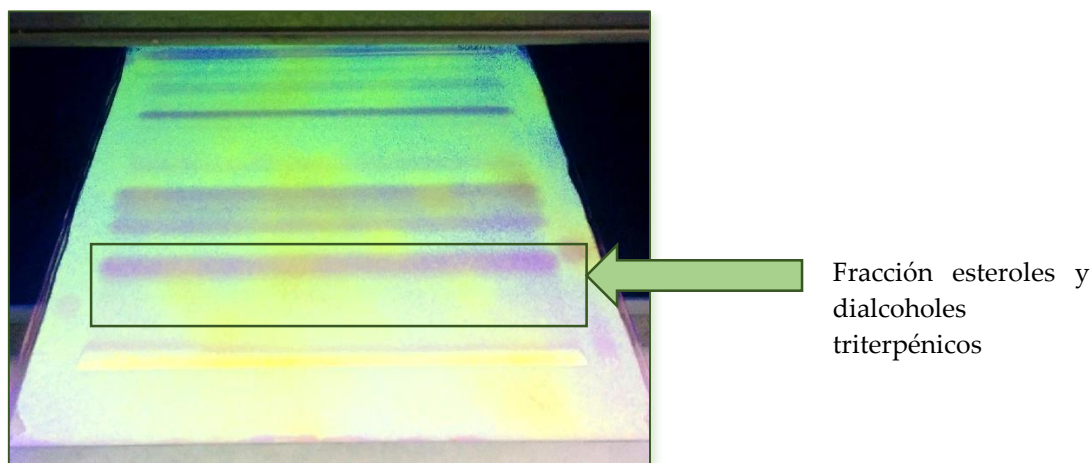


Figura 3.15. Placa cromatográfica tras elución del insaponificable de una muestra de AOVE de la variedad Empeltre, revelada con 2,7-diclorofluoresceína bajo UV. Fuente: imagen propia.

Para poder analizar los esteroides y dialcoholes triterpénicos extraídos de la muestra mediante cromatografía de gases se transformaron en éteres de trimetilsililo añadiendo 0,2 ml del reactivo de sililación (piridina/hexametildisilazano/trimetilclorosilano; 9:3:1, v/v/v) al residuo obtenido tras evaporación. Se agitó suavemente la mezcla y tras 30 minutos de reposo la solución estuvo lista para su análisis por cromatografía.

Se inyectó 1 μ l de la solución de la muestra en un cromatógrafo de gases (6890N, Agilent Technologies, Estados Unidos) equipado con un inyector split/splitless, y un detector de ionización de llama (FID) (Figura 3.13) y una columna CP-Sil 8CB de 25 m de longitud, 0,25 mm diámetro interno y 0,25 μ m de espesor de fase estacionaria (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Se utilizó un programa de temperaturas isoterma de 260 °C. El gas portador que se empleó fue helio con un flujo de 1,0 ml/min. Durante el análisis, las temperaturas de inyección y de detección fueron 300 °C.

La identificación individual de los esteroides y de eritrodil y uvaol en el cromatograma obtenido (Figura 3.16) se realizó a partir de los tiempos de retención mediante un material de referencia procedente del Consejo Oleícola Internacional (COI) analizado en las mismas condiciones cromatográficas.

La elución de los esteroides y dialcoholes triperpénicos, en las condiciones cromatográficas indicadas, fue en el siguiente orden: colesterol, brasicasterol, 24-metilcolesterol, campesterol, campestanol, estigmasterol, Δ^7 -campesterol, $\Delta^5,23$ -estigmastadienol, clerosterol, β -sitosterol, sitostanol, Δ^5 -avenasterol, $\Delta^5,24$ -estigmastadienol, Δ^7 -estigmasterol y Δ^7 -avenasterol, como esteroides, y eritrodil y uvaol, como dialcoholes triperpénicos (Figura 3.16).

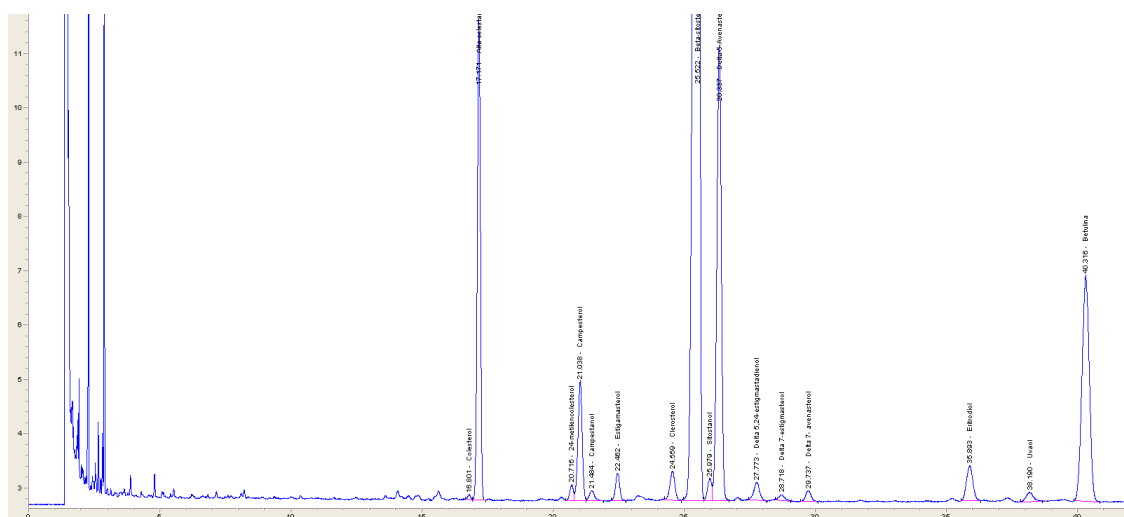


Figura 3.16. Cromatograma de esteroides y dialcoholes triperpénicos en un AOVE. Fuente: imagen propia.

El parámetro β -sitosterol aparente se calculó como la suma de los esteroides: $\Delta^5,23$ -estigmastadienol, clerosterol, β -sitosterol, sitostanol, Δ^5 -avenasterol y $\Delta^5,24$ -estigmastadienol.

Para cuantificar el contenido total de esteroides, primero se calculó la concentración de cada esteroide individual en la alícuota de la muestra en mg/kg (ecuación 3.11) y seguidamente se calculó el total teniendo en cuenta a todos los esteroides identificados y descritos en el párrafo anterior. El factor de respuesta para el α -colestanol se consideró 1.

$$\text{Esterol}_i = \frac{A_i \cdot m_{IS} \cdot 1000}{A_{IS} \cdot m} \quad \text{Ecuación 3.11.}$$

donde,

- A_i : área del pico para el esterol i .
- A_{IS} : área del pico del patrón interno (α -colestanol).
- m_{IS} : peso (mg) del patrón interno añadido (α -colestanol).
- m : peso de la alícuota de la muestra (g).

Por otro lado, el contenido relativo individual de cada esterol (%) se calculó se mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Esterol}_i = \frac{A_i}{\sum A} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 3.12.}$$

donde,

- A_i : área del pico para el esterol i .
- $\sum A$: suma de las áreas de los picos de todos los esteroides identificados.

El contenido relativo de los dialcoholes triterpénicos, eritrodiol y uvaol se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Eritrodiol} + \text{uvaol} = \frac{Er + Uv}{Er + Uv + \sum A} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.13.}$$

donde,

- Er : área del pico de eritrodiol.
- Uv : área del pico de uvaol.
- $\sum A$: suma de las áreas de los picos de todos los esteroides identificados.

3.2.2.3. Otras determinaciones

El resto de determinaciones realizadas en el aceite de oliva virgen no estaban recogidas en la legislación europea vigente en el momento del estudio (CEE, 1991) como parte de los criterios que determinaban la calidad y autenticidad de un aceite de oliva virgen.

3.2.2.3.1. Estabilidad oxidativa

La medida de la estabilidad o resistencia de los aceites frente a la oxidación o enranciamiento se realizó mediante el método Rancimat según la norma ISO 6886 (ISO, 2016). El método consiste en la oxidación acelerada de la muestra de aceite mediante el aumento de su temperatura y el paso a través de ella de un flujo de aire. Durante el proceso se produce la oxidación de los ácidos grasos del aceite, formándose en primer lugar peróxidos como productos de oxidación primarios y, posteriormente, otros productos de oxidación secundaria como ácido acético y ácido fórmico, ambos ácidos orgánicos volátiles. Estos productos de degradación son arrastrados por el flujo de aire desde el recipiente de la muestra a otro recipiente, aumentando la conductividad del agua destilada que contiene. Una celda de conductividad registra de manera continua la conductividad del agua frente al tiempo dando lugar a unas curvas de oxidación cuyo punto de inflexión, un súbito e intenso aumento de conductividad, es el tiempo de inducción o índice de estabilidad oxidativa (OSI, por sus siglas en inglés), es decir, el tiempo (horas) transcurrido hasta la formación de estos productos de reacción secundarios.

Para su determinación se utilizó un equipo Rancimat (743, Metrohm AG, Suiza) (Figura 3.17).



Figura 3.17. Equipo Rancimat 743 para la medida de la estabilidad oxidativa. Fuente: imagen propia.

El procedimiento consiste en pesar, de forma aproximada, 3 g de la muestra de aceite en un tubo de reacción y someter la alícuota a una temperatura de 120 °C y un flujo de aire de 20 l/h (Figura 3.18).

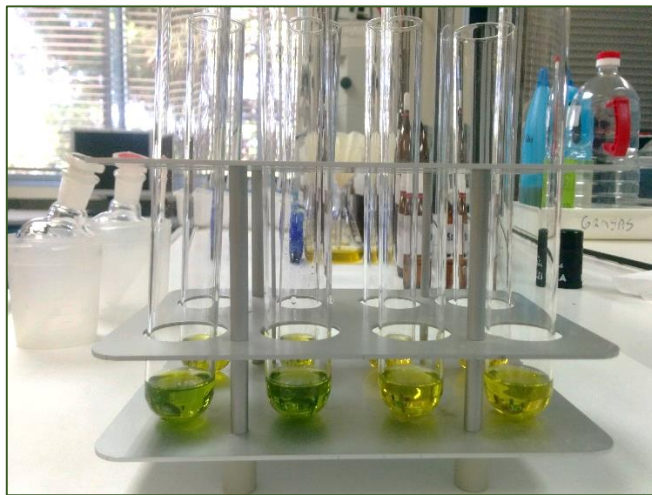


Figura 3.18. Tubos de reacción con AOV para analizar la estabilidad oxidativa. Fuente: imagen propia.

3.2.2.3.2. *Fenoles totales por colorimetría*

La determinación de los compuestos fenólicos totales de las muestras de aceite de oliva virgen se realizó utilizando el método colorimétrico (Vázquez *et al.*, 1973), introduciendo como modificación la utilización del reactivo Folin-Ciocalteu en lugar de Folin-Denis, como método rápido. Consiste en la previa extracción de la fracción fenólica de la muestra de aceite mediante extracción líquido/líquido con una mezcla hidroalcohólica y, tras la reacción de los fenoles con el reactivo Folin-Ciocalteu, determinación colorimétrica utilizando ácido cafeico como patrón. La reacción colorimétrica está basada en la reducción, en medio alcalino, de la mezcla de ácidos fosfowolfrámico y fosfomolibdico presentes en el reactivo Folin-Ciocalteu por los compuestos fenólicos dando lugar a un cambio de color de la solución de amarillo-verde a azul. La intensidad de la coloración azul de la solución final dependerá de su concentración fenólica.

Para la obtención del extracto fenólico (Figura 3.19), se pesó de forma aproximada 10 g de la muestra de aceite disolviéndose posteriormente en 50 ml de n-hexano para

eliminar la fracción lipídica. La extracción de los fenoles se realizó en un embudo de decantación de 100 ml utilizando para ello tres fracciones, de 20 ml cada una, de una mezcla de metanol/agua 60:40 (v/v), agitando durante 2 minutos en cada extracción. Las fracciones hidroalcohólicas que contenían los compuestos fenólicos se combinaron en un matraz aforado de 100 ml que se enrasó con agua. El extracto fenólico obtenido se dejó reposar durante 24 h a temperatura ambiente, en ausencia de luz.



Figura 3.19. Extracción de la fracción fenólica polar del aceite de oliva virgen. Fuente: imagen propia.

Para la determinación colorimétrica de los fenoles totales, en un matraz aforado de 50 ml se adicionó 35 ml de agua, de 3 a 7 ml del extracto de fenoles (según concentración prevista) y 2,5 ml de reactivo Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Se agitó y tras 3 minutos de reposo, se añadió 5 ml de una solución saturada de hidróxido sódico, enrasando el matraz con agua. Se agitó y se dejó una hora de reposo (Figura 3.20). Simultáneamente, y procediendo con la misma metodología, se preparó un blanco sin adicionar el extracto de fenoles y una recta de calibrado utilizando 7 patrones de ácido cafeico (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en el rango de concentraciones de 0,5 a 10 mg/ml.

Transcurrido el tiempo, se midió la absorbancia a 725 nm del blanco, de los patrones y de las soluciones utilizando un espectrofotómetro de UV-Visible con bomba peristáltica (Specord 205, Analytikjena, Alemania).

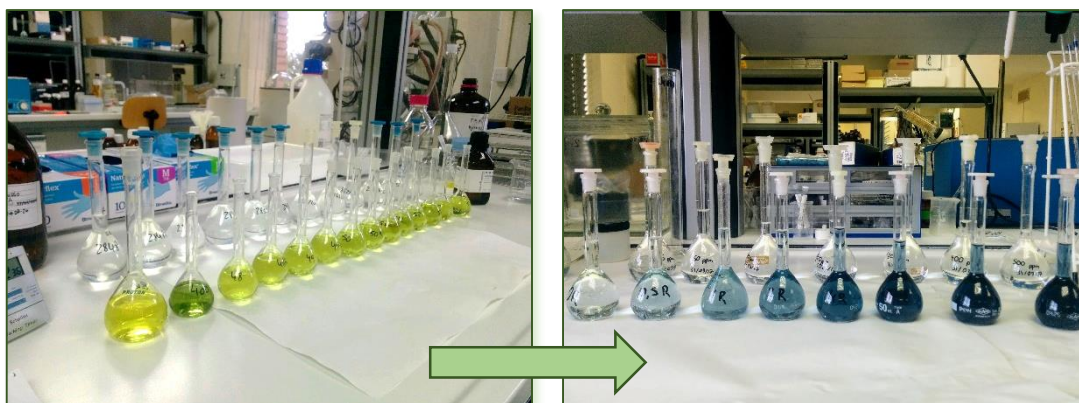


Figura 3.20. Reacción colorimétrica durante el análisis de fenoles totales por colorimetría. Fuente: imagen propia.

La concentración de fenoles totales de las muestras de aceite, expresada como mg de ácido cafeico por kg de aceite, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Fenoles totales} = \frac{\text{Abs}_{725\text{nm}} - a}{b} \times \frac{V}{m} \times 5000 \quad \text{Ecuación 3.14.}$$

siendo,

- $\text{Abs}_{725\text{nm}}$: absorbancia de la solución a 725 nm.
- a: ordenada en el origen de la recta de calibración.
- b: pendiente de la recta de calibración.
- V: volumen pipeteado de la solución de polifenoles (ml).
- m: peso de la alícuota de la muestra (g).
- 5000: factor de conversión según diluciones realizadas durante el desarrollo del procedimiento.

3.2.2.3.3. Fenoles totales por cromatografía

El método utilizado se basa en el análisis cromatográfico mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) de la fracción polar de los compuestos fenólicos extraída antes y después de su hidrólisis ácida. Para ello, se utilizó el método propuesto por Tsimidou *et al.* (2019b) en cuanto a la extracción y cuantificación de los compuestos fenólicos en el aceite mientras que, para su análisis cromatográfico mediante HPLC, se

siguió el método COI/T.20/Doc. No29, Rev.1, propuesto por el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2017).

La hidrólisis ácida de las formas ligadas de hidroxitirosol y tirosol (glucósido de tirosol, formas aldehídicas de aglicona de ligstrosido, forma aldehídica de aglicona de oleuropeína, oleuropeína de aglicona, dialdehídos (carboximetilado y descarboximetilado) de oleuropeína de aglicona y aldehído (descarboximetilado) de oleuropeína de aglicona) da lugar a los compuestos hidroxitirosol y tirosol libres, cuyo contenido puede ser cuantificado mediante calibración externa utilizando patrones comerciales. El contenido total de hidroxitirosol y tirosol se expresó en mg/20 g de aceite tras la corrección de las diferencias de peso molecular entre las formas libres y ligadas de estos dos compuestos.

Para obtener la fracción o extracto polar de los compuestos fenólicos, se pesó aproximadamente 2,0 g de la muestra de aceite en un tubo falcón de plástico de 15 ml, con tapón de rosca. Se añadió 1 ml de metanol/agua 80:20 (v/v) y se agitó durante 30 segundos. Se añadieron otros 5 ml de la misma mezcla hidroalcohólica y se agitó durante 1 minuto. Transcurrido el tiempo, se introdujo en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos controlando que la temperatura del baño no superase los 25 °C. Para clarificar la fracción polar, se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos. Un alícuota del sobrenadante obtenido se filtró a través de un filtro de jeringa de PVDF de 0,45 µm antes de su análisis cromatográfico mediante HPLC.

La hidrólisis ácida de la fracción polar se realizó de la manera siguiente. Se transfirió, por triplicado, una alícuota de 0,2 ml de la fracción polar a un tubo de vidrio de 5 ml, con tapón de rosca. Se añadió 0,2 ml de ácido sulfúrico 1 mol/l, se agitó durante 2 segundos y se incubó en un baño de agua a 80 °C durante 2 horas. Finalizada la incubación, y de forma inmediata, se diluyó cada hidrolizado con 0,2 ml de la mezcla de extracción metanol/agua 80:20 (v/v). Se combinaron los tres hidrolizados obtenidos por cada muestra y la solución resultante se filtró a través de un filtro de jeringa de PVDF de 0,45 µm antes de su análisis cromatográfico mediante HPLC.

Para el análisis cromatográfico, se inyectaron 10 µl de cada una de las fracciones polares obtenidas, con y sin hidrólisis, en un HPLC (1100 Series, Agilent Technologies, EEUU) equipado con un detector de matriz de fotodiodos (DAD) y una columna de fase reversa Symmetry de 250 mm de longitud y 4,6 mm de diámetro, con un tamaño de partícula de 5 µm (Waters Corporation, Milford, MA) (Figura 3.21). La temperatura de la columna fue 30 °C. Como eluyentes de la fase móvil se utilizaron distintas proporciones de 0,2% (v/v) de ácido fosfórico/agua (fase A), metanol (fase B) y acetonitrilo (fase C) según el gradiente ternario de elución (Tabla 3.8), con un flujo de 1 ml/min. La longitud de onda de adquisición fue 280 nm.



Figura 3.21. Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC). Fuente: imagen propia.

Tabla 3.8. Gradiente ternario de elución utilizado para la separación de los compuestos fenólicos.

Tiempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)
0	96	2	2
40	50	25	25
45	40	30	30
60	0	50	50
70	0	50	50
72	96	2	2
82	96	2	2

La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó mediante calibración externa utilizando como patrones comerciales hidroxitirosol ($\geq 98\%$; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) y tirosol ($> 98\%$; Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) en

metanol/agua 50:50 (v/v). Se prepararon sendas curvas de calibración en los rangos de concentración de 0,5 a 100 µg/ml.

La identificación de hidroxitirosol y tirosol se realizó mediante el tiempo de retención y máximo de absorbancia característico de cada uno de ellos.

En cada tanda se realizaron blancos de método (de extracción y de hidrólisis) para asegurar que el sistema estaba libre de cualquier contaminación o efecto de arrastre.

El contenido de fenoles que contenían hidroxitirosol y tirosol en su fórmula, es decir, formas ligadas al hidroxitirosol y tirosol, se obtuvo a partir de los resultados obtenidos del análisis cromatográfico de las fracciones polares antes (formas libres) y después de la hidrólisis (formas hidrolizadas). Se aplicaron las fórmulas siguientes:

$$H_{tir}^{ligado} = 2,2(H_{tir}^{hidrolizado} - H_{tir}^{libre}) \quad \text{Ecuación 3.15.}$$

$$T_{tir}^{ligado} = 2,5(T_{tir}^{hidrolizado} - T_{tir}^{libre}) \quad \text{Ecuación 3.16.}$$

siendo,

H_{tir}^{libre} :	Hidroxitirosol libre.
H_{tir}^{ligado} :	Formas ligadas al hidroxitirosol.
$H_{tir}^{hidrolizado}$:	Formas hidrolizadas de hidroxitirosol.
T_{tir}^{libre} :	Tirosol libre.
T_{tir}^{ligado} :	Formas ligadas al tirosol.
$T_{tir}^{hidrolizado}$:	Formas hidrolizadas de tirosol.

Los factores de corrección (2,2 y 2,5) corresponden a la división de la masa molecular media de las formas ligadas más conocidas de hidroxitirosol y tirosol (343 uma) por la masa molecular de hidroxitirosol (154 uma) y tirosol (138 uma), respectivamente. En este cálculo, se tuvieron en cuenta las formas de enlace siguientes: glucósido de tirosol (300,30 uma), forma aldehídica de aglicona de ligstrosido (362,12 uma), forma dialdehídica de aglicona de ligstrosido (304,34 uma), forma aldehídica de aglicona de oleuropeína (378,37 uma), oleuropeína de aglicona (378,37 uma), dialdehído (carboximetilado) de oleuropeína de aglicona (378,37 uma), dialdehído

(descarboximetilado) de oleuropeína de aglicona (320,34 uma), aldehído (descarboximetilado) de oleuropeína de aglicona (320,34 uma).

En el cálculo del contenido total de hidroxitirosol y tirosol, expresados en mg/20 g de aceite, se tuvieron en cuenta las formas libres de hidroxitirosol y tirosol (previas a la hidrólisis) y las formas ligadas. Se utilizó la siguiente expresión:

$$H_{tir} \text{ y } T_{ir} \text{ total} = H_{tir\text{libre}} + T_{ir\text{libre}} + H_{tir\text{ligado}} + T_{ir\text{ligado}} \quad \text{Ecuación 3.17.}$$

siendo,

$H_{tir\text{libre}}$:	Hidroxitirosol libre.
$H_{tir\text{ligado}}$:	Formas ligadas al hidroxitirosol.
$T_{ir\text{libre}}$:	Tirosol libre.
$T_{ir\text{ligado}}$:	Formas ligadas al tirosol.

3.3. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

En una fase preliminar, para describir y caracterizar los resultados experimentales obtenidos se aplicó un análisis exploratorio de los resultados, que permitió el uso posterior de otras técnicas estadísticas, y una estadística descriptiva. Principalmente, los resultados se expresaron mediante la media aritmética y la desviación estándar como medida de la dispersión entre los valores observados para dos réplicas ($n=2$), réplicas suficientes en métodos realizados bajo un sistema acreditado. En aquellos parámetros realizados con métodos acreditados según la UNE-EN ISO/IEC 17025 (ISO, 2017) también se dispone de incertidumbres asociadas al resultado (Rey *et al.*, 2017). En algunos casos, el análisis descriptivo de los resultados se amplió y se incluyeron coeficientes de variación, rango (mínimo y máximo) y percentiles.

Para el estudio de la influencia significativa de ciertos factores agronómicos como la maduración, la variedad, el ambiente, entre otros, sobre los parámetros de la aceituna o del aceite se han utilizado técnicas de análisis univariante o multivariante como el análisis factorial de la varianza (ANOVA) ($p < 0,05$), conjuntamente con pruebas post-hoc de rango múltiple (Duncan, Tukey o Scheffe) o t-test.

Las posibles correlaciones lineales entre pares de parámetros analizados, midiendo su grado de dependencia, han sido estudiadas utilizando el análisis de correlación de Pearson ($p < 0,05$) como técnica estadística bivariante. Esta técnica también se ha utilizado de forma previa a la aplicación de las técnicas de análisis multivariantes.

Para el análisis simultáneo de numerosas variables se han utilizado técnicas estadísticas multivariantes no supervisadas, como el análisis de componentes principales (PCA), o supervisadas, como el análisis discriminante (DA) (Aparicio y García-González, 2013). El PCA permitió obtener los parámetros o compuestos químicos clave o singulares que diferenciaban los distintos aceites de oliva virgen estudiados. El análisis discriminante, un tipo de análisis de agrupamiento, posibilitó hallar similitudes y diferencias entre los aceites analizados, agrupándolos en categorías o clusters. Esta

técnica también se utilizó para determinar los parámetros o compuestos químicos que resultaron ser los mejores predictores que discriminan entre los grupos de AOV hallados. Todo ello propició ciertas clasificaciones entre los aceites de oliva virgen analizados.

Los análisis estadísticos y las gráficas se llevaron a cabo utilizando el software Excel 2016 (Microsoft Corp., Redmond, Washington, EE.UU.) y el software IBM SPSS Statistics 24.0 (IBM Corp., Armonk, NY, EE.UU.).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos a partir del trabajo de investigación realizado durante la ejecución de esta Tesis Doctoral han dado lugar a las siguientes publicaciones científicas en revistas internacionales, que se recopilan en el presente capítulo.

ARTÍCULO I: Rey-Giménez, R., Sánchez-Gimeno, A.C. (2022). Crop year, harvest date and clone effects on fruit characteristics, chemical composition and olive oil stability from an Empeltre clonal selection grown in Aragon. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(13), 5778–5786. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11927>

ARTÍCULO II: Rey-Giménez, R., Sánchez-Gimeno, A.C. (2022). Authenticity in Olive Oils from an Empeltre Clonal Selection in Aragon (Spain): How Environmental, Agronomic, and Genetic Factors Affect Sterol Composition. *Foods*, 11(17), 2587. <https://doi.org/10.3390/foods11172587>

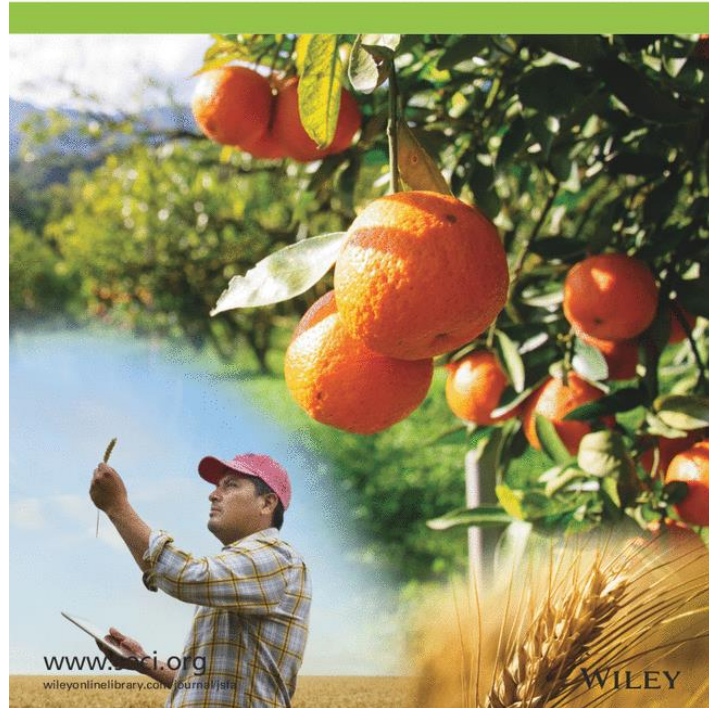
ARTÍCULO III: Rey-Giménez, R., Vázquez Ayala, S., Laya Reig, D., Sánchez Gimeno, A.C. (2023). Chemometric and Physico-Chemical Characterization of Fruit and Olive Oils from Autochthonous Cultivars Grown in Aragon (Spain). *Foods*, 12, 803. <https://doi.org/10.3390/foods12040803>

ARTÍCULO IV: Rey-Giménez, R., Sánchez-Gimeno, A.C. Effect of cultivar and environment on chemical composition and geographical traceability of Spanish olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. En revisión.



Volume 102, Number 13, October 2022
ISSN 0022-5142

Journal of the
**Science of Food and
Agriculture**



4.1. ARTÍCULO I:

Crop year, harvest date and clone effects on fruit characteristics, chemical composition and olive oil stability from an Empeltre clonal selection grown in Aragon.

Rey-Giménez, R., Sánchez-Gimeno, A.C. (2022).

Journal of the Science of Food and Agriculture, 102, 5778–5786.

Estado: publicado.

<https://doi.org/10.1002/jsfa.11927>

Research Article



Received: 6 February 2022

Revised: 8 April 2022

Accepted article published: 9 April 2022

Published online in Wiley Online Library: 27 April

2022 (wileyonlinelibrary.com) DOI 10.1002/jsfa.11927

Crop year, harvest date and clone effects on fruit characteristics, chemical composition and olive oil stability from an Empeltre clonal selection grown in Aragon

Raquel Rey-Giménez^a  and A. Cristina Sánchez-Gimeno^{b*} 

* Correspondence to: AC Sánchez-Gimeno, Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Instituto Agroalimentario de Aragón – IA2, Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza, Spain. E-mail: anacris@unizar.es

a Laboratorio Agroambiental, Gobierno de Aragón, Zaragoza, Spain

b Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Instituto Agroalimentario de Aragón – IA2, Zaragoza, Spain

4.1.1. Abstract

BACKGROUND: In this study, the effects of crop year, harvest date and clone on the fruit characteristics and chemical composition of Empeltre olive oils were evaluated. For this purpose, the weight and oil content of fruit and the fatty acid composition, polyphenol content and oxidative stability of the olive oil was analysed throughout ripening during three successive seasons.

RESULTS: The weight and moisture in the fruit, as well as the fatty acids and polyphenol content in the olive oil, were mainly affected by crop year. In contrast, the stability was strongly influenced by the harvest date. Both factors had an influence on the fruit's oil content. The clone was not a substantial component in terms of variability, although the interaction with crop year was notable for some of the characteristics. The oil content increased significantly along with the harvest date and reached maximum values in the last period (44.9%). Conversely, stability and polyphenols decreased significantly (depending on the year, by 30–70%) from October to December, reaching the highest mean values between 1 October and 10 November (15.5 h; 500 mg caffeic acid kg⁻¹). Oleic acid and monounsaturated/polyunsaturated fatty acids (MUFA/PUFA) did not show significant differences depending on the harvest date, but between years, with 2018 having the highest percentage of oleic acid (72.72%) and MUFA/PUFA (8.38).

CONCLUSION: Early harvesting of Empeltre olives would provide considerably more stable olive oils, regardless of the clone selected, with higher phenolic content. It would not affect the MUFA/PUFA ratio, mainly influenced by the crop year.

Keywords: olive oil; Empeltre clone; crop year; harvest date; chemical composition; oxidative stability.

4.1.2. Introduction

The olive tree (*Olea europaea* L.) is economically one of the most important crops in the Mediterranean area, especially in Spain, the world's leading producer and exporter of olive oil.¹ Health benefits of virgin olive oil consumption are attributed to its high content in monounsaturated fatty acids (MUFA), mainly oleic acid, as well as minor components such as phenolic compounds, squalene, tocopherols and sterols.² On the other hand, fatty acid composition and phenolic compounds are directly related to the chemical stability of olive oil in terms of shelf-life and resistance to lipid oxidation.³⁻⁶ The quality and chemical composition of virgin olive oil depend on agronomic and environmental factors such as cultivar, growing area, seasonal conditions and fruit ripening, among others.^{7,8} For example, as olives progressively ripen, a decrease in polyphenol content and an increase in polyunsaturated fatty acids (PUFA) can be observed, thereby reducing the oil's shelf life by reducing its stability.^{5,9,10}

Empeltre is one of the main olive cultivars in Spain. It is mainly harvested in the northeast of Spain, with an area of 70 000 ha.⁷ In Aragon (the sixth-largest olive-oil-producing region in Spain), 67% of the olive surface area is planted with Empeltre, which makes it the Spanish region with the most hectares of this cultivar. Empeltre olive oils are protected for their uniqueness under six protected designations of origin (PDO), two of which are in Aragon.

Commercial interest in Empeltre cultivar is high because of its good agronomic behaviour, with a very early ripening pattern, good yield and high productivity.^{7,11,12} Empeltre olives have a twofold potential commercial use: either as black table olives or as olive oils.¹³⁻¹⁶ As a consequence, the fruits are usually harvested when they are very ripe, which means that Empeltre olive oils are known for ripe fruitiness, low phenolic content, low bitterness and medium-low oxidative stability.^{13,17,18} Few studies have been carried out on the evolution of the chemical composition of Empeltre olive oils according to their ripeness during several crop years.¹⁹ Most studies in this area have been conducted with very ripe olives. Currently, certain high-quality Empeltre olive oils are being obtained with olives with a low ripening index. Further information about the

evolution of olive oil quality and chemical composition under such conditions would be necessary. These trials could be of interest due to the rise in sales of Empeltre olive oils obtained from low- to medium-ripe olives.

In Spain, during the 1998–2002 periods, a clonal preselection for the genetic improvement of Empeltre cultivar was carried out, with the participation of the six regions where Empeltre traditionally grows (Aragon, Catalonia, La Rioja, Navarra, Valencia and the Balearic Islands). Sixteen clones were selected,^{20,21} then propagated by cuttings, and planted in two comparative trials in two different locations: Gandesa (Catalonia) and Alcañiz (Aragon).^{22,23} Studies on the variability of fruit and olive oil characteristics were carried out, taking into account the influence of the region and year of production, and harvesting olives with ripening indices close to four. The effect of ripening was not evaluated in those clonal studies, although several of them reported higher variability for certain elaiotechnical characteristics including olive parameters and olive oil quality.^{5,10,24,25}

The aim of the current study was to evaluate the influence of harvest date, crop year and clone, and of the interactions among them, on fruit characteristics and on fatty acid composition, phenolic content and oxidative stability in olive oil. For this purpose, a selection of Empeltre clones from Aragon was studied.

4.1.3. Materials and methods

4.1.3.1. Plant material

Eight of the 16 clones planted in 2004 as part of the Empeltre clonal selection comparative trials were selected. The olive trees were grown in an olive orchard belonging to the Government of Aragon, located in Alcañiz, Teruel (NW Spain; 41° 03' 27" N, 0° 08' 36" W), under identical agronomic and pedoclimatic conditions. The trial was randomly designed and arranged with an 8 × 6 m frame (three trees/clone), in clay loam soil with a drip irrigation system. The assays were conducted in the course of the

2017, 2018 and 2019 seasons. Table 1 shows the monthly temperature and rainfall data recorded for those 3 years.

Aragon was the region of origin of the eight clones used in the study, with the region's three provinces represented by different towns. Clone 3 (Valderrobres), clone 5 (Cretas) clone 6 (Calanda), clone 7 (Calaceite) and clone 8 (La Codoñera) were from the province of Teruel. Clones 1 and 2 (Barbastro) were from the province of Huesca, and clone 4 (Caspe) was from the province of Zaragoza. Clone 5 was identified as a standard in the clonal pre-selection trials. A previous microsatellite DNA study did not identify any differences among clones 1, 5 (standard) and 8;²³ as a consequence, olives of these three clones were grouped together and identified as clone Std.

Olives from clones 2, 3, 4, 6, 7 and Std (4 kg) were randomly hand-picked around the tree for each harvest date, at fortnightly intervals from October to December. After collection, the samples were immediately taken to the laboratory and processed.

4.1.3.2. Olive fruit assays and olive oil extraction

One hundred olives from each sample were randomly selected to determine fresh fruit weight (FW) and the olive ripeness index (RI) based on colour changes of the skin and flesh.²⁶

Fruit moisture content (M) and oil content of the fruit, the latter expressed as a percentage of the weight of fresh (OCFW) and dry olive paste (OCDW), were determined using a near-infrared (NIR) analyser (FoodScan Lab, type 78 800, Foss, Runcorn, UK).

Olive oil was extracted using the Abencor system (MC2, Ingeniería y Sistemas SL, Seville, Spain).²⁷ Olive fruits were milled at 3000 rpm by a 3 mm sieve stainless hammer mill, without addition of water or any other adjuvants, and the resulting olive paste was malaxed at 30 °C for 30 min. Olive oil was then separated by centrifugation at 3500 rpm for 1 min.

The oil obtained after decanting was filtered through cellulose paper and stored in amber glass bottles under nitrogen atmosphere at -20 °C until analysis.

Table 1. Weather data in Alcañiz (Teruel) for 2017, 2018 and 2019 crop seasons. Monthly air temperatures (mean, maximum and minimum) and monthly and annual rainfall (mm).

Crop year 2017														
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Annual	
T ^a mean (°C)	5.5	8.9	12.3	14.4	19.6	24.7	25.4	24.8	19.1	17.1	9.3	6.6		
T ^a max (°C)	10.3	14.9	19.7	22.5	28.0	33.0	33.9	32.9	26.1	24.9	16.0	12.0		
T ^a min (°C)	1.3	3.7	5.3	6.0	11.2	16.7	17.5	17.4	12.4	10.2	3.7	1.5		
P (mm)	12	30	29	9	24	52	20	28	9	4	3	4	223	
Crop year 2018														
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Annual	
T ^a mean (°C)	8.5	6.3	10.4	13.8	17.0	22.1	26.3	25.5	22.6	15.4	10.5	8.1		
T ^a max (°C)	13.5	10.9	16.2	20.8	24.2	29.0	34.5	33.5	30.1	21.5	15.5	13.0		
T ^a min (°C)	3.8	1.8	5.0	7.1	10.7	15.5	18.6	18.3	15.6	9.7	6.3	3.7		
P (mm)	42	32	30	75	67	35	27	24	18	102	43	14	508	
Crop year 2019														
	Jan	Feb	Mar	Apr	May	Jun	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov	Dec	Annual	
T ^a mean (°C)	6.1	8.8	12.2	13.4	17.2	23.6	26.7	25.9	21.1	17.0	10.9	8.6		
T ^a max (°C)	11.2	16.8	19.8	20.1	24.7	32.1	35.2	34.0	28.8	23.6	15.9	13.5		
T ^a min (°C)	1.6	2.0	4.9	7.4	9.8	14.0	18.3	17.9	13.8	10.8	6.3	4.5		
P (mm)	15	3	7	28	28	4	14	8	14	38	33	25	216	

4.1.3.3. Olive oil analysis

4.1.3.3.1. Fatty acid composition

Fatty acid methyl esters (FAME) were determined according to the official EU method,²⁸ by cold transmethylation with sodium hydroxide in 2 mol L⁻¹ ethanol, followed by gas chromatographic analysis (GC). An Agilent chromatograph (7890 N, Agilent, Santa Clara, CA, USA) with an SP-2380 60 m × 0.25 mm inner diameter × 0.2 µm film thickness capillary column (Supelco, Bellefonte, PA, USA) was used with helium as a carrier gas (with a flow of 1.2 mL min⁻¹). Oven temperature was 170 °C, for 30 min, increasing by 5 °C min⁻¹ up to 200 °C. The flame ionization detector (FID) and split/spitless injector temperatures were 260 and 250 °C, respectively.

4.1.3.3.2. Total phenol content

For extraction and quantification of polyphenols (TP), the method described by Vázquez Roncero²⁹ was used. Phenolic compounds were isolated from the oil (10 g) by

triple extraction with 20 mL of a methanol–water mixture (60:40, v/v) after dissolving the oil in hexane (50 mL). The absorbance of the resulting solution after reaction of the hydroalcoholic extract with Folin–Ciocalteu reagent in basic medium was measured at 725 nm using a UV–visible spectrophotometer (Specord 205, Analytik, Jena, Germany). Total phenol content was expressed as mg caffeic acid kg⁻¹ oil.

4.1.3.3.3. *Oxidative stability*

The oils' resistance to rancidity, expressed as the oxidation induction time (h), was measured by the Rancimat method³⁰ using a Rancimat 743 apparatus (Metrohm AG, Herisau, Switzerland). The oil samples (3 g), subjected to forced oxidation, were heated to 120 °C and an air flow of 20 L h⁻¹ was passed through.

4.1.3.4. Statistical analysis

First, a descriptive analysis was carried out to obtain information on all the results of the study generated in the Empeltre cultivar in a specific locality: Alcañiz (Aragon). All parameters were determined in duplicate.

Univariate factorial analysis of variance (three-way ANOVA) was used to evaluate the effect of clone, crop year and fruit ripeness (expressed as harvest date) on fruit characteristics, oil content and the oil's physicochemical characteristics. Interactions among the effects were also examined. To assess the effect of ripening, the six harvest dates were grouped into two clusters: early harvest (1 October to 10 November) and late harvest (11 November to 15 December). Duncan's test ($P < 0.05$) was used to determine differences between the mean values for clones and crop years, while a t-test for independent groups was applied to each date cluster. Clones 4 and 7 were not taken into account in the three-way ANOVA, as for those varieties there was only 1 year of results, but they were included in the remainder of the statistical analysis. To study the evolution of OCDW, C18:2, TP and OxStb according to harvest date in each crop year, one-way ANOVA and post hoc Duncan's test ($P < 0.05$) were used. Graphs were constructed with Excel 2010.

Exploratory principal component analysis (PCA) and Pearson's correlation were used to examine the relationships between the parameters analysed in olive fruit and olive oils, and to determine which attributes provided the main contribution to the differences between groups (by clone, year or harvest date). Statistical analyses were carried out using IBM SPSS Statistics 24.0 software (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

4.1.4. Results and discussion

4.1.4.1. Descriptive analysis of results

A descriptive analysis of all the results obtained during the 3 years of study is shown in Table 2.

Table 2. Descriptive statistics on the olive characteristics and oil physicochemical parameters analysed during the 3 years of the study (n = 78).

Parameter	Mean	SD	CV (%)	Min	Max
RI	3.3	1.3	40.5	0.6	6.1
OCFW (%)	19.2	4.5	23.6	11.4	33.2
M (%)	54.4	7.0	12.9	38.1	63.0
OCDW (%)	41.9	4.6	11.0	28.6	54.0
FW (g)	2.39	0.71	29.79	1.23	4.24
OxStb (h)	13.6	3.5	25.6	6.2	20.4
TP (mg kg ⁻¹ caffeic ac.)	388	214	55	85	987
C16:0 (%)	14.14	1.18	8.38	11.57	16.99
C18:0 (%)	1.66	0.20	12.05	1.33	2.20
C18:1 (%)	71.04	2.63	3.71	65.42	75.74
C18:2 (%)	9.74	2.24	23.03	6.66	15.65
C18:3 (%)	0.81	0.07	9.05	0.67	1.01
SFA	16.5	1.1	6.4	14.0	19.0
MUFA	73.0	2.5	3.5	67.3	77.6
PUFA	10.6	2.2	21.2	7.4	16.4
M/P	7.27	1.69	23.28	4.09	10.48

SFA=sum of saturated fatty acids; MUFA=sum of monounsaturated fatty acids; PUFA=poliunsaturated fatty acids; M/P=MUFA/PUFA.

In general, the main fatty acids were the parameters with the lowest variability. The high dispersion of the RI (40.5% coefficient of variation, CV) was due to the broad range of the degree of ripening (0.6–6.1) attained by the sampled fruits, with a mean

value of 3.3. High OCDW contents were recorded, with a maximum of 54.0%, which are similar to those described by other authors^{20,21,23} during the clonal selection of Empeltre. Regarding the chemical composition of the oils, specifically the main fatty acids, linoleic acid (C18:2) was the fatty acid with the highest variability (CV 23.03%). High values of linoleic acid (6.66–15.65%) in Empeltre were also reported by Gracia.^{17,19} In contrast, oleic acid (C18:1) showed very low variability (CV 3.71%), with a mean content of 71.04%. Lower^{19,32,33} and similar and/or higher contents than these have been reported in the literature.^{12,13,21} TP presented a very wide concentration range, which produced the highest dispersion (CV 55%). The maximum value (987 mg kg⁻¹ caffeic acid) was measured in early autumn harvest, while the minimum (85 mg kg⁻¹ caffeic acid) was measured in late harvest (December), when very low minimum temperatures were recorded (Table 1), including frost. Although Gracia and Marco¹⁹ reported higher TP contents than most studies conducted on Empeltre,^{12,13,17,32,33} the concentrations determined in our first samplings in 2017 and 2018 were even higher (Fig. 1). The harvesting of fruits with very high and very low ripening indices, in marked contrast to the referenced publications, could be the reason for the wide range of values observed. A similar phenomenon occurred with oxidative stability (OxStb), although featuring a lower dispersion (CV 25.6%). A minimum of 6.2 h was recorded for the last samples in December, and a maximum of 20.4 h at 120 °C. Harvesting the fruit at earlier dates, with lower ripening indices than those published in other studies for Empeltre cultivar,^{12,17,19,32,33} could be the reason for the higher stability found in this study at the beginning of fruit ripening.^{8,10,30}

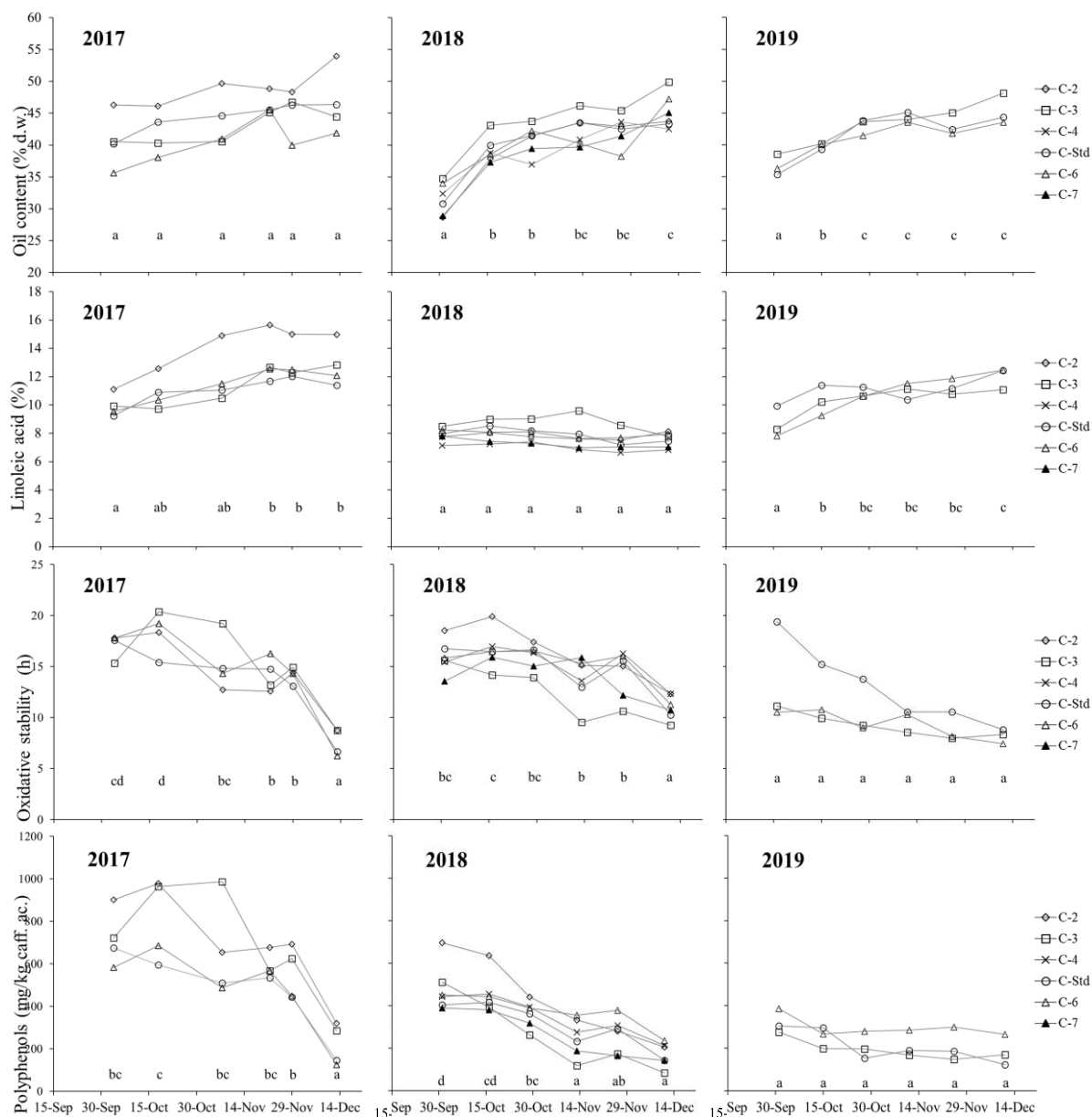


Figure 1. Evolution of oil content (% d.w.), linolenic acid (%), total polyphenols (mg kg⁻¹ caffeic acid) and oxidative stability by harvest date for the clones (C-2: clone 2; C-3: clone 3; C-4: clone 4; C-Std: clone standard; C-6: clone 6; C-7: clone 7) in the 3 crop years studied. Different letters indicate significant differences by sampling date for each parameter (Duncan's test, P < 0.05).

4.1.4.2. Variability factors in fruit characteristics

Significant effects and their influence on total variability in fruit characteristics can be seen in Table 3. The three-way ANOVA showed that crop year was the largest source of variability for OCFW (46.3%), M (64.9%), and FW (70.4%), followed, for the

first two parameters, by harvest date. The 2017 crop showed the highest fat yield (OCFW and OCDW) and the lowest M. That year was characterized by an autumn with wider thermal oscillation, lower minimum temperatures and lower rainfall (Table 1), with meteorological conditions leading to moisture losses in the fruit.²⁴ In addition, average summer temperatures in 2017 were the lowest of the 3 years, thereby allowing for greater oil accumulation in the olives.^{24,38} On the other hand, the FW was significantly higher in 2019. Perhaps this was due to the lower production in that year.³⁶

The harvest date effect was the most pronounced in RI (55.7%), as in previous studies,^{25,39} and the difference between crop years was less important (10.3%). In 2018, the RI was significantly lower than in other years. Perhaps lower average temperatures and higher rainfall in October 2018 could have slowed the fruit ripening process⁴⁰ during that year. On OCDW, harvest date (28.3%) was the most important effect, but other sources of variation also exerted a significant influence, such as the different behaviour of clones among different years (15.2%), clone (9.1%) and crop year (9.1%). Similar results were obtained by de la Rosa et al.²⁵ in different olives from breeding selections in which genotype was the third factor explaining variability, after date and crop year. Navas-López et al.^{34,35} indicated that oil accumulation would mainly depend on abiotic factors; thus, different varieties in the same environment would reach their maximum oil content simultaneously. Although harvest date was not the main source of variability for most fruit characteristics, all differences among dates were significant. Fruit harvested in late autumn showed higher RI as well as higher yields (OCFW and OCDW) and FW, but lower M, in agreement with other authors.^{10,24,25,41} Figure 1 shows the evolution of several parameters according to the sampling period for each crop. To determine the oil yield trend, OCDW was preferred to OCFW to avoid the effect of climatic conditions on the evolution of oil content during sampling.³⁸ A similar pattern can be observed in oil accumulation in each of the 3 years: OCDW increases as autumn progresses and slows down in the second half of November. Oil accumulation profiles are one of the criteria used to determine the optimal harvest date.^{19,34,35,38} This pattern of OCDW accumulation was followed by each clone in 2017, although no significant

differences among dates were observed in the set of clones. Perhaps the cause for this was the high dispersion of values among clones during that year.

Although the effect of clone was not important in the total variability of oil content (OCFW and OCDW) and FW, it was significant (Table 3). In contrast, it was not significant in RI and M. Clone 2 had the highest percentage of OCFW and OCDW, and clone 6 the lowest, both results similar to these described by Tous et al.²⁰ in a study carried out in situ during 1999–2002. This was not the case in the trial in Catalonia,²¹ where the same clones did not display any differences. The low clone influence on certain fruit characteristics of the Empeltre cultivar is similar to that found in the Arbequina clonal selection carried out between 1995 and 1998.³⁷

Table 3. Sum of squares percentages for each source of variation in the analysis of variance (3-way ANOVA) with significance level† and comparison of means by clones, crop years and cluster harvest dates for the fruit characteristics evaluated.

	RI	OCFW	OCDW	M	FW
Clon (C)	2.1 ^{ns}	8.4 ^{**}	9.1 [*]	3.1 ^{ns}	7.1 ^{***}
Crop year (Y)	10.3 ^{***}	46.3 ^{***}	9.1 ^{**}	64.9 ^{***}	70.4 ^{***}
Harvest date (D)	55.7 ^{***}	21.1 ^{***}	28.3 ^{***}	8.2 ^{***}	1.0 [*]
C x Y	4.1 ^{ns}	6.3 [*]	15.2 ^{**}	2.1 ^{ns}	10.2 ^{***}
C x D	0.0 ^{ns}	1.1 ^{ns}	0.0 ^{ns}	1.0 ^{ns}	0.0 ^{ns}
Y x D	1.0 ^{ns}	0.0 ^{ns}	1.0 ^{ns}	1.0 ^{ns}	1.0 ^{ns}
C x Y x D	1.0 ^{ns}	0.0 ^{ns}	1.0 ^{ns}	1.0 ^{ns}	0.0 ^{ns}
Error	25.8	16.8	36.4	18.6	10.2
<i>Clon (C):</i>					
2	3.5	22.5 ^c	44.3 ^a	50.1	2.2 ^a
3	3.6	20.2 ^b	43.4 ^a	53.4	2.6 ^b
6	3.1	18.0 ^a	40.6 ^b	55.7	2.2 ^a
Std	3.5	19.7 ^b	42.2 ^{ab}	53.8	2.7 ^b
<i>Crop year (Y):</i>					
2017	3.8 ^a	24.0 ^a	44.2 ^a	45.8 ^a	2.1 ^a
2018	2.9 ^b	17.4 ^b	41.1 ^b	57.8 ^b	2.1 ^a
2019	3.7 ^a	17.8 ^b	42.1 ^b	58.1 ^b	3.5 ^b
<i>Harvest date (D):</i>					
1 st Oct -10 th Nov	2.4 ^a	17.9 ^a	40.2 ^a	55.6 ^a	2.4 ^a
11 th Nov - 15 th Dec	4.4 ^b	21.9 ^b	44.9 ^b	51.5 ^b	2.5 ^b

†Significance levels: *, P < 0.05; **, P < 0.01; ***, P < 0.001. Not significant: ns. Different letters in means indicate significant differences of 3-way ANOVA (Duncan's test, P < 0.05) for each parameter. Absence of letters: no significant differences between means were found.

4.1.4.3. Variability factors in the chemical composition and oxidative stability of olive oils

Table 4 shows the variation in fatty acid composition, polyphenol content and oxidative stability in the olive oils. The variability observed in the main fatty acids, except for C18:3 and SFA, is mainly due to the crop year, followed by the clone \times year interaction. This interaction, important for palmitic (C16:0) (21.4%) and oleic acid (C18:1) (21.6%), is due to interannual oscillations in the acidic composition in some clones.³³ Further significant interactions were observed, although their effects were not as pronounced. Crop year was also the main effect on TP variation (40.7%), followed by harvest date (19.8%). Olive oils obtained from fruit harvested in 2017 displayed the highest TP (590 mg kg⁻¹ caffeic acid) and C18:2 (11.96%), but the lowest C16:0 (13.53%). M/P ratio was the lowest of the three crops (5.58). The highest percentage of C18:1 (72.72%) and the lowest of C18:2 (8.10%) were obtained in olive oils from 2018, in which the highest M/P was likewise observed (8.38). Finally, the composition of olive oils from 2019 significantly displayed the lowest TP (232 mg kg⁻¹ caffeic acid) and C18:1 (68.84%), as well as the highest C16:0 (15.22%) and C18:3 (0.86%) contents. The maximum and minimum temperature effect (Table 1) observed on C18:1 during the 3 years under study is in line with several other authors.^{35,42,43} The high maximum and minimum temperatures recorded in 2019 (especially in summer when the fruit was developing) negatively affected the C18:1 content. On the other hand, lower temperature amplitudes in 2018 increased the relative percentage of C18:1. No relation was found between the effects of rainfall and temperature on acidic composition as described by Beltrán et al.²⁴ Fruit moisture in 2019 was much higher than in 2017 (Table 3). This could be the reason for the lower TP content in 2019 compared to 2017, which was the highest. Several hypotheses have been advanced regarding the influence of fruit water content on oil phenol content during crushing and malaxation of the pulp.^{18,45,46} The 2019 crop year displayed the lowest OxStb and the lowest polyphenol content, and those compounds are directly correlated with stability.^{30,44,47} In contrast, the OxStb in 2017 was not different from 2018 despite the differing amounts of TP in the oil. Perhaps the high C18:2 value in

Table 4. Partial sum of squares percentages for each source of variation in the analysis of variance (3-way ANOVA) with significance levelst and comparison of means by clones, crop years and cluster harvest dates for the chemical composition and oxidative stability.

Source	OxStb	TP	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	SFA	MUFA	PUFA	M/P
Clon (C)	4.2ns	5.5*	10.2***	5.1***	5.9***	4.9***	14.4***	9.2***	5.9***	4.9***	3.0**
Crop year (Y)	21.1***	40.7***	29.6***	75.5***	54.9***	63.7***	9.3**	16.3***	55.4***	64.7***	69.3***
Harvest date (D)	30.5**	19.8***	14.3***	2.0***	0.0ns	5.9***	37.1***	23.5***	0.0ns	4.9***	1.0ns
C x Y	10.5*	8.8**	21.4***	11.2***	21.6***	8.8***	4.1ns	19.4***	19.8***	8.8***	6.9***
C x D	1.1ns	1.1ns	3.1*	1.0*	1.0ns	0.0ns	1.0ns	4.1*	1.0ns	0.0ns	0.0ns
Y x D	1.1ns	3.3*	2.0ns	0.0ns	7.8***	5.9***	1.0ns	2.0ns	8.9***	5.9***	8.9***
C x Y x D	2.1ns	1.1ns	5.1*	1.0*	2.0*	2.0ns	1.0ns	6.1*	2.0*	2.0ns	1.0ns
Error	29.5	19.8	14.3	4.1	6.9	8.8	32.0	19.4	6.9	8.8	9.9
Clon (C):											
2	15.3	568a	13.92ac	1.73a	70.08a	10.93a	0.80b	16.32b	71.97a	11.73a	6.58a
3	12.2	381b	14.81b	1.62b	69.99a	10.15b	0.82b	17.07a	71.97a	10.97b	6.61a
6	13.1	355b	13.77a	1.72a	70.78b	10.16b	0.86a	16.20b	72.80b	11.02b	6.72ab
Std	14.0	363b	14.29c	1.62b	70.88b	9.84b	0.79b	16.54b	72.83b	10.63b	7.06b
Crop year (Y):											
2017	14.4a	590a	13.53a	1.88a	69.42a	11.96a	0.81a	16.11a	71.13b	12.77a	5.58a
2018	14.8a	344b	14.16b	1.64b	72.72b	8.10b	0.80a	16.49b	74.63a	8.91b	8.38b
2019	10.6b	232c	15.22c	1.41c	68.84c	10.68c	0.86b	17.22c	71.23b	11.55c	6.17c
Harvest date (D):											
1 st Oct -10 th Nov	15.5a	500a	14.68a	1.70a	70.40	9.70a	0.86a	17.06a	72.40	10.57a	6.88
11 th Nov - 15 th Dec	11.5b	306b	13.77b	1.63b	70.52	10.72b	0.77b	16.05b	72.47	11.49b	6.64

+Significance levels: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. Not significant: ns. Different letters in means indicate significant differences of 3-way ANOVA (Duncan's test, $P < 0.05$) for each parameter. Absence of letters: no significant differences between means were found.

the 2017 oils could have compensated for the effect of polyphenols on OxStd^{17,47} in that year.

Harvest date exerted a greater or lesser influence than clone type, depending on the fatty acid under study. Its influence was not significant in the case of C18:1 and M/P, but it was the main effect on the variability of linoleic acid (C18:3) (37.1%) and SFA (23.5%), in contrast to the effect observed by other authors^{25,40} on other varieties. The results of Deiana et al.⁴⁰ disagreed with those of other authors, although they were comparing the same varieties, and that author indicated different pedoclimatic conditions as the cause. Harvest date was also the main factor of variability of OxStab (30.5%) compared to crop year (21.1%). Differing behaviour of clones according to crop year ($C \times Y$) was the third source of variability for OxStab as well as for TP content. This influence can be observed in Fig. 1, where TP and OxStab parameters decreased as harvest progressed in the 2017 and 2018 crop years, but not in 2019. The absence of significant differences in TP and OxStab between the harvest dates during 2019 may be due to the high dispersion observed among clones for each sampled point. On the other hand, the olive oils obtained from less ripe olives had the highest OxStb (15.5 h), i.e., higher values than those described by Tous et al.³⁷ in Empeltre, compared to those from riper olives (11.5 h). Throughout the period sampled, from 1 October to 15 December, only C18:1 maintained a constant mean content, as did its indices (MUFA and M/P), as indicated by the lack of influence of harvest date on its variability. The remainder of the analysed chemical compounds decreased as the harvest date progressed (such as TP^{31,38,40,46} and C16:0, C18:0 and C18:3), or increased (such as C18:2). Different patterns of fatty acid evolution have been described in different cultivars throughout the ripening period^{24,25,31,40,46} so that the ripening effect is not completely clear. For example, the evolution of C18:2 (Fig. 1) was different in 2018, when no difference among harvest dates was observed, compared to 2017 and 2019, where there was an increase in tandem with ripening.

4.1.4.4. Olive oil differentiation

Exploratory PCA showed that 86.8% of the total variability can be explained by the first three components. The first component (43.04% of variance) was positively related to RI, oil content, C18:2 and PUFA, but negatively related to M, C18:1, M/P and MUFA. C16:0 and C18:3 fatty acids were the main chemical compounds that correlated positively with the second component, explaining 24.9% of its variability. The third component (18.8%) was explained by the parameters TP and OxStab, both correlating positively. Figure 2A shows the biplot of the first and third principal component scores, to better visualize the relationships between TP and OxStab with the samples.

RI correlated significantly and positively with oil content (OCDW, $r = 0.812$; OCFW, $r = 0.769$) and with C18:2 ($r = 0.606$), but negatively with OxStab ($r = -0.659$). Other authors did not find such a correlation.²⁵ OCDW showed significant correlation with M ($r = -0.918$) as ripening progressed (as expected), as well as with C18:2 ($r = 0.744$). FW did not correlate with oil content as indicated by certain authors,^{19,35,37} nor with any other parameter. As expected, C18:1 and C18:2 correlated negatively ($r = -0.875$) in agreement with the literature,^{25,35} although no correlation was found between C16:0 and C18:1. Finally, OxStab correlated negatively with RI, as already indicated, and positively with TP ($r = 0.733$), but not with M/P, as certain other authors have found.⁴⁷ The correlation between stability and polyphenols has been described in many previous studies.^{17,19,31,47}

No differentiation between olive oils from the different clones was observed (Fig. 2B.1) as there was overlap among them due to variability associated with the crop year and date of harvest. On the other hand, crop year (Fig. 2B.2) and harvest date (Fig. 2B.3) did differentiate among the olive oils. In Fig. 2B.2, PC 1 shows olive oils from 2018 on the left due to higher C18:1, M/P ratio and OxStab. PC 3 differentiates the 2017 oils from the 2019 oils by their higher TP content and OxStab, placing the former in the upper zone. Biplot 2.B.3 shows the separation of early-harvested oils from the rest, as they are located in the upper part of PC 3, the area of oils with greater stability and high

polyphenol content. On the other hand, fruit harvested in early autumn tends to contain less OCDW than fruit harvested in the second half of November or December.

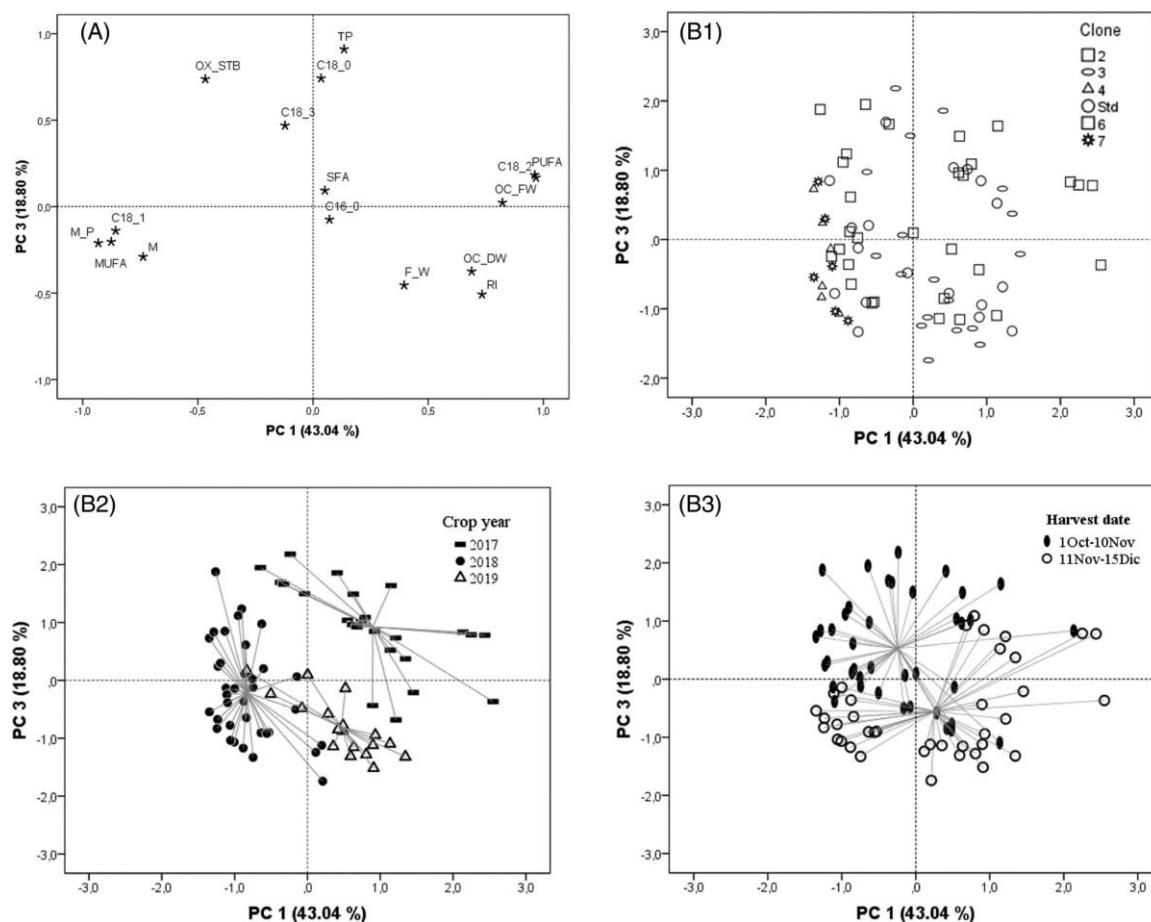


Figure 2. PCA biplots of correlated loadings (A) and scores for the dataset labelled with respect to clone (B.1), crop year (B.2) and harvest date (B.3).

4.1.5. Conclusions

The oil content of the fruit of Empeltre clones depends on the crop year and the date of harvest. In olive oils, our results show that fatty acids such as oleic and linoleic acid, along with polyphenol content, are principally affected by the crop year and secondly by the harvest date. The opposite occurs in the case of oxidative stability. In this sense, a substantial and positive effect of early harvesting on oil quality parameters can be observed in that it increases oil stability and phenolic content.

Selection of the clone in this study, grown under the same conditions allowed to observe the evolution of the fruit's oil content, mainly its oleic acid, although this is

always subject to a joint effect with the crop year. Therefore, it is the factor with the least influence on the physicochemical parameters of the fruit and oil in the Empeltre cultivar.

Knowing the influence of these factors (clone, season and harvest date) on the Empeltre olive variety allows us to select the most suitable conditions for obtaining better quality olive oils, particularly regarding the harvest date, which is commercially relevant.

4.1.6. Acknowledgements

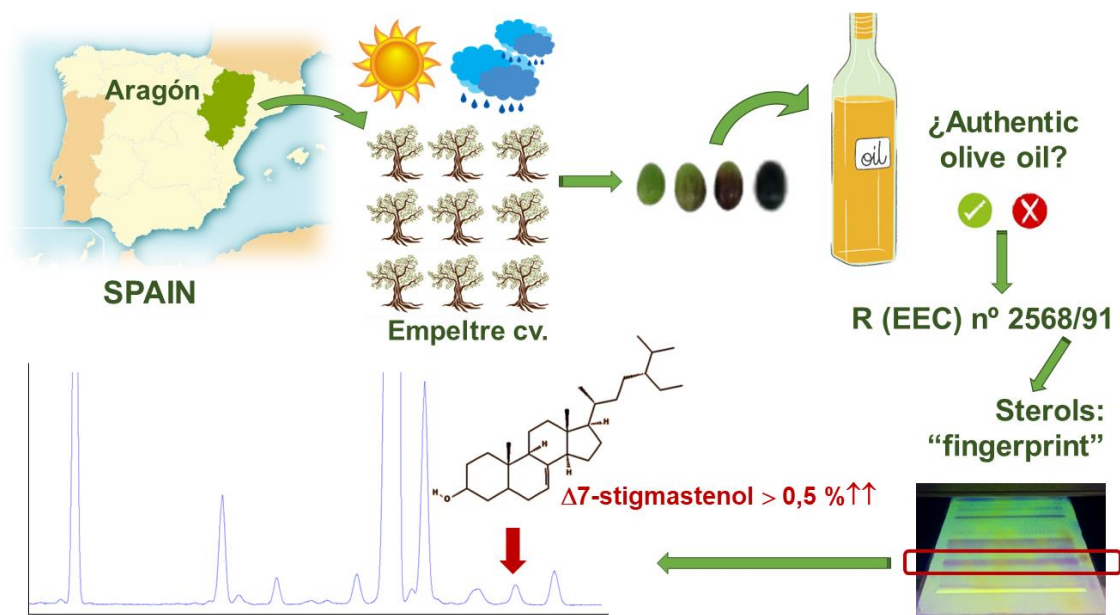
Rey-Giménez thanks Laboratorio Agroambiental for its support in carrying out this research, and Centro de Transferencia Agroalimentaria for the plant material provided for this study. Both centres depend on the Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente (Gobierno de Aragón). Special thanks to the field and laboratory staff for their assistance.

4.1.7. References

- 1 International Olive Council (IOC) (2021). Available: <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotionunit/> [2 January 2022]
- 2 López-Miranda J, Pérez-Jiménez F, Ros E, De Caterina R, Badimón L, Covas MI et al., Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 20:284–294 (2010).
- 3 Salvador MD, Aranda F and Fregapane G, Contribution of chemical components of Cornicabra virgin olive oils to oxidative stability. A study of three successive crop seasons. *J Am Oil Chem Soc* 76:427–432 (1999).
- 4 Servili M and Montedoro GF, Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *Eur J Lipid Sci Technol* 104:602–613 (2002).
- 5 Beltrán G, Aguilera MP, Del RC, Sanchez S and Martinez L, Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chem* 89:207–215 (2005).
- 6 Servili M, Esposto S, Fabiani R, Urbani S, Taticchi A, Mariucci F et al., Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology* 17:76–84 (2009).
- 7 Barranco D, Trujillo I and Rallo L, Elaiografía hispánica, in *Variedades de olivo en España*, ed. by Barranco D, Caballero JM, Del Río C, Martín A, Tous J and Trujillo I. Junta de Andalucía, MAPA and Mundi Prens, Madrid, pp. 46–231 (2005).
- 8 Inglese P, Famiani F, Galvano F, Servili M, Esposto S and Urbani S, Factors affecting extra-virgin olive oil composition. *Hortic Rev (Am Soc Hortic Sci)* 38:83–147 (2011).
- 9 Ben YN, Zarrouk W, Carrasco-Pancorbo A, Ouni Y, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A et al., Effect of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of chétoui virgin olive oil. *J Sci Food Agric* 90:199–204 (2010).
- 10 Dag A, Kerem Z, Yogev N, Zipori I, Lavee S and Ben-David E, Influence of time of harvest and maturity index on olive oil yield and quality. *Sci Hortic* 127:358–366 (2011).
- 11 Tous J and Romero A, *Variedades del Olivo*, ed. by Fundación ‘La Caixa’ and AE2, Barcelona, (1993).
- 12 Tous J, Romero A, Plana J, Espada JL, Gracia MS, Lizar B et al., Ficha varietal del cultivar “Empeltre”. *Olivae* 102:31–32 (2004).
- 13 Gracia MS, Composición química de distintas calidades de aceites de oliva virgen de la variedad “Empeltre” en el Bajo Aragón. *Grasas Aceites* 52:52–58 (2001).

- 14 Romero C, Brenes M, Yousfi K, García P, García A and Garrido A, Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *J Agric Food Chem* 52:479–484 (2004).
- 15 Diarte C, Lai PH, Huang H, Romero A, Casero T et al., Insights into olive fruit surface functions: a comparison of Cuticular composition, water permeability, and surface topography in nine cultivars during maturation. *Front Plant Sci* 10:1484 (2019).
- 16 Moreno-González R, Juan ME and Planas JM, Profiling of pentacyclic triterpenes and polyphenols by LC-MS in Arbequina and Empeltre table olives. *Lwt* 126:109310 (2020).
- 17 Gracia MS, Royo A and Guillen M, Composición química de aceites de las variedades Arbequina y Empeltre cultivadas en regadío. *Grasas Aceites* 60:321–329 (2009).
- 18 Abenoza M, Raso J, Oria R and Sánchez-Gimeno AC, Modulating the bitterness of Empeltre olive oil by partitioning polyphenols between oil and water phases: effect on quality and shelf life. *Food Sci Technol Int* 25:47–55 (2019).
- 19 Gracia MS and Marco P, Efecto del momento de la recolección en la calidad del aceite de la variedad Empeltre en el Bajo Aragón. Diputación General, Departamento de Agricultura y Alimentación, Dirección General de Desarrollo rural, Servicio de Programas Rurales, Zaragoza, (2010).
- 20 Tous J, Romero A, Plana J, Espada JL, Gracia MS, Lizar B et al., Selección clonal de la variedad de olivo “Empeltre” en el Valle del Ebro y Baleares. *Frutic Prof* 160:13–18 (2006).
- 21 Romero A, Tous J and Gracia MS, Fatty acids and sterol composition of “Empeltre” virgin oil in Ebro Valley and Balearic Islands. *Acta Horti* 924:385–392 (2011).
- 22 Romero A and Tous J, II Jornadas Nacionales del grupo de Olivicultura de la SECH, (2009). Available: http://www.agronoms.cat/media/upload/ editora_24/ArticlesIRTA_editora_241_52.pdf [2 January 2022]
- 23 Romero A, Ninot A, Hermoso JF and Tous J, Clonal selection of ‘Empeltre’ olive cultivar in Spain, in: VII International Symposium on Olive Growing, Argentina, (2012).
- 24 Beltrán G, Del Río C, Sánchez S and Martínez L, Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from cv picual. *J Agric Food Chem* 52:3434–3440 (2004).
- 25 de la Rosa R, Talhaoui N, Rouis H, Velasco L and León L, Fruit characteristics and fatty acid composition in advanced olive breeding selections along the ripening period. *Food Res Int* 54:1890–1896 (2013).
- 26 Hermoso M, Uceda M, García A, Morales B, Frías ML and Fernández A, Elaboración de aceite de oliva de calidad. Colección: Apuntes, 5/91, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. Sevilla, Dirección General de Investigación, Tecnología y Formación Agroalimentaria y Pesquera. (1991).
- 27 Martínez JM, Muñoz E, Alba J and Lanzón A, Informe sobre la utilización del analizador de rendimientos “Abencor”. *Grasas Aceites* 26:379–385 (1975).
- 28 EEC, Commission implementing regulation (EU) no 2015/1833. *Off J Eur Union* 266:29–52 (2015).
- 29 Vázquez Roncero A, Janer del Valle C and Janer del Valle ML, Determinación de los polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas Aceites* 24:350–357 (1973).
- 30 Gutiérrez F, Determinación de la estabilidad oxidativa de aceites de oliva vírgenes: comparación entre el método del oxígeno activo (A.O.M) y el método Rancimat. *Grasas Aceites* 40:1–5 (1989).
- 31 Gutiérrez F, Jiménez B, Ruíz A and Albi MA, Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on the different components involved. *J Agric Food Chem* 47:121–127 (1999).
- 32 Tous J, Romero A and Plana J, Selección clonal en variedades (En Arbequina), in *Variedades de olivo en España*, ed. by Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Río C, Martín A, Tous J et al. Junta de Andalucía, MAPA and Ediciones Mundi-Prensa, Madrid (2005).
- 33 Uceda M, Beltrán G and Jiménez A, Composición del aceite (Banco de Germoplasma Mundial de Córdoba), in *Variedades de olivo en España*, ed. by Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Río C, Martín A, Tous J et al. Junta de Andalucía, MAPA and Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 358–372 (2005).
- 34 Navas-López JF, León L, Trentacoste ER and de la Rosa R, Multienvironment evaluation of oil accumulation pattern parameters in olive. *Plant Physiol Biochem* 139:485–494 (2019).
- 35 Navas-López JF, Cano J, de la Rosa R, Velasco L and León L, Genotype by environment interaction for oil quality components in olive tree. *Eur J Agron* 119:126115 (2020).
- 36 Lavee S and Wodner M, Factors affecting the nature of oil accumulation in fruit of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *J Horti Sci* 66:583–591 (1991).
- 37 Tous J, Romero A and Díaz I, Composición del aceite (Banco de Germoplasma de Cataluña), in *Variedades de olivo en España*, ed. by Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Río C, Martín A, Tous J et al. Junta de Andalucía, MAPA and Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, pp. 358–372 (2005).

- 38 Beltrán G, Uceda M, Hermoso M and Frias L, Maduración, in *El cultivo del olivo*, ed. by Barranco D, Fernández-Escobar R and Rallo L. Junta de Andalucía and Mundi-Prensa, Madrid, pp. 163–187 (2004).
- 39 Fernández-Cuesta A, León L, Velasco L and de la Rosa R, Changes in squalene and sterols associated with olive maturation. *Food Res Int* 54:1885–1889 (2013).
- 40 Deiana P, Santona M, Dettori S, Culeddu N, Dore A and Molinu MG, Multivariate approach to assess the chemical composition of Italian virgin olive oils as a function of variety and harvest period. *Food Chem* 300:125243 (2019).
- 41 Salvador MD, Aranda F and Fregapane G, Influence of fruit ripening on ‘Cornicabra’ virgin olive oil quality a study of four successive crop seasons. *Food Chem* 73:45–53 (2001).
- 42 Mousavi S, de la Rosa R, Moukhli A, El Riachy M, Mariotti R, Torres M et al., Plasticity of fruit and oil traits in olive among different environments. *Sci Rep* 9:1–14 (2019).
- 43 García-Inza GP, Hall AJ and Rousseaux MC, Proportion of oleic acid in olive oil as influenced by the dimensions of the daily temperature oscillation. *Sci Hortic* 227:305–312 (2018).
- 44 Beltrán Maza G, Jiménez A, Aguilera Herrera MP and Uceda Ojeda M, Análisis mediante HPLC de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina. Relación con la medida del amargor K225 y la estabilidad. *Grasas Aceites* 51:320–324 (2000).
- 45 Artajo LS, Romero MP and Motilva MJ, Transfer of phenolic compounds during olive oil extraction in relation to ripening stage of the fruit. *J Sci Food Agric* 86:518–527 (2006).
- 46 Baccouri O, Guerfel M, Baccouri B, Cerretani L, Bendini A, Lercker G et al., Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chem* 109:743–754 (2008).
- 47 Aparicio R, Roda L, Albi MA and Gutiérrez F, Effect of various parameters on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *J Agric Food Chem* 47:4150–4155 (1999).



4.2. ARTÍCULO II:

Authenticity in Olive Oils from an Empeltre Clonal Selection in Aragón (Spain): How Environmental, Agronomic, and Genetic Factors Affect Sterol Composition.

Rey-Giménez, R., Sánchez-Gimeno, A.C. (2022).

Foods, 11(17), 2587.

Estado: publicado.

<https://doi.org/10.3390/foods11172587>



Article

Authenticity in Olive Oils from an Empeltre Clonal Selection in Aragon (Spain): How Environmental, Agronomic, and Genetic Factors Affect Sterol Composition

Raquel Rey-Giménez and Ana Cristina Sánchez-Gimeno



<https://doi.org/10.3390/foods11172587>



Article

Authenticity in Olive Oils from an Empeltre Clonal Selection in Aragon (Spain): How Environmental, Agronomic, and Genetic Factors Affect Sterol Composition

Raquel Rey-Giménez ¹ and Ana Cristina Sánchez-Gimeno ^{2,*}

¹ Laboratorio Agroambiental, Gobierno de Aragón, Avda. Montañana 1005, 50071 Zaragoza, Spain;

² Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza, Spain

* Correspondence: anacris@unizar.es

Citation: Rey-Giménez, R.; Sánchez-Gimeno, A.C. Authenticity in Olive Oils from An Empeltre Clonal Selection in Aragon (Spain): How Environmental, Agronomic, and Genetic Factors Affect Sterol Composition. *Foods* **2022**, *11*, 2587. <https://doi.org/10.3390/foods11172587>

Received: 5 July 2022

Accepted: 18 August 2022

Published: 26 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

4.2.1. Abstract

Sterol composition is used as a “fingerprint” to demonstrate the authenticity of olive oils. Our study’s objective was to exhaustively characterize the sterol composition of Empeltre olive oils from clonal selection during the ripening period in 2017, 2018, and 2019. We likewise assessed the influence of crop year, fruit ripening, and clonal selection on the oils’ regulatory compliance in terms of sterol composition. Empeltre olive oils were shown to have medium-range β -sitosterol and Δ^5 -avenasterol content, along with elevated amounts of campesterol and Δ^7 -stigmastenol. A total of 26% and 12% of the samples were non-compliant in terms of apparent β -sitosterol and Δ^7 -stigmastenol, respectively. Crop year was the most influential factor in the case of most sterols. Clone type was the least influential factor, except in the case of campesterol. Olive maturity was only significant for Δ^7 -sterols. We likewise applied a discriminant analysis, with “crop year” as the grouping variable: 94.9% of the oils were thereby classified correctly.

Keywords: olive oil; Empeltre clone; crop year; harvest date; sterol composition; authenticity

4.2.2. Introduction

Extra virgin olive oil (EVOO) is one of the edible vegetable oils most widely consumed in Mediterranean countries due to its health benefits [1,2] and its renowned organoleptic characteristics. These properties are due to the chemical composition of olive oil, of which the glyceric fraction is the majority (98–98.5%). The rest, or minority fraction, is constituted, among other components, of sterols, polyphenols, tocopherols, and pigments. These compounds provide the unique nature of olive oil.

Pre- and post-harvest factors [3,4] affect olive oil quality and chemical composition. Studies have been described concerning the variation in the composition of sterols [5], fatty acids [6], polyphenols [7], alcohols [8], or waxes [9].

Countries that are not traditional olive oil consumers, such as the US or Brazil, have considerably increased their level of consumption over the last ten years [10]. Consequently, EVOO is the oil that achieves the highest price on the markets and is thus highly susceptible to certain fraudulent activities that endanger its authenticity. Deliberate mislabeling or adulteration through illegal blending with other oils or fats of lower economic value are the most common practices [11]. To safeguard olive oils, a series of regulations have been developed that regulate the physicochemical and organoleptic characteristics of olive oils according to their commercial category, and these regulations must be respected according to the country in which the oils are marketed. Among the most important regulations, Regulation (ECC) No 2568/91 is mandatory in the European Union [12] under sanction, but the international standards of the International Olive Oil Council (IOC) [13] and Codex [14] are not. The cultivation of olive trees in countries with climates quite different from the Mediterranean area has led to the appearance of commercial regulations in such nations as well [15,16]. Those standards generally take natural variations in the ranges of certain chemical compounds, such as sterols, into account.

The total concentration and composition of sterols in vegetable oils depend on the type of fruit or oilseed; they also differ from animal fats [17]. Sterols (4-

desmethylsterols) are the main chemical compounds naturally present in the unsaponifiable fraction of olive oil. The sterol profile is used as a “fingerprint” to verify the authenticity of olive oil and is considered a purity parameter, according to commercial standards [12–15]. Non-compliance with a single limit value specified in the standards presumably indicates illegal blending with oils other than olive oil. Testing for non-compliance is a mode of protecting olive oil authenticity. However, numerous cases have been reported where genuine single-varietal olive oils naturally exceeded these limits; as a consequence, their economic value has decreased. In Spain, for example, certain olive oils from cultivars such as Cornicabra and Empeltre exceed the limits [12] for campesterol [18–20] and Δ^7 -stigmastenol [21–24] (4.0% and 0.5%, respectively). Similar non-compliances have likewise been described in single-varietal oils from non-Mediterranean countries, such as Argentina [16], Australia [25,26], the United States [27], and Iran [28].

Natural variations in sterol composition influenced by genetics [29–33], environment (soil, location, climate, water) [19,25,27,28,30,34–36], fruit ripening stage [18,25,31,32,37,38], or technological factors [19,26] have been described. Such variations could at least partially explain the deviations of certain genuine olive oils from established regulatory limits.

Empeltre [21,39] is a traditional olive cultivar located in NE Spain, with an area of 70,000 ha [39]. This cultivar is widely grown in the region of Aragon and protected under a total of six Protected Designations of Origin (PDO), two of which are in Aragon. In 1998–2002, a clonal pre-selection [23,24] was carried out with the purpose of genetically improving this cultivar, taking into account, among other parameters, the sterol composition of the oils obtained from it, especially its Δ^7 -stigmastenol content. The selected clones were subsequently planted in two comparative trials, one of which was conducted in Aragon [40].

The aim of the present study is exhaustively characterize the sterol composition of Empeltre olive oil from Aragon clonal selection to evaluate the influence of

environmental, fruit ripening, and clonal selection factors, and to ascertain the regulatory compliance of total and individual sterol amounts.

4.2.3. Materials and Methods

4.2.3.1. Plant Material and Fruit Samples

Empeltre [23,41] is a variety with low rooting capacity. For this reason, it is normally propagated by grafting. This cultivar has a high and constant production every year. The fruit is black when ripe, medium-sized, elongated, and slightly asymmetrical. The fruits are early ripening.

Eight Empeltre clones of olive trees, grown in an experimental orchard of Centro Transferencia Agroalimentaria in Alcañiz in the province of Teruel (NE Spain; altitude 295 m; longitude 41°03' N; latitude 0°08' W), were selected based on region of origin (Aragon). Our study was carried out over three consecutive seasons: 2017, 2018, and 2019. All olive trees were cultivated under identical agronomic and pedoclimatic conditions. The clonal selection was planted in 2004 at a 6 × 5 m spacing in clay loam soil with a drip irrigation system according to evapotranspiration. Standard cultivation practices were followed, so olive trees were well supervised and showed no nutrient deficiency or pest damage.

The Alcañiz region has a cold, semi-arid climate ("BSk" type) according to the Köppen–Geiger climate classification [42], featuring irregular, scarce precipitation combined with wide absolute thermal amplitude owing to extreme temperatures in winter and summer. Figure 1 shows the weather data registered for the three years of study.

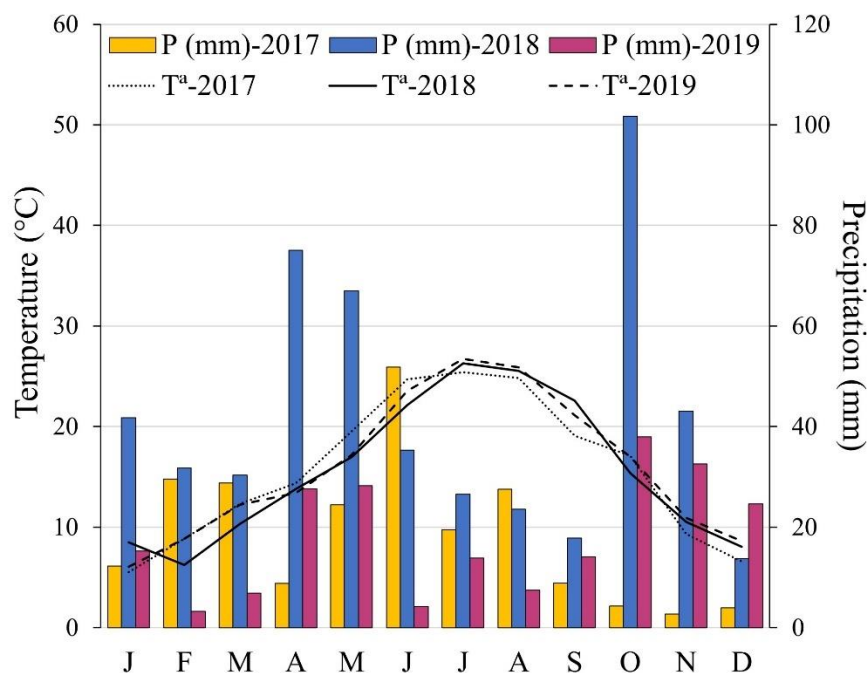


Figure 1. Mean values of temperature and rainfall registered in Alcañiz (Teruel) during three consecutive crop seasons (2017, 2018, and 2019). J: January; F: February; M: March; A: April; M: May; J: June; J: July; A: August; S: September; O: October; N: November; D: December.

The clones we studied (3 trees per clone), numbered 1 to 8, came from a clonal pre-selection [23]. The clone identified in this study as “Std” corresponds to a group of clones comprising Nos. 1, 5, and 8, as a previous study observed no differences among them [40].

The olive fruits were hand-harvested at fortnightly intervals from October to December and were processed in the laboratory on the same day. The ripening index (RI) was determined according to the method described by Hermoso et al. [43] based on the color changes observed in the olives’ skin and pulp.

4.2.3.2. Olive Oil Extraction

Olive samples (4 kg) were processed, and their oil extracted using the two-phase Abencor® laboratory oil mill (MC2, Ingeniería y Sistemas, S.L., Sevilla, Spain) [44]. The fruits were milled by a 3-mm-sieve stainless hammer mill, and the olive paste was malaxed for 30 min at 30 °C. The olive oils were then separated by centrifugation at 3500 rpm for one minute and further decanting. Finally, oils were filtered and the samples

were stored in 125 mL amber glass bottles under a nitrogen atmosphere at -20°C until analysis.

4.2.3.3. Determination of Physicochemical Quality Parameters

Free acidity, peroxide value, and ultraviolet (UV) absorption characteristics (K_{232} , K_{270} , ΔK) were determined according to methods described in Annexes II, III, and IX, respectively, of the consolidated European Regulation EEC No 2568/91 [11].

4.2.3.4. Determination of Sterol Composition

Sterol composition was determined according to the method described in Annex V of the consolidated European Regulation EEC No 2568/91 [11]. Sterol derivatives (trimethylsilyl ethers) were analyzed by an Agilent gas chromatograph (6890, Agilent, Santa Clara, CA, USA) equipped with a split/splitless injector (injection volume: $1\ \mu\text{L}$; split ratio: 1:50; 285°C) and a flame-ionization detector (FID) (300°C). Individual sterols were separated by a CP-Sil 8 CB capillary column ($25\ \text{m length} \times 0.25\ \text{mm inner diameter} \times 0.25\ \mu\text{m film thickness}$) (Supelco, Bellefonte, PA, USA), and helium was used as a carrier gas (flow: $1\ \text{mL/min}$). The oven temperature was isothermal at 265°C .

Individual peaks were identified by comparing the retention times of sterols with those of the standard samples. *A*-cholestanol was used as the internal standard for the quantification of individual sterols expressed as a relative percentage. The total sum of sterols was expressed as mg/kg. Apparent β -sitosterol was calculated as the sum of β -sitosterol, $\Delta 5$ -avenasterol, clerosterol, sitostanol, and $\Delta 5,24$ -stigmastadienol.

4.2.3.5. Statistical Analysis

We characterized the Empeltre clonal selection oils by descriptive analysis of all results obtained during the three years of study (78 samples). The effects of crop year, clone, and fruit maturity on individual and total sterol content were evaluated using univariate factorial analysis of variance (three-way ANOVA; $p < 0.05$). Clones 4 and 7 were excluded from three-way ANOVA analysis due to insufficient data. Results were grouped into three different ripening stages (green, spotted, and ripe) to evaluate the

ripening effect. One-way ANOVA and a post hoc Duncan's test ($p < 0.05$) were used to determine the influence of different harvest dates on sterol composition for each crop year. A study of relationships among individual sterols was carried out using Pearson's correlation.

Finally, we conducted a multivariate analysis to study the discriminatory capacity regarding the sterol composition of Empeltre olive oils in the clonal selection of the study. For this purpose, we performed a canonical discriminant analysis (DA), which uses canonical correlation and principal component analysis techniques. To choose the most discriminating independent variables, we applied the step-wise method using Wilks' lambda and its chi-square approximation as the exclusion method, along with the Snedecor's F statistic as the selection criterion.

Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics 24.0 software (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Graphs were constructed with Excel 2016 (Microsoft Corp., Redmond, Washington, USA).

4.2.4. Results and Discussion

4.2.4.1. Sterol Composition and Regulatory Compliance of Empeltre Olive Oils

Table 1 shows the average results of the physicochemical quality parameters and the relative sterol composition, as well the total sterol content of the featured Empeltre olive oils. The 78 olive oil samples analyzed in the course of the 2017, 2018, and 2019 crop years were classified as extra virgin olive oils (EVOO) based on their physicochemical quality (acidity $\leq 0.8\%$ oleic acid; peroxide value ≤ 20 meq O_2 /kg; $K_{270} \leq 0.22$; $K_{232} \leq 2.50$) according to the different regulations [12–14]. The low acidity levels we observed indicate that these olive oils came from healthy fruit.

Table 1. Descriptive statistic of physicochemical quality parameters and sterol composition during three crop years (2017, 2018, and 2019) ($n = 78$).

Parameter	Mean \pm sd	Range	Percentiles			
			25	50	75	90
free acidity (% oleic acid)	0.16 \pm 0.04	0.07–0.26	0.13	0.15	0.18	0.13
peroxides value (meq O ₂ /kg)	6.3 \pm 2.7	2.2–14.5	4.28	5.45	8.03	4.28
K ₂₇₀	0.11 \pm 0.02	0.07–0.17	0.10	0.11	0.12	0.10
K ₂₃₂	1.67 \pm 0.17	1.38–2.08	1.55	1.64	1.79	1.55
cholesterol ^a	0.08 \pm 0.02	0.05–0.15	0.07	0.08	0.10	0.11
brassicasterol ^a	nd	nd	nd	nd	nd	nd
24-methylene-cholesterol	0.07 \pm 0.04	0.01–0.22	0.05	0.06	0.09	0.12
campesterol ^a	3.16 \pm 0.21	2.77–3.59	2.98	3.17	3.31	3.45
campestanol	0.38 \pm 0.05	0.30–0.57	0.34	0.37	0.42	0.45
stigmasterol ^a	1.34 \pm 0.81	0.45–3.05	0.68	0.90	2.14	2.58
clerosterol	1.02 \pm 0.13	0.49–1.45	0.95	1.00	1.07	1.17
β -sitosterol	85.58 \pm 1.54	81.87–89.36	84.70	85.63	86.39	87.66
sitostanol	0.47 \pm 0.12	0.30–0.85	0.38	0.44	0.56	0.65
Δ 5-avenasterol	5.62 \pm 1.32	2.74–8.37	4.74	5.80	6.45	7.37
Δ 5,24-stigmastadienol	0.82 \pm 0.20	0.47–1.29	0.66	0.78	1.00	1.12
Δ 7-stigmastenol ^a	0.46 \pm 0.10	0.23– 0.76	0.40	0.45	0.51	0.60
Δ 7-avenasterol	0.95 \pm 0.22	0.47–1.47	0.79	0.96	1.09	1.25
app. β -sitosterol ^a	93.52 \pm 0.72	92.04 –94.54	92.86	93.79	94.13	94.26
total sterols ^a	1490 \pm 204	1158–1943	1312	1452	1696	1792

^aLimits established by the current EU/IOC/CODEX regulatory for OOV: total sterols \geq 1000 mg/kg; cholesterol \leq 0.5 %; brassicasterol \leq 0.1 %; campesterol \leq 4.0 %; stigmasterol \leq campesterol; Δ 7-stigmastenol \leq 0.5 %; app. β -sitosterol \geq 93.0 %. Values in bold: non-compliant. Not detected = nd. App. β -sitosterol = clerosterol + β -sitosterol + sitostanol + Δ 5-avenasterol + Δ 5,24-stigmastadienol.

In all cases, the total sterol content lay above the minimum limit (1000 mg/kg) established for virgin olive oils (VOO) [12–14], resulting in a mean value of 1490 mg/kg within a range of 1158 to 1943 mg/kg. As expected, the average individual sterol profile obtained in the olive oil from selected Empeltre clones was: β -sitosterol as the main sterol (85.58 \pm 1.54%), followed by minor contents of Δ 5-avenasterol (5.62 \pm 1.32%), campesterol (3.16 \pm 0.21%), and stigmasterol (1.34 \pm 0.81%). The latter sterol displayed a high standard deviation, due to wide variation among the crop years in this study. These results were similar to those which have previously been reported on the Empeltre cultivar [16,22,23,25] and on other Spanish [20,32], Italian [31], Tunisian [35,45], and Algerian [46] cultivars. The percentages of these four sterols enable us to differentiate Empeltre olive oil as a monovarietal oil featuring medium-range contents of β -sitosterol and Δ 5-avenasterol, but high levels of campesterol and stigmasterol, according to the

classification elaborated by Kyçyk et al. [33] on the basis of 43 monovarietal oils from the Córdoba Germplasm Bank.

Lower quantities of cholesterol, 24-methylene-cholesterol, campestanol, clerosterol, sitostanol, $\Delta 5,24$ -stigmastadienol, $\Delta 7$ -stigmastenol, and $\Delta 7$ -avenasterol were found in all samples. On the other hand, brassicasterol, a sterol marker for olive oil adulteration with Brassicaceae oils (e.g., rapeseed, canola), was not detected in any of the samples. Other sterols, such as $\Delta 7$ -campestanol (present in sunflower oil) and $\Delta 5,23$ -stigmastadienol (present in refined olive oils due to the refining process) were found in trace amounts in some of the samples (data not shown).

Regarding compliance with the limits established by European [12] and international regulations [13,14] regarding relative sterol composition, not all samples satisfied the requirements to be considered as genuine virgin olive oils (values in bold type in Table 1). The mean percentage of apparent β -sitosterol ($93.52 \pm 0.72\%$) was above the legal limit [12–14] ($\geq 93\%$): the range of values obtained for this parameter (92.04–94.54%) showed that 26% of all samples analyzed during the three study crop years were non-compliant virgin olive oils. This non-compliance could suggest the presence of seed oils. Kyçyk et al. [33] reported that 23% of the monovarietal oils they analyzed had apparent β -sitosterol below 93%. Similarly, Rivera del Álamo et al. [20] described a non-compliance of 15–20% of the commercial Cornicabra virgin olive oils (334 samples) they analyzed during five consecutive crop years. Other authors [28,46,47] have also described monovarietal virgin olive oils from different countries that do not fulfill legislative limits for this parameter.

The mean percentage of $\Delta 7$ -stigmastenol obtained from the 78 samples of virgin olive oils analyzed in our study was remarkably high ($0.46 \pm 0.10\%$), featuring a wide range of values (0.23–0.76%). A total of 12% of the samples had $\Delta 7$ -stigmastenol values showing above the established 0.5% limit [12–14]. Elevated $\Delta 7$ -stigmastenol values in Empeltre oils had also been observed in studies conducted over the period of 1998 to 2022 [23,24]. Garcia [21,22] has suggested that high $\Delta 7$ -stigmastenol contents in Empeltre olive oils are a varietal peculiarity. Similar arguments have been propounded by

Salvador et al. [18] and Rivera et al. [20] regarding the high campesterol content observed in the Spanish Cornicabra cultivar. High $\Delta 7$ -stigmastenol content in other monovarietal oils has been described in Argentinian [16], Tunisian [45,46], and Palestinian [48] olive oils. Elevated $\Delta 7$ -stigmastenol values (%) have likewise been observed in Compositae oils (e.g., sunflower, safflower).

The other sterols all complied with the limits specified in standard regulations for virgin olive oils [12–14].

4.2.4.2. Factors Exerting an Influence on Sterol Composition

The effects of clone type, crop year, and fruit maturity on sterol content and composition are shown in Table 2. Results of three-way ANOVA demonstrated that crop year was the variable under study which most significantly affected [19,49] the majority of the sterols we analyzed, along with total sterol content. Moreover, its effect was statistically significant for all evaluated parameters. Ripening also significantly modulated sterol composition [18,26,28,31,47,49]. Its impact, however, was much less pronounced than that of crop year, except in the case of sitosterol. In contrast, the degree of fruit ripeness was neither significant for $\Delta 7$ -sterols such as $\Delta 7$ -stigmastenol and $\Delta 7$ -avenasterol, nor for clerosterol. Few sterols showed significant differences according to clone. Among them, campesterol and $\Delta 7$ -stigmastenol were the ones most affected by clone type, and the latter was the factor which exerted the main effect on those sterols. Interactions among two effects (crop year \times clone, crop year \times fruit maturity, or clone \times fruit maturity) showed significant differences for some parameters, but were less notable than independent effects, except for the influence of ripening factor on $\Delta 7$ -stigmastenol and $\Delta 7$ -avenasterol. The ripening effect was exclusively significant on $\Delta 7$ -stigmastenol when interacting with crop year ($p < 0.001$) or clone type ($p < 0.01$).

Table 2. Analysis of variance (F-values) by 3-way ANOVA of sterol composition in three crop years (Y) (2017, 2018, and 2019) on four Empeltre clones (C) (2, 3, 6, and Std) and in three fruit maturity stages (M) (green, spotted, and ripe).

Parameter	Crop Year (Y)	Clone (C)	Fruit Maturity (M)	Y × C	Y × M	C × M	Y × C × M
cholesterol ^a	34.8 ***	0.8	6.3 **	3.0 *	1.4	1.4	2.1
24-methylene-cholesterol	26.5 ***	4.6 **	19.9 ***	2.9 *	0.9	1.3	1.2
campesterol ^a	11.2 ***	41.8 ***	13.9 ***	7.3 ***	3.5 *	3.2 **	1.1
campestanol	6.2 **	4.3 **	4.7 *	2.6*	0.7	1.3	0.8
stigmasterol ^a	37.8 ***	0.5	8.3 ***	0.2	2.7	0.4	0.3
clerosterol	8.1 ***	1.8	0.9	1.7	1.6	1.7	2.3 *
β-sitosterol	14.3 ***	2.2	8.6 ***	1.4	0.9	0.5	0.5
sitostanol	5.7 **	2	25.7 ***	2.2	0.3	0.1	0.3
Δ5-avenasterol	24.9 ***	2.1	7.6 **	1.3	1.9	0.2	0.7
Δ5,24-stigmastadienol	72.8 ***	8.2 ***	3.5 *	3.8 **	4.8 **	2	1.2
Δ7-stigmastenol ^a	15.1 ***	20.4 ***	1.8	3.5 **	6 ***	3.8 **	0.9
Δ7-avenasterol	31.8 ***	17 ***	3	3.1 *	6.8 ***	1.8	0.8
app. β-sitosterol ^a	27.6 ***	1.1	7.4 **	0.4	1	0.6	0.5
β-sitosterol/Δ5-avenasterol	7.6 **	1.3	3.8 *	0.5	0.7	0.1	0.4
total sterols ^a	54.8 ***	5.9 **	13.3 ***	4.2 **	1.3	1.0	2.0

Significance levels: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Absence of *: no significant differences. ^aParameters regulated by EU regulation and IOC/CODEX standards. Interactions: between crop year and clone (Y × C), between crop year and fruit maturity (Y × M), between clone and fruit maturity (C × M), between crop year, clone, and fruit maturity (Y × C × M).

4.2.4.3. Changes in Sterol Composition According to Degree of Olive Ripeness

As shown in Table 2, total sterol concentration displayed significant differences according to the olives' degree of ripeness. In the three crop years studied, no consistent pattern was observed in the evolution of sterol content (Tables 3–7), as similarly observed by Salvador et al. [18] in studies on Cornicabra oils over four consecutive seasons. An evident increase in the concentration of olive oil sterols as the fruit matured (higher than 20%) occurred in 2019. In contrast, most clones showed similar contents in December 2018 compared to the beginning of the sampling, although with some oscillations during the sampling period, except for Clone 2, in which sterols increased by 12%. In 2017, a significant increase in sterols (37%) was observed in December compared to October in olive oils from the “Std” clone, but such variation was minimal or non-existent in the other clones. Other authors have observed a decrease in sterol content [6,32,38] and have explained it as a dilution effect of increasing oil content during

fruit ripening [38]. The evolution of sterols directly in the olive pulp [50] has been less studied, but increases in sterol concentration have indeed been observed in the pulp as ripening progresses. Inês et al. [51] suggested that the increase they observed in sterol biosynthesis in early fruits was because the rates of mitosis and membrane formation were at maximum levels. The complexity of the enzymatic pathways involved in sterol biosynthesis [52,53] and the participation of sterols in the biosynthesis of other compounds [37,54], as well as abiotic stress effects on olives (a less studied factor) [53,55], generate a wide range of variability in sterol concentration throughout ripening. Navas-López et al. [30] observed that cultivar type was the main contributor to total variability in sterols. Their study involved seven cultivars grown in five different environments. However, hardly any references have been published [56] regarding the trends of total and individual sterol content during the olive ripening process specifically in the Empeltre cultivar. The dynamics of biosynthesis in the fruit and the accumulation of sterols in Empeltre olive oil could differ from those hitherto described in other cultivars [56].

Table 3. Evolution of sterol composition (%) and total sterols (mg/kg) according to picking date ^a for clone 2 in the crop years 2017 and 2018.

Parameter	Crop year 2017					Clone 2 (C-2)							Crop year 2018		
	4 Oct	18 Oct	7 Nov	22 Nov	29 Nov	13 Dec	1 Oct	15 Oct	28 Oct	11 Nov	25 Nov	11 Dec			
ripening index	2.4	3.2	4.0	5.1	5.5	6.1	1.1	1.7	2.7	2.9	3.6	4.2			
cholesterol ^b	0.05 ± 0.01a	0.06 ± 0.00a	0.07 ± 0.01a	0.06 ± 0.00a	0.06 ± 0.01a	0.06 ± 0.00a	0.08 ± 0.01a	0.11 ± 0.01bc	0.10 ± 0.00ab	0.10 ± 0.00abc	0.12 ± 0.01c	0.12 ± 0.00c			
brassicasterol ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd			
24-methylene-cholesterol	0.04 ± 0.01a	0.05 ± 0.01a	0.06 ± 0.01a	0.07 ± 0.01a	0.06 ± 0.00a	0.07 ± 0.01a	0.02 ± 0.00a	0.04 ± 0.00a	0.06 ± 0.00b	0.05 ± 0.02b	0.07 ± 0.01b	0.06 ± 0.02b			
campesterol ^b	2.99 ± 0.02a	2.83 ± 0.02a	2.86 ± 0.00a	2.86 ± 0.06a	2.81 ± 0.02a	2.84 ± 0.06a	3.33 ± 0.05a	3.21 ± 0.03b	3.10 ± 0.03c	3.10 ± 0.05c	3.07 ± 0.01c	3.14 ± 0.00bc			
campestanol	0.34 ± 0.03a	0.32 ± 0.02a	0.35 ± 0.01a	0.30 ± 0.03a	0.32 ± 0.01a	0.30 ± 0.00a	0.41 ± 0.04a	0.46 ± 0.00a	0.41 ± 0.11a	0.31 ± 0.03a	0.37 ± 0.03a	0.34 ± 0.02a			
stigmasterol ^b	0.54 ± 0.01a	0.53 ± 0.00b	0.76 ± 0.00c	0.71 ± 0.01d	0.60 ± 0.01e	0.59 ± 0.01e	0.67 ± 0.00a	0.75 ± 0.02b	2.53 ± 0.02c	2.67 ± 0.01d	2.45 ± 0.01e	2.02 ± 0.01f			
clerosterol	1.02 ± 0.03a	0.99 ± 0.00a	0.92 ± 0.04b	0.93 ± 0.00b	0.93 ± 0.00b	0.92 ± 0.01b	1.13 ± 0.01a	0.99 ± 0.03a	nd	0.95 ± 0.08a	1.00 ± 0.00a	0.94 ± 0.03a			
β-sitosterol	86.00 ± 0.04a	85.13 ± 0.17bc	84.74 ± 0.22b	85.31 ± 0.18c	85.00 ± 0.21bc	86.00 ± 0.09a	88.46 ± 0.14a	86.57 ± 0.01b	83.82 ± 0.21c	84.38 ± 0.07d	84.65 ± 0.10d	85.97 ± 0.03e			
sitostanol	0.47 ± 0.02a	0.41 ± 0.01ab	0.37 ± 0.03bc	0.32 ± 0.05c	0.32 ± 0.02c	0.31 ± 0.02c	0.85 ± 0.06a	0.59 ± 0.02b	0.48 ± 0.00c	0.46 ± 0.01c	0.39 ± 0.03d	0.36 ± 0.02d			
Δ5-avenasterol	5.80 ± 0.05a	6.59 ± 0.05b	6.57 ± 0.18b	6.23 ± 0.12c	6.74 ± 0.17b	6.16 ± 0.10c	2.81 ± 0.11a	4.69 ± 0.04b	5.99 ± 0.11c	5.67 ± 0.12d	5.97 ± 0.04c	5.19 ± 0.05e			
Δ5,24-stigmastadienol	0.93 ± 0.03a	1.06 ± 0.04b	1.13 ± 0.01c	1.04 ± 0.04b	1.01 ± 0.01b	0.90 ± 0.01a	0.78 ± 0.05ab	0.88 ± 0.04a	0.89 ± 0.04a	0.77 ± 0.10ab	0.66 ± 0.00bc	0.61 ± 0.00c			
Δ7-stigmasterol ^b	0.53 ± 0.01a	0.56 ± 0.01a	0.69 ± 0.02b	0.76 ± 0.01c	0.74 ± 0.02c	0.67 ± 0.01b	0.52 ± 0.02a	0.54 ± 0.00a	0.48 ± 0.06a	0.46 ± 0.02a	0.40 ± 0.04a	0.45 ± 0.08a			
Δ7-avenasterol	1.29 ± 0.02a	1.39 ± 0.01b	1.47 ± 0.00b	1.42 ± 0.06b	1.42 ± 0.03b	1.17 ± 0.04c	0.89 ± 0.01a	1.12 ± 0.03b	1.09 ± 0.03b	1.01 ± 0.02c	0.81 ± 0.00d	0.80 ± 0.03d			
app. β-sitosterol ^b	94.22 ± 0.11a	94.18 ± 0.14ab	93.73 ± 0.02c	93.82 ± 0.02cd	94.00 ± 0.01bd	94.30 ± 0.03a	94.02 ± 0.09a	93.73 ± 0.00b	92.18 ± 0.08c	92.23 ± 0.07c	92.67 ± 0.09d	93.07 ± 0.09e			
total sterols ^b	1807 ± 6a	1791 ± 18a	1796 ± 43a	1943 ± 44b	1860 ± 28ac	1893 ± 27bc	1381 ± 10a	1275 ± 21a	1303 ± 227a	1470 ± 43a	1448 ± 0a	1567 ± 19a			

^aValues are mean ± standard deviation (n = 2). ^aDifferent letters for each parameter indicate significant statistical differences (p < 0.05) among picking dates for each crop year (a-f). ^bLimits established by the current regulation: total sterols ≥ 1000 mg/kg; cholesterol ≤ 0.5 %; brassicasterol ≤ 0.1 %; campesterol ≤ 4.0 %; stigmasterol ≤ campesterol; Δ7-stigmasterol ≤ 0.5 %; app. β-sitosterol ≥ 93.0 %. Values in bold: non-compliance. Not detected = nd.

Table 4. Evolution of sterol composition (%) and total sterols (mg/kg) according to picking date ^a for clone 3 in the crop years 2017, 2018, and 2019.

Parameter	Clone 3(C-3)													
	Crop year 2017					Crop year 2018					Crop year 2019			
	4 Oct	18 Oct	7 Nov	22 Nov	29 Nov	13 Dec	1 Oct	15 Oct	28 Oct	11 Nov	25 Nov	11 Dec	4 Oct	18 Oct
ripening index	1.7	2.0	3.5	4.9	4.9	5.3	1.5	2.7	3.3	3.9	4.4	4.8	1.9	3.1
cholesterol ^b	0.05 ± 0.00a	0.06 ± 0.01a	0.06 ± 0.01a	0.06 ± 0.01a	0.06 ± 0.01a	0.07 ± 0.02a	0.09 ± 0.01a	0.09 ± 0.01a	0.09 ± 0.00a	0.08 ± 0.01a	0.11 ± 0.01a	0.10 ± 0.00a	0.07 ± 0.01a	0.11 ± 0.01bc
brassicasterol ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
24-methylene-cholesterol	0.03 ± 0.00a	0.04 ± 0.00ab	0.06 ± 0.01c	0.05 ± 0.00c	0.07 ± 0.01c	0.06 ± 0.01bc	0.03 ± 0.00a	0.05 ± 0.00ba	0.06 ± 0.01bcd	0.04 ± 0.02ab	0.08 ± 0.01d	0.07 ± 0.01cd	0.04 ± 0.01a	0.08 ± 0.01ab
campesterol ^b	3.18 ± 0.00a	3.23 ± 0.01b	3.26 ± 0.01c	2.93 ± 0.02d	3.01 ± 0.00e	2.93 ± 0.00d	3.27 ± 0.03a	3.08 ± 0.00b	2.98 ± 0.03c	2.95 ± 0.06c	2.86 ± 0.02d	3.03 ± 0.03bc	3.22 ± 0.01a	2.97 ± 0.01bc
campestanol	0.31 ± 0.01a	0.34 ± 0.01b	0.35 ± 0.02b	0.34 ± 0.01b	0.35 ± 0.01b	0.30 ± 0.01a	0.40 ± 0.01a	0.37 ± 0.00a	0.40 ± 0.04a	0.35 ± 0.05a	0.38 ± 0.00a	0.38 ± 0.01a	0.35 ± 0.01a	0.34 ± 0.02a
stigmasterol ^b	0.59 ± 0.01a	0.45 ± 0.00b	0.59 ± 0.01a	0.68 ± 0.01c	0.67 ± 0.00c	0.71 ± 0.00d	0.71 ± 0.02a	0.88 ± 0.01b	2.55 ± 0.02c	3.05 ± 0.05d	2.56 ± 0.01c	2.00 ± 0.02e	0.60 ± 0.02a	0.68 ± 0.02a
clerosterol	1.04 ± 0.00a	1.05 ± 0.01a	0.98 ± 0.03b	0.93 ± 0.01c	0.93 ± 0.01c	0.90 ± 0.01c	1.03 ± 0.02a	1.01 ± 0.01a	0.98 ± 0.06a	0.95 ± 0.02a	0.90 ± 0.04a	0.96 ± 0.07a	1.04 ± 0.04a	1.02 ± 0.07a
β-sitosterol	86.92 ± 0.10a	87.26 ± 0.06b	85.44 ± 0.15c	85.35 ± 0.03cd	85.16 ± 0.06d	85.82 ± 0.03e	87.66 ± 0.14a	85.92 ± 0.66b	83.75 ± 0.22c	83.81 ± 0.01c	84.70 ± 0.21d	86.37 ± 0.01b	86.42 ± 0.39a	84.82 ± 0.26b
sitostanol	0.60 ± 0.03a	0.63 ± 0.05a	0.56 ± 0.04a	0.38 ± 0.01b	0.39 ± 0.01b	0.38 ± 0.00b	0.64 ± 0.02a	0.44 ± 0.00b	0.41 ± 0.03bc	0.38 ± 0.02ce	0.36 ± 0.01e	0.34 ± 0.07e	0.55 ± 0.04a	0.51 ± 0.08a
Δ5-avenasterol	5.06 ± 0.09a	4.85 ± 0.06b	6.45 ± 0.01c	6.18 ± 0.03d	6.74 ± 0.06e	6.26 ± 0.01d	3.99 ± 0.06a	6.04 ± 0.01bd	6.20 ± 0.04c	6.08 ± 0.06bc	5.94 ± 0.05d	4.81 ± 0.01e	5.76 ± 0.12a	6.67 ± 0.08b
Δ5,24-stigmastadienol	0.78 ± 0.03ae	0.68 ± 0.02b	0.70 ± 0.05abe	1.02 ± 0.00c	0.88 ± 0.02d	0.78 ± 0.04e	0.85 ± 0.01a	0.47 ± 0.66a	0.94 ± 0.02a	0.79 ± 0.00a	0.67 ± 0.01a	0.63 ± 0.02a	0.78 ± 0.10a	1.16 ± 0.02a
Δ7-stigmastenol ^b	0.46 ± 0.02ab	0.45 ± 0.03ab	0.42 ± 0.01a	0.67 ± 0.06c	0.52 ± 0.00bd	0.60 ± 0.03cd	0.50 ± 0.05a	0.51 ± 0.01a	0.50 ± 0.02a	0.44 ± 0.03a	0.51 ± 0.03a	0.45 ± 0.02a	0.39 ± 0.04a	0.48 ± 0.04a
Δ7-avenasterol	0.99 ± 0.01a	0.96 ± 0.01b	1.13 ± 0.00c	1.41 ± 0.02d	1.23 ± 0.01e	1.19 ± 0.01d	0.84 ± 0.03a	1.09 ± 0.01b	1.06 ± 0.00b	1.00 ± 0.00c	0.93 ± 0.02d	0.71 ± 0.00e	0.78 ± 0.02a	1.12 ± 0.05b
app. β-sitosterol ^b	94.40 ± 0.01a	94.47 ± 0.05a	94.13 ± 0.03b	93.86 ± 0.06c	94.09 ± 0.03b	94.14 ± 0.02b	94.16 ± 0.09a	93.90 ± 0.04b	92.33 ± 0.14c	92.04 ± 0.08d	92.58 ± 0.10e	93.16 ± 0.04f	94.54 ± 0.09a	94.17 ± 0.02a
total sterols ^b	1747 ± 7acd	1699 ± 11bd	1695 ± 11bd	1762 ± 4c	1718 ± 16d	1823 ± 19e	1358 ± 40a	1305 ± 0.09b	1296 ± 15b	1446 ± 0c	1297 ± 13cd	1372 ± 1e	1378 ± 12a	1462 ± 25ab

Values are mean ± standard deviation (n = 2). ^aDifferent letters for each parameter indicate significant statistical differences (p < 0.05) among picking dates for each crop year (a-f). ^bLimits established by the current regulation: total sterols ≥ 1000 mg/kg; cholesterol ≤ 0.5 %; brassicasterol ≤ 0.1 %; campesterol ≤ 4.0 %; stigmasterol ≤ campesterol; Δ7-stigmastenol ≤ 0.5 %; app. β-sitosterol ≥ 93.0 %. Values in bold: non-compliance. Not detected = nd.

Table 5. Evolution of sterol composition (%) and total sterols (mg/kg) according to picking date ^a for clone 6 in the crop years 2017, 2018, and 2019.

Parameter	Clone 6(C-6)											
	Crop year 2017				Crop year 2018				Crop year 2019			
	4 Oct	18 Oct	7 Nov	22 Nov	29 Nov	13 Dec	1 Oct	15 Oct	28 Oct	11 Nov	25 Nov	11 Dec
ripening index	0.6	1.2	3.7	3.9	4.4	5.3	0.8	1.8	2.7	2.9	3.7	3.9
cholesterol ^b	0.05 ± 0.00a	0.06 ± 0.01a	0.07 ± 0.00ab	0.07 ± 0.01ab	0.08 ± 0.02bc	0.09 ± 0.00c	0.07 ± 0.02a	0.10 ± 0.02a	0.09 ± 0.01a	0.08 ± 0.00a	0.12 ± 0.00a	0.10 ± 0.01a
brassicasterol ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
24-methylene-cholesterol	0.01 ± 0.02a	0.04 ± 0.01ab	0.06 ± 0.01ac	0.08 ± 0.02cd	0.08 ± 0.00cd	0.10 ± 0.01d	0.04 ± 0.02ab	0.03 ± 0.00a	0.05 ± 0.01ab	0.05 ± 0.01ab	0.06 ± 0.01b	0.07 ± 0.01b
campesterol ^b	3.59 ± 0.04a	3.45 ± 0.03b	3.52 ± 0.00b	3.47 ± 0.03b	3.46 ± 0.01b	3.30 ± 0.02c	3.37 ± 0.11b	3.26 ± 0.02ab	3.14 ± 0.01a	3.33 ± 0.01b	3.27 ± 0.00b	3.33 ± 0.02b
campestanol	0.35 ± 0.01ab	0.37 ± 0.02a	0.33 ± 0.01b	0.35 ± 0.02ab	0.36 ± 0.00ab	0.34 ± 0.00ab	0.37 ± 0.00a	0.36 ± 0.00a	0.40 ± 0.04a	0.36 ± 0.03a	0.44 ± 0.06a	0.32 ± 0.01a
stigmasterol ^b	0.54 ± 0.01a	0.47 ± 0.01b	0.60 ± 0.00c	0.56 ± 0.03ac	0.58 ± 0.00bc	0.83 ± 0.01d	0.47 ± 0.01a	0.81 ± 0.01b	2.13 ± 0.00c	2.32 ± 0.01d	2.17 ± 0.02e	2.21 ± 0.02e
clerosterol	1.07 ± 0.01a	1.02 ± 0.01ab	0.99 ± 0.01bc	0.92 ± 0.05d	0.95 ± 0.01cd	0.93 ± 0.00d	1.02 ± 0.01a	1.06 ± 0.00b	1.01 ± 0.01a	1.01 ± 0.01a	0.96 ± 0.02c	0.95 ± 0.02c
β-sitosterol	88.90 ± 0.01a	87.35 ± 0.05b	85.86 ± 0.08c	86.23 ± 0.08c	85.68 ± 0.01c	85.62 ± 0.16c	89.36 ± 0.09a	87.05 ± 0.23b	84.68 ± 0.43c	86.32 ± 0.20bd	85.92 ± 0.34d	86.83 ± 0.16d
sitosterol	0.79 ± 0.02a	0.70 ± 0.03b	0.60 ± 0.02c	0.48 ± 0.00d	0.48 ± 0.01d	0.47 ± 0.00d	0.67 ± 0.02a	0.58 ± 0.01b	0.50 ± 0.00c	0.46 ± 0.02c	0.44 ± 0.06c	0.42 ± 0.01c
Δ5-avenasterol	2.93 ± 0.04a	4.46 ± 0.10b	5.87 ± 0.06cd	5.65 ± 0.22c	6.07 ± 0.00d	6.42 ± 0.09e	2.74 ± 0.13a	4.37 ± 0.08b	5.53 ± 0.25c	4.29 ± 0.12b	4.94 ± 0.08d	4.25 ± 0.23bd
Δ5,24-stigmastadienol	0.62 ± 0.03a	0.76 ± 0.02c	0.67 ± 0.05ab	0.77 ± 0.01cd	0.84 ± 0.01d	0.70 ± 0.05bc	0.57 ± 0.03a	0.77 ± 0.02b	0.81 ± 0.07b	0.61 ± 0.05c	0.61 ± 0.05c	0.51 ± 0.01c
Δ7-stigmasterol ^b	0.43 ± 0.01a	0.41 ± 0.01a	0.44 ± 0.04a	0.42 ± 0.03a	0.41 ± 0.01a	0.33 ± 0.01b	0.49 ± 0.05a	0.51 ± 0.03a	0.54 ± 0.00a	0.36 ± 0.03b	0.36 ± 0.03b	0.34 ± 0.02b
Δ7-avenasterol	0.72 ± 0.04a	0.91 ± 0.01bc	0.99 ± 0.01cd	1.02 ± 0.08d	1.00 ± 0.02cd	0.88 ± 0.01b	0.83 ± 0.01a	1.05 ± 0.03b	1.07 ± 0.06b	0.77 ± 0.01ac	0.70 ± 0.01cd	0.64 ± 0.03d
app. β-sitosterol ^b	94.30 ± 0.04a	94.29 ± 0.05a	93.99 ± 0.03b	94.04 ± 0.04b	94.02 ± 0.01b	94.13 ± 0.02c	94.36 ± 0.10a	93.83 ± 0.11b	92.53 ± 0.11c	92.69 ± 0.02cd	92.87 ± 0.13d	93.00 ± 0.04d
total sterols ^b	1764 ± 3a	1662 ± 20b	1814 ± 1c	1694 ± 33b	1740 ± 16a	1764 ± 2a	1595 ± 6a	1411 ± 8a	1339 ± 10a	1482 ± 10a	1314 ± 190a	1529 ± 24a

Values are mean ± standard deviation (n = 2). ^aDifferent letters for each parameter indicate significant statistical differences (p < 0.05) among picking dates for each crop year (a-f). ^bLimits established by the current regulation: total sterols ≥ 1000 mg/kg; cholesterol ≤ 0.5 %; brassicasterol ≤ 0.1 %; campesterol ≤ 4.0 %; stigmasterol ≤ campesterol; Δ7-stigmasterol ≤ 0.5 %; app. β-sitosterol ≥ 93.0 %. Values in bold: non-compliance. Not detected = nd.

Table 6. Evolution of sterol composition (%) and total sterols (mg/kg) according to picking date ^a for clone “Std” in the crop years 2017, 2018, and 2019.

Parameter	Clone “Std” (C-Std)											
	Crop year 2017				Crop year 2018				Crop year 2019			
	4 Oct	18 Oct	7 Nov	22 Nov	29 Nov	13 Dec	1 Oct	15 Oct	28 Oct	11 Nov	25 Nov	11 Dec
ripening index	1.6	3.4	4.0	4.1	4.5	5.4	1.1	2.0	2.8	3.3	3.3	4.0
cholesterol ^b	0.09 ± 0.01a	0.09 ± 0.01a	0.08 ± 0.01a	0.06 ± 0.01a	0.06 ± 0.01a	0.07 ± 0.00a	0.09 ± 0.05a	0.09 ± 0.01a	0.07 ± 0.01a	0.15 ± 0.00a	0.10 ± 0.01a	0.08 ± 0.04a
brassicasterol ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
24-methylene-cholesterol	0.05 ± 0.01a	0.05 ± 0.00a	0.06 ± 0.01a	0.07 ± 0.01a	0.05 ± 0.00a	0.08 ± 0.01a	0.04 ± 0.00a	0.07 ± 0.01abc	0.06 ± 0.01ab	0.08 ± 0.02bc	0.12 ± 0.00d	0.10 ± 0.01cd
campesterol ^b	3.21 ± 0.01a	2.99 ± 0.01b	3.06 ± 0.00c	3.04 ± 0.00d	2.99 ± 0.00b	2.94 ± 0.01e	3.46 ± 0.00a	3.17 ± 0.01b	3.16 ± 0.02bc	3.12 ± 0.01c	3.16 ± 0.02bc	3.33 ± 0.00d
campestanol	0.46 ± 0.00a	0.43 ± 0.01b	0.42 ± 0.00b	0.34 ± 0.01c	0.31 ± 0.01d	0.33 ± 0.01cd	0.39 ± 0.01a	0.42 ± 0.04a	0.41 ± 0.00a	0.41 ± 0.00a	0.42 ± 0.01a	0.40 ± 0.05a
stigmasterol ^b	0.55 ± 0.00a	0.65 ± 0.00b	0.85 ± 0.00c	0.81 ± 0.02d	0.88 ± 0.02e	0.74 ± 0.01f	0.72 ± 0.02a	0.86 ± 0.11a	1.90 ± 0.05b	2.75 ± 0.03c	2.56 ± 0.00d	2.54 ± 0.03d
clerosterol	0.99 ± 0.00a	0.96 ± 0.00ab	0.95 ± 0.00ab	0.93 ± 0.05bc	0.92 ± 0.01bc	0.89 ± 0.00c	1.23 ± 0.03a	1.07 ± 0.13a	1.10 ± 0.05a	1.02 ± 0.08a	0.97 ± 0.01a	1.06 ± 0.02a
β-sitosterol	87.10 ± 0.15a	86.03 ± 0.02b	85.59 ± 0.02c	84.92 ± 0.06 ^a	85.99 ± 0.10b	85.79 ± 0.02c	88.03 ± 0.14a	85.63 ± 0.39b	84.89 ± 0.07c	84.27 ± 0.16d	84.87 ± 0.12c	85.63 ± 0.33b
sitosterol	0.63 ± 0.01a	0.47 ± 0.01a	0.43 ± 0.00a	0.38 ± 0.17a	0.40 ± 0.03a	0.37 ± 0.00a	0.73 ± 0.01a	0.58 ± 0.01b	0.49 ± 0.09bc	0.43 ± 0.03c	0.51 ± 0.01bc	0.42 ± 0.03c
Δ5-avenasterol	4.76 ± 0.10a	5.95 ± 0.01b	6.10 ± 0.02bc	6.35 ± 0.25cd	5.80 ± 0.11b	6.47 ± 0.00d	3.17 ± 0.05a	5.68 ± 0.06b	5.68 ± 0.07b	5.58 ± 0.07bc	5.49 ± 0.03c	4.85 ± 0.05d
Δ5,24-stigmastadienol	0.66 ± 0.02a	0.80 ± 0.01b	0.80 ± 0.00b	0.91 ± 0.04c	0.76 ± 0.00bd	0.74 ± 0.00d	0.83 ± 0.03a	0.98 ± 0.05a	0.84 ± 0.07a	0.80 ± 0.00a	0.69 ± 0.12a	0.56 ± 0.27a
Δ7-stigmasterol ^b	0.49 ± 0.07a	0.47 ± 0.01a	0.51 ± 0.03a	0.60 ± 0.01b	0.66 ± 0.02b	0.51 ± 0.01a	0.52 ± 0.01a	0.45 ± 0.01b	0.40 ± 0.04bc	0.43 ± 0.02b	0.39 ± 0.03bc	0.35 ± 0.03c
Δ7-avenasterol	1.00 ± 0.00a	1.10 ± 0.01b	1.14 ± 0.01c	1.24 ± 0.03d	1.18 ± 0.01e	1.07 ± 0.02b	0.79 ± 0.00a	1.04 ± 0.04b	0.98 ± 0.05b	0.96 ± 0.01b	0.73 ± 0.02ac	0.65 ± 0.05c
app. β-sitosterol ^b	94.14 ± 0.06a	94.21 ± 0.01a	93.87 ± 0.04ab	93.49 ± 0.47b	93.86 ± 0.00ab	94.26 ± 0.01a	93.99 ± 0.07a	93.93 ± 0.16a	92.99 ± 0.08b	92.10 ± 0.03c	92.53 ± 0.01d	92.53 ± 0.07d
total sterols ^b	1294 ± 10a	1331 ± 4ab	1366 ± 4b	1748 ± 28c	1776 ± 4c	1772 ± 23c	1489 ± 31a	1487 ± 35a	1346 ± 8b	1314 ± 16bc	1279 ± 34c	1429 ± 18a

Values are mean ± standard deviation (n = 2). ^aDifferent letters for each parameter indicate significant statistical differences (p < 0.05) among picking dates for each crop year (a-f). ^bLimits established by the current regulation: total sterols ≥ 1000 mg/kg; cholesterol ≤ 0.5 %; brassicasterol ≤ 0.1 %; campesterol ≤ 4.0 %; stigmasterol ≤ campesterol; Δ7-stigmasterol ≤ 0.5 %; app. β-sitosterol ≥ 93.0 %. Values in bold: non-compliance. Not detected = nd.

Table 7. Evolution of sterol composition (%) and total sterols (mg/kg) according to picking date ^a for clones 4 and 7 in the crop year 2018.

Parameter	Clone 4 (C-4)						Clone 7 (C-7)					
	Crop year 2018						Crop year 2018					
	1 Oct	15 Oct	28 Oct	11 Nov	25 Nov	11 Dec	1 Oct	15 Oct	28 Oct	11 Nov	25 Nov	11 Dec
ripening index	1.0	1.6	2.4	2.7	3.3	3.7	1.0	1.7	2.6	2.7	3.4	3.7
cholesterol ^b	0.10 ± 0.01a	0.11 ± 0.01a	0.08 ± 0.03a	0.09 ± 0.01a	0.10 ± 0.00a	0.09 ± 0.01a	0.09 ± 0.02a	0.08 ± 0.00a	0.09 ± 0.01a	0.09 ± 0.01a	0.09 ± 0.00a	0.08 ± 0.01a
brassicasterol ^b	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
24-methylene-cholesterol	0.03 ± 0.01a	0.04 ± 0.00ab	0.07 ± 0.01b	0.05 ± 0.01ab	0.10 ± 0.00c	0.06 ± 0.00b	0.02 ± 0.00a	0.04 ± 0.01ab	0.06 ± 0.00bc	0.06 ± 0.02bce	0.08 ± 0.00ce	0.10 ± 0.03e
campesterol ^b	3.43 ± 0.01a	3.30 ± 0.05bc	3.17 ± 0.01c	3.37 ± 0.06ab	3.18 ± 0.02c	3.26 ± 0.02c	3.54 ± 0.03a	3.40 ± 0.03b	3.27 ± 0.01c	3.45 ± 0.01b	3.33 ± 0.01d	3.54 ± 0.02a
campestanol	0.41 ± 0.04a	0.42 ± 0.06a	0.50 ± 0.10a	0.46 ± 0.07a	0.46 ± 0.01a	0.44 ± 0.00a	0.40 ± 0.01a	0.42 ± 0.04a	0.43 ± 0.01a	0.38 ± 0.02a	0.41 ± 0.02a	0.40 ± 0.01a
stigmastanol ^b	0.71 ± 0.01a	0.98 ± 0.02b	2.26 ± 0.02c	2.70 ± 0.04d	2.95 ± 0.02e	2.82 ± 0.02f	0.59 ± 0.04a	0.71 ± 0.00a	2.03 ± 0.01b	2.42 ± 0.26c	2.80 ± 0.04d	2.32 ± 0.05c
clerosterol	1.16 ± 0.07a	1.13 ± 0.02a	1.10 ± 0.15a	1.02 ± 0.02a	0.99 ± 0.02a	0.96 ± 0.01a	1.09 ± 0.04a	1.08 ± 0.02ab	1.03 ± 0.02bc	1.03 ± 0.00b	0.97 ± 0.00cd	0.95 ± 0.04d
β-sitosterol	88.75 ± 0.49a	86.72 ± 0.02b	84.70 ± 0.27c	86.00 ± 0.09d	84.92 ± 0.14c	85.83 ± 0.14d	88.98 ± 0.22a	87.72 ± 0.11b	85.78 ± 0.02c	86.85 ± 0.43d	85.84 ± 0.05c	87.34 ± 0.14bd
sitosterol	0.72 ± 0.01a	0.65 ± 0.03b	0.54 ± 0.06c	0.47 ± 0.02cd	0.36 ± 0.02e	0.42 ± 0.02de	0.75 ± 0.04a	0.59 ± 0.02b	0.48 ± 0.02c	0.46 ± 0.06cd	0.43 ± 0.04cd	0.39 ± 0.00d
Δ5-avenasterol	2.89 ± 0.07a	4.66 ± 0.07b	5.59 ± 0.08c	4.13 ± 0.12d	5.32 ± 0.06e	4.57 ± 0.12b	2.74 ± 0.00a	3.93 ± 0.01b	4.78 ± 0.00c	3.81 ± 0.09d	4.58 ± 0.05e	3.65 ± 0.03f
Δ5,24-stigmastadienol	0.54 ± 0.13a	0.57 ± 0.08a	0.65 ± 0.06a	0.59 ± 0.03a	0.65 ± 0.01a	0.58 ± 0.04a	0.59 ± 0.11a	0.76 ± 0.06a	0.71 ± 0.00a	0.51 ± 0.11a	0.56 ± 0.01a	0.52 ± 0.06a
Δ7-stigmastanol ^b	0.51 ± 0.04a	0.50 ± 0.07a	0.47 ± 0.02ab	0.39 ± 0.0bc	0.35 ± 0.05c	0.33 ± 0.02c	0.48 ± 0.04a	0.44 ± 0.01ab	0.42 ± 0.01b	0.32 ± 0.02c	0.32 ± 0.00c	0.23 ± 0.02e
Δ7-avenasterol	0.67 ± 0.04a	0.86 ± 0.01b	0.84 ± 0.01b	0.73 ± 0.04c	0.61 ± 0.01a	0.63 ± 0.02a	0.66 ± 0.01a	0.77 ± 0.01b	0.85 ± 0.00c	0.61 ± 0.04d	0.57 ± 0.02d	0.47 ± 0.01e
app. β-sitosterol ^b	94.08 ± 0.19a	93.75 ± 0.03b	92.58 ± 0.20c	92.20 ± 0.07d	92.24 ± 0.01d	92.36 ± 0.05cd	94.16 ± 0.11a	94.08 ± 0.04a	92.78 ± 0.00b	92.66 ± 0.29bc	92.38 ± 0.03c	92.84 ± 0.14b
total sterols ^b	1363 ± 67a	1220 ± 7b	1158 ± 61b	1216 ± 56b	1191 ± 2b	1251 ± 13b	1456 ± 4a	1290 ± 31b	1255 ± 15b	1376 ± 8b	1365 ± 14b	1406 ± 63b

Values are mean ± standard deviation (n = 2). ^aDifferent letters for each parameter indicate significant statistical differences ($p < 0.05$) among picking dates for each crop year (a-f). ^bLimits established by the current regulation: total sterols ≥ 1000 mg/kg; cholesterol ≤ 0.5 %; brassicasterol ≤ 0.1 %; campesterol ≤ 4.0 %; stigmastanol ≤ 0.5 %; app. β-sitosterol ≥ 93.0 %. Values in bold: non-compliance. Not detected = nd.

In terms of sterol composition, most of the sterols we analyzed presented significant differences according to olive maturity. The evolution of each individual sterol was highly variable (Tables 3–7), but coincided with the most widely observed patterns collected and discussed by Lukić et al. [56] in several monovarietal oils. In general, in our study, the net change in relative β -sitosterol content was slightly negative at the end of the sampling period (December). During the initial sampling period (October and early November), initial β -sitosterol content decreased and stabilized until mid-December, the last sampling date. In the 2019 harvest, this behavior differed in “Std” and Clone 6, as β -sitosterol relative levels increased in those two clone types in December. The changes we observed in the β -sitosterol pattern during ripening suggest a modification of the biosynthesis of this sterol or of oil accumulation in the fruit, as its stabilization coincides with the end of the lipogenesis period [56]. Meanwhile, $\Delta 5$ -avenasterol showed a trend that was inverse to β -sitosterol, as indicated by the strong negative correlation obtained among those two sterols ($r = -0.902$, $p < 0.01$), likewise observed in other monovarietal oils from several countries [6,32,57,58]. In our study, $\Delta 5$ -avenasterol increased by 30% on average during the sampling period, but its evolution was different in 2019, as occurred with β -sitosterol. During that year, a decrease in initial $\Delta 5$ -avenasterol content was predominant, especially in the oils coming from Clone 6. In line with this, Gutiérrez et al. [38] have already hypothesized that the enzymatic activity that regulates the β -sitosterol/ $\Delta 5$ -avenasterol ratio was the cause of the high correlation they observed in their study. Indeed, $\Delta 5$ -avenasterol is the precursor in the biosynthesis of β -sitosterol [52,59]. Several other authors [26,60] indicate that the β -sitosterol/ $\Delta 5$ -avenasterol ratio can decrease as fruit ripening progresses due to the decrease in the proportion of oil to stone, which is rich in β -sitosterol, but poor in $\Delta 5$ -avenasterol. Fernández-Cuesta et al. [50] have ruled out the latter hypothesis by observing significant changes in both sterols directly in the pulp as the fruit ripened, thereby confirming that the activity of the enzymes involved in the biosynthesis of both sterols was responsible for the differences in their contents. This hypothesis would explain the high negative correlation we found between the two compounds. Other studies have found no significant differences between oils obtained from whole fruit versus oils obtained exclusively from olive pulp [26,60]. Figure 2A shows the

evolution of the β -sitosterol/ Δ 5-avenasterol ratio in the olive oils obtained in our investigation over the three years of study.

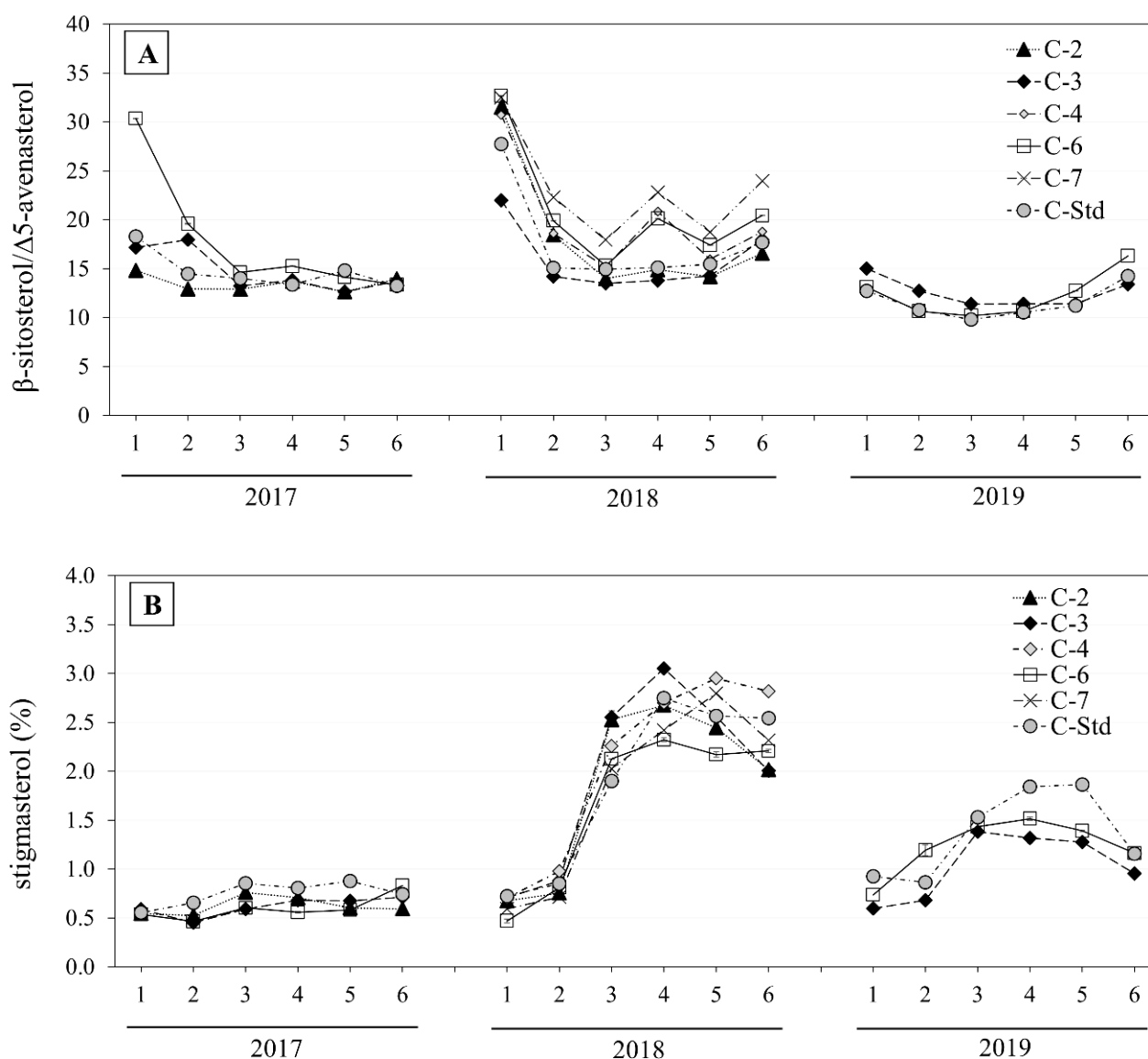


Figure 2. Evolution of the ratio of β -sitosterol/ Δ 5-avenasterol (A) and stigmasterol (B) by clone (C-2, C-3, C-4, C-6, C-7 and C-Std) throughout sampling in the 2017, 2018, and 2019 crop years. Harvest dates: 1 (1–4 October), 2 (16–18 October), 3 (28 October–7 November), 4 (11–22 November), 5 (25–29 November) and 6 (11–13 December).

Relative campesterol content decreased slightly during sampling [47,61] (Tables 3–7). Although this was the prevalent trend, a relative uniformity was likewise observed [29,38,61], especially in the 2018 crop year. As for stigmasterol, most of the studies reported in the review by Lukić et al. [56] describe an increase in its content, especially in the later stages of ripening, although that increase is not significant (as opposed to our results).

However, the study of the effect of ripening on stigmasterol content presented difficulties in our trial. This sterol's increase varied considerably, depending on the crop year (Figure 2B), which caused a high dispersion in our set of results. The highest average increases observed during the overall sampling period were in 2018 (72%) and 2019 (31%). Intense increases in late October-early November were observed during 2018 and 2019, after which they stabilized or slightly decreased in December. The increase in stigmasterol was so pronounced in mid-autumn 2018 that it implied regulatory non-compliance for the parameter for apparent β -sitosterol [12–14] throughout that sampling period (values in bold in Tables 3–7). The corresponding increment was lower in the crop year 2017 (22%). The possible relation we observed between stigmasterol and apparent β -sitosterol was confirmed by their high negative correlation ($r = -0.975$; $p < 0.01$). This association has previously been reported in Empeltre [21] and other cultivars [29,33,35]. In contrast, there was no significant correlation with β -sitosterol, although it is the precursor in the biosynthesis of stigmasterol [52,59]. Certain authors have related the stigmasterol content in olive oil with fruit quality and therefore, with olive oil quality, confirming a positive correlation between high acidity and the amount of stigmasterol [21,62]. No such relationship was found in our investigation, as the olive oils we studied had very low acidity (Table 1), which indicated satisfactory olive health.

No correlation was observed between fruit ripening and the parameter for apparent β -sitosterol.

The effect of ripeness on the relative amounts of minority sterols was varied. Cholesterol remained relatively constant, but 24-methylene-cholesterol, an intermediate metabolite in the synthesis of campesterol, increased significantly. Other minority sterols, such as Δ^7 -stigmasterol and Δ^7 -avenasterol, were not affected by fruit ripening (Table 2), but showed significant differences in terms of crop year \times maturity interaction. Those two Δ^7 -sterols, which correlated positively with each other [37] ($r = 0.793$, $p < 0.01$), displayed parallel trends throughout ripening, according to the year under study (upward in 2017, downward in 2018, and relatively constant in 2019). Sitostanol, one of the main stanols in olive oil (a hydrogenated form of β -sitosterol, its precursor), decreased drastically

throughout the sampling. This sterol was the only one which correlated significantly with the ripening index ($r = -0.866$; $p < 0.01$). Sakouhi et al. [37] ascribed the decrease in the stanols sitostanol and campestanol to their conversion into brassinosteroids, i.e., steroid hormones that regulate plant growth and development.

4.2.4.4. Changes in Sterol Composition by Crop Year Effect

Although our study did not directly address environmental factors, such as temperature, solar radiation (UV), precipitation, or humidity, these, among other aspects, could have been responsible for the significant interannual differences observed in sterol composition. Recent studies reported by Du et al. [53] indicate that enzymes involved in the sterol biosynthesis pathway are key in plant responses to abiotic stress. Drought is the most persistent and therefore, the most studied abiotic stress in olives, although high temperatures and UV-B radiation activate adaptive mechanisms that are not well known [55]. Such environmental factors have been scarcely addressed directly in relation to the modulation of sterol composition in olive fruit, and thus also in olive oil, although their influence has been demonstrated [26,55]. Many further studies have evidenced the effect of the environment in trials conducted at geographical locations with different climatic characteristics [24,27,28,34,35,48].

The oils from crop year 2017 had the highest sterol concentration and the highest relative contents of Δ^7 -stigmastenol and Δ^7 -avenasterol, but the lowest contents of stigmasterol. The 2017 autumn harvest was characterized by extreme drought (16 mm of autumn rainfall only), combined with the widest thermal oscillation and the lowest minimum temperatures (Figure 1): all these factors caused a substantial loss of moisture in the fruit [63]. In contrast, the autumn of 2018 was extremely rainy (10 times more rainfall than in autumn 2017) and had the narrowest thermal oscillation. Immediately after the high precipitation period in October 2018, olive oils had the highest stigmasterol amounts, but lower percentages of Δ^5 -avenasterol and apparent β -sitosterol (resulting in non-compliant samples; values in bold in Tables 3–7). Among the three crop years we studied, this circumstance only occurred in 2018. The lowest relative amounts of β -sitosterol, but the highest of Δ^5 -avenasterol, were observed in the 2019 season. Summer and autumn of 2019

had higher average and maximum temperatures, although these differences were not pronounced compared to the conditions in 2018.

In line with these results, several authors have likewise described an increase in stigmasterol associated with greater water availability in Empeltre [24] and other cultivars [64,65]; however, Guillaume et al. [26] described lower stigmasterol and apparent β -sitosterol in association with higher levels of irrigation in Australian oils. On the other hand, higher contents of Δ^7 -stigmastenol and total sterols have been described in regions or seasons with low rainfall, or even in studies featuring irrigation deficit in Empeltre [21] and other cultivars [26,27,64], in line with our results. Figure 3 clearly shows the influence of crop year on compliance with the regulatory limit for Δ^7 -stigmastenol (0.5%). A variation in sterol content associated with water treatments is not evident; a significant decrease in sterol concentration has been described [64,65], but inconsistency can also be noted in results [66] stemming from irrigated cultivars. The direct influence of temperature on sterol composition in olive fruit and olive oils has been less studied. Hamze et al. [36] conducted temperature-controlled experiments using open chambers. Their experiments reported an increase in sterol concentration caused by a moderate increment in air temperature (3–4 °C), in contrast with our study. That increment also induced an increase in stigmasterol, whereas apparent β -sitosterol and Δ^5 -avenasterol decreased. Those results are in line with Piravi-Vanak et al. [34], who reported that cold climate regions generate oils with higher β -sitosterol and lower stigmasterol content.

4.2.4.5. Changes in Sterol Composition According to Clonal Type

No significant differences were observed for most sterols in regard to clone type (Table 2). Δ^7 -stigmastenol, and especially campesterol, were the most affected sterols among those which showed significant differences. Along with total sterol concentration, Δ^7 -avenasterol and $\Delta^5,24$ -stigmastadienol displayed significant differences, but with low effect. Results from Arbequina [24,67] and Empeltre [46,67] clonal selections yielded significant differences in very few parameters caused by clone type in olive fruit and/or olive oil.

Several studies have reported a considerable genetic influence on campesterol content [20,26,29,32], thereby corroborating the pronounced influence of clone type on this sterol in olive oils. In our study, Clone 6 presented higher values in this respect than the other clones.

Figure 3 shows the effects of clone type on $\Delta 7$ -stigmastenol. Most $\Delta 7$ -stigmastenol values were generally high; the “Std” Clone and Clone 2 had the highest rate of non-compliances, and most of these could be observed in 2017. In contrast, Clone 6 displayed the lowest values for this sterol. This clonal characteristic should be taken into account by producers who want to select clones for olive oils whose authenticity is not called into question.

4.2.4.6. Discriminant Analysis

We applied a canonical discriminant analysis to visualize the discrimination capacity of the sterol composition of the Empeltre olive oils under study. The grouping variable “crop year” was the one displaying the best classifying ability (94.9% of the oils were classified correctly). The six most discriminating variables were total sterols, $\Delta 5,24$ -stigmastadienol, $\Delta 7$ -avenasterol, $\Delta 5$ -avenasterol, stigmasterol, and campesterol.

Figure 4 shows the 78 samples projected onto a biplot defined by the two canonical discriminant functions that explained 100% of the total variation ($p < 0.001$). The classification results (Table 8) show an effective separation between the three years under study based on sterol composition. The year 2017 showed greater differentiation compared to the other two years. According to Canonical Discriminant Function 1 (63.9% of the total variance), the 2018 samples were differentiated by higher β -sitosterol and campesterol contents, but lower $\Delta 5$ -avenasterol compared to 2019. Canonical Discriminant Function 2 (36.1% of the total variance) differentiated the years 2018 and 2019 versus 2017 by higher stigmasterol but lower total sterols, apparent β -sitosterol, and $\Delta 7$ -stigmastenol.

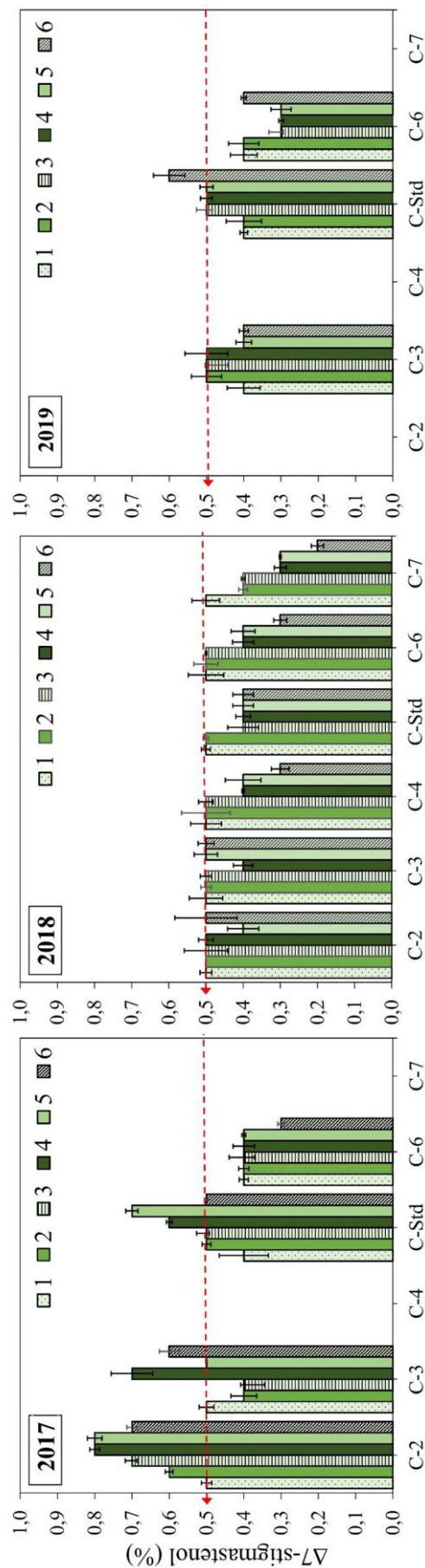


Figure 3. Evolution of Δ^7 -stigmastenol (%) according to harvest date and clone (C-2, C-3, C-4, C-6, C-7, and C-Std) in the three crop years studied (2017, 2018, and 2019). Harvest dates: 1 (1–4 October), 2 (16–18 October), 3 (28 October–7 November), 4 (11–22 November), 5 (25–29 November), and 6 (11–13 December). Non-compliance norm: Δ^7 -stigmastenol > 0.05 (%). Red arrow: limit established by the current EU/IOC/CODEX regulatory for OOV for Δ^7 -stigmastenol \leq 0.5 %.

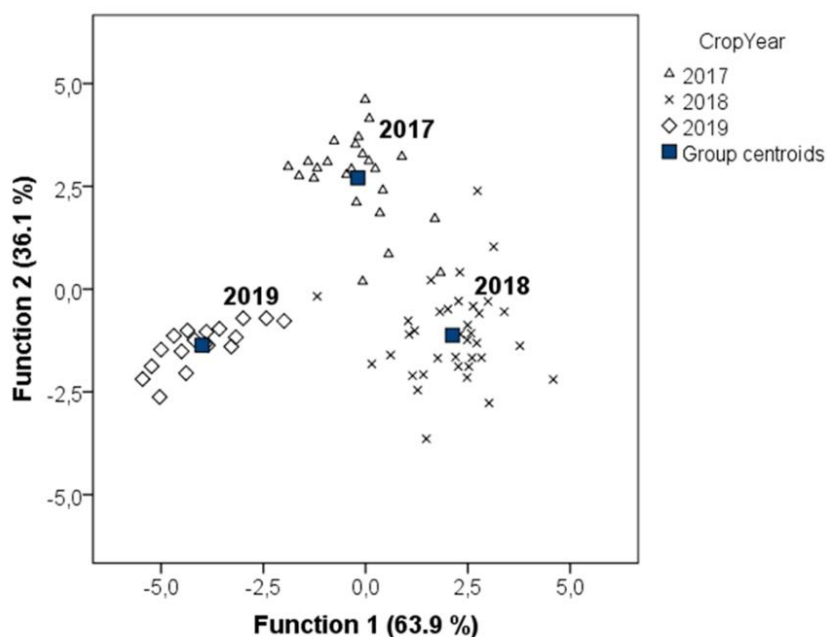


Figure 4. Canonical discriminant functions biplot and centroids of crop years obtained from sterols composition.

Table 8. Combined within-group correlations between discriminant variables and standardized canonical discriminant functions and eigenvalues.

Parameters	Function 1	Function 2
$\Delta 5,24$ -stigmastadienol ^a	-0.469 ^b	-0.006
$\Delta 5$ -avenasterol ^a	-0.398 ^b	0.064
24-methylene-cholesterol	-0.337 ^b	-0.213
β -sitosterol	0.256 ^b	0.108
sitostanol	0.140 ^b	0.013
campesterol ^a	0.136 ^b	-0.077
total sterols ^a	-0.117	0.627 ^b
stigmasterol ^a	0.192	-0.406 ^b
$\Delta 7$ -avenasterol ^a	-0.125	0.374 ^b
app. <i>B</i> -sitosterol	-0.200	0.357 ^b
$\Delta 7$ -stigmastenol	0.020	0.342 ^b
cholesterol	-0.079	-0.170 ^b
eigenvalues	6.014	3.395
% variance	63.9	36.1
canonical correlation	0.926	0.879

4.2.5. Conclusions

The results presented in this study regarding the characterization of sterol composition in Empeltre olive oils have revealed high percentages of non-compliances vis-

à-vis official regulations that determine an olive oil's presumed authenticity. In general, sterols were mainly affected by harvest year and less by degree of ripening. The least significant effect was clone type, although this latter factor exerted the most pronounced effect on campesterol and Δ^7 -stigmasterol. The high Δ^7 -stigmastenol content observed in the Empeltre olive oils in our study reinforces the hypothesis regarding varietal peculiarity raised previously. However, the non-compliances we detected in this sterol could be caused by particular environmental factors associated with crop year, as revealed by the results of canonical discriminant analysis (DA). Environmental factors could also be responsible for the non-compliance rate of apparent β -sitosterol, which is affected by an increase in stigmasterol content.

Our results suggest that commercial standards should generally take natural variations in sterol composition into account with the purpose of avoiding economic damage to certain producers whose single-varietal olive oils have abnormal sterol content, while still ensuring that consumers are protected from fraud.

Author Contributions: Conceptualization, A.C.S.-G. and R.R.-G.; methodology, R.R.-G.; data curation, R.R.-G.; formal analysis, A.C.S.-G. and R.R.-G.; investigation, R.R.-G.; writing—original draft preparation, R.R.-G.; writing—review and editing, A.C.S.-G. and R.R.-G.; supervision, A.C.S.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: Rey-Giménez is grateful for the collaboration of the Centro de Transferencia Agroalimentaria (Aragon Government) for the development of this study, especially to Diego Laya. A special mention to the technical team of Aceites, Grasas, y Lácteos Area of the Laboratorio Agroambiental (Aragon Government) for their excellent technical and human support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

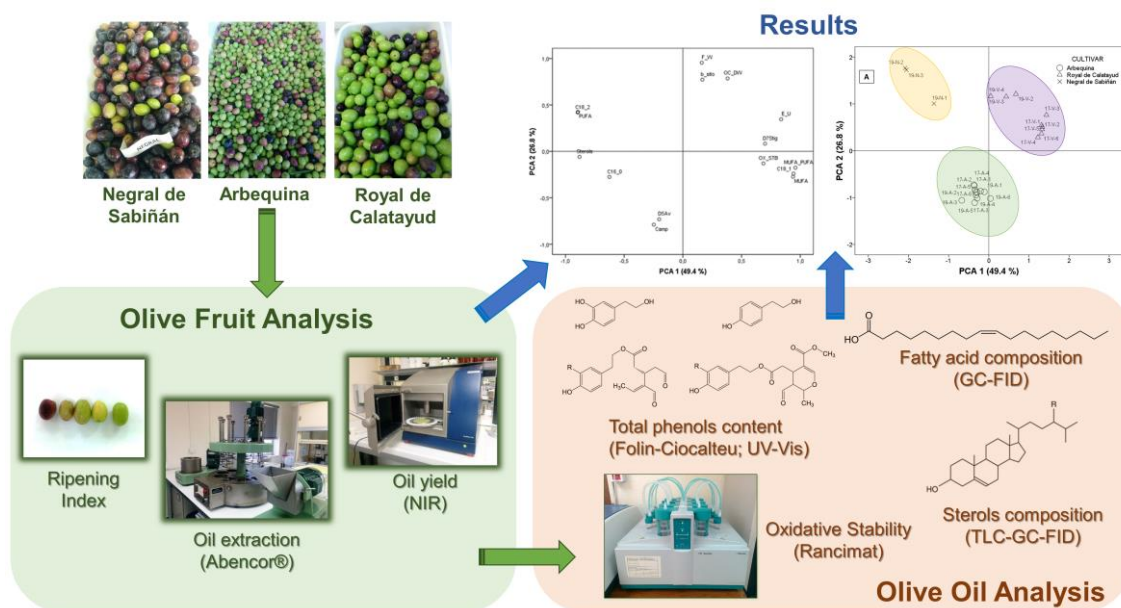
4.2.6. References

1. López-Miranda, J.; Pérez-Jiménez, F.; Ros, E.; De Caterina, R.; Badimón, L.; Covas, M.I.; Escrich, E.; Ordovás, J.M.; Soriguer, F.; Abia, R.; et al. Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and Córdoba, Spain, 2008. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* **2010**, *20*, 284–294.
2. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to olive oil and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID1316, 1332), maintenance of normal (fasting) blood concentrations of triglycerides (ID 1316, 1332), maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1316, 1332) and maintenance of normal blood glucose concentrations (ID 4244) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J.* **2011**, *9*, 2044–2062.
3. Mele, M.A.; Islam, M.Z.; Kang, H.M.; Giuffrè, A.M. Pre-and post-harvest factors and their impact on oil composition and quality of olive fruit. *Emir. J. Food Agric.* **2018**, *30*, 592–603.
4. Gharbi, I.; Issaoui, M.; Mehri, S.; Cheraief, I.; Sifi, S.; Hammami, M. Agronomic and Technological Factors Affecting Tunisian Olive Oil Quality. *Agric. Sci.* **2015**, *6*, 513–526.
5. Giuffrè, A.M.; Louadj, L.; Poiana, M.; Macario, A. Composition en 216haract des huiles extraites d'olives de cultivars de la province de Reggio Calabria (Sud d'Italie). *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **2012**, *89*, 177–183.
6. Beltrán, G.; Del Rio, C.; Sánchez, S.; Martínez, L. Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from cv. Picual. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3434–3440.
7. Beltrán, G.; Aguilera, M.P.; Rio, C.; Del, Sanchez, S.; Martinez, L. Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chem.* **2005**, *89*, 207–215.
8. Giuffrè, A.M. The effects of cultivar and harvest year on the fatty alcohol composition of olive oils from Southwest Calabria (Italy). *Grasas Aceites* **2014**, *65*, e011.
9. Giuffrè, A.M. Influence of harvest year and cultivar on wax composition of olive oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2013**, *115*, 549–555.
10. International Olive Council (IOC). Available online: <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/> (accessed on 22 May 2022).
11. European Union Commission. 2020 Annual Report: The EU Agri-Food Fraud Network and the Administrative Assistance and Cooperation System; European Union Commission: Brussels, Belgium, 2021; pp. 1–21.
12. Consolidated Text. Commission Regulation 2568/91 of 11 July 1991 on the Characteristics of Olive Oil and Olive-Residue Oil and on the Relevant Methods of Analysis. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/ALL/?uri=CELEX%3A01991R2568-20161204> (accessed on 5 August 2022).
13. International Olive Council (IOC). Trade standard Applying to Olive Oils and Olive Pomace Oils, COI/T.15/NC No 3/Rev.18/2022. Available online: <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/chemistry-standardisation-unit/standards-and-methods/> (accessed on 4 August 2022).
14. Codex Standard 33-1981; Codex Standard for Olive Oils and Olive Pomace Oils. Codex Alimentarius Commission: Rome, Italy. Revised in 1989, 2003, 2015, 2017. Amended in 2009, 2013, 2021
15. García-González, D.L.; Tena, N.; Romero, I.; Aparicio-Ruiz, R.; Morales, M.T.; Aparicio, R. A study of the differences between trade standards inside and outside Europe. *Grasas Aceites* **2017**, *68*, e210.
16. Ceci, L.N.; Carelli, A.A. Characterization of monovarietal Argentinian olive oils from new productive zones. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2007**, *84*, 1125–1136.
17. Cert, A.; Moreda, W.; García Moreno, J. Determinación de esteroides y dialcoholes triterpénicos en aceite de oliva mediante separación de la fracción por cromatografía líquida de alta eficacia y análisis por cromatografía de gases. Estandarización del método analítico. *Grasas Aceites* **1997**, *48*, 207–218.
18. Salvador, M.D.; Aranda, F.; Fregapane, G. Influence of fruit ripening on Cornicabra virgin olive oil quality. A study of four successive crop seasons. *Food Chem.* **2001**, *73*, 45–53.
19. Salvador, M.D.; Aranda, F.; Gómez-Alonso, S.; Fregapane, G. Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: A study of five crop seasons. *Food Chem.* **2003**, *80*, 359–366.
20. Rivera Del Álamo, R.M.; Fregapane, G.; Aranda, F.; Gómez-Alonso, S.; Salvador, M.D. Sterol and alcohol composition of Cornicabra virgin olive oil: The campesterol content exceeds the upper limit of 4% established by EU regulations. *Food Chem.* **2004**, *84*, 533–537.
21. Gracia, M.S. Composición química de distintas calidades de aceites de oliva virgen de la variedad “Empeltre” en el Bajo Aragón. *Grasas Aceites* **2001**, *52*, 52–58.

22. Gracia, M.S.; Royo, A.; Gillen, M. Composición química de aceites de las variedades Arbequina y Empeltre cultivadas en regadío. *Grasas Aceites* **2009**, *60*, 321–329.
23. Tous, J.; Romero, A.; Plana, J.; Espada, J.L.; Gracia, M.S.; Lizar, B.; Rallo, J.; Martorell, A.; Iñiguez, A.; Gracia, J.; et al. Selección clonal de la variedad de olivo “Empeltre” en el Valle del Ebro y Baleares. *Frutic. Prof.* **2006**, *160*, 13–18.
24. Romero, A.; Tous, J.; Gracia, M.S. Fatty acids and sterol composition of “Empeltre” virgin oil in Ebro Valley and Balearic Islands. *Acta Hort.* **2011**, *924*, 385–392.
25. Mailer, R.J.; Ayton, J.; Graham, K. The influence of growing region, cultivar and harvest timing on the diversity of Australian olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2010**, *87*, 877–884.
26. Guillaume, C.; Ravetti, L.; Ray, D.L.; Johnson, J. Technological factors affecting sterols in Australian olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2012**, *89*, 29–39.
27. Li, X.; Flynn, J.D.; Wang, S.C. The effects of variety, growing region, and drought stress on fatty acid and sterol compositions of California olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2019**, *96*, 215–230.
28. Noorali, M.; Barzegar, M.; Sahari, M.A. Sterol and fatty acid compositions of olive oil as an indicator of cultivar and growing area. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2014**, *91*, 1571–1581.
29. Lukić, M.; Lukić, I.; Krapac, M.; Sladonja, B.; Pilizota, V. Sterols and triterpene diols in olive oil as indicators of variety and degree of ripening. *Food Chem.* **2013**, *136*, 251–258.
30. Navas-Lopez, J.F.; León, L.; Trentacoste, E.R.; de la Rosa, R. Multi-environment evaluation of oil accumulation pattern parameters in olive. *Plant Physiol. Biochem.* **2019**, *139*, 485–494.
31. Giuffrè, A.M.; Louadj, L. Influence of crop season and cultivar on sterol composition of monovarietal olive oils in Reggio Calabria (Italy). *Czech J. Food Sci.* **2013**, *31*, 256–263.
32. Sánchez, J.; Osorio, E.; Montaña, A.M.; Martínez, M. Sterol and erythrodiol + uvaol content of virgin olive oils from cultivars of Extremadura (Spain). *Food Chem.* **2004**, *87*, 225–230.
33. Kyçyk, O.; Aguilera, M.P.; Gaforio, J.J.; Jiménez, A. and Beltrán, G. Sterol composition of virgin olive oil of forty-three olive cultivars from the World Collection Olive Germplasm Bank of Cordoba. *J. Sci. Food Agric.* **2016**, *96*, 4143–4150.
34. Piravi-Vanak, Z.; Ghasemi, J.B.; Ghavami, M.; Ezzatpanah, H.; Zolfonoun, E. The influence of growing region on fatty acids and sterol composition of Iranian olive oils by unsupervised clustering methods. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2012**, *89*, 371–378.
35. Temime, S.B.; Manai, H.; Methenni, K.; Baccouri, B.; Abaza, L.; Daoud, D.; Sánchez Casas, J.; Osorio Bueno, E.; Zarrouk, M. Sterolic composition of Chétoui virgin olive oil: Influence of geographical origin. *Food Chem.* **2007**, *110*, 368–374.
36. Hamze, L.; Miserere, A.; Molina, M.S.; Maestri, D.; Searles, P.S.; Rousseaux, M.C. Influence of environmental growth temperature on tocopherol and sterol oil concentrations in olive fruit. *J. Sci. Food Agric.* **2022**, *102*, 2741–2749.
37. Sakouhi, F.; Absalon, C.; Harrabi, S.; Vitry, C.; Sebei, K.; Boukhchina, S.; Fouquet, E.; Kallel, H. Dynamic accumulation of 4-desmethylsterols and phytosterols during ripening of Tunisian Meski olives (*Olea europea* L.). *Food Chem.* **2009**, *112*, 897–902.
38. Gutiérrez, F.; Jiménez, B.; Ruiz, A.; Albi, M.A. Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on the different components involved. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 121–127.
39. Barranco, D.; Trujillo, I.; Rallo, L. Elaiografía Hispánica. In *Variedades de olivo en España*; Barranco, D., Caballero, J.M., Del Río, C., Martín, A., Tous, J., Trujillo, I., Eds.; Junta de Andalucía, MAPA and Mundi Prensa: Madrid, Spain, 2005; pp. 46–231.
40. Romero, A.; Ninot, A.; Hermoso, J.F.; Tous, J.; Clonal selection of Empeltre olive cultivar in Spain. In *VII International Symposium on Olive Growing*; International Society for Horticultural Science: San Juan, Argentina, 2012.
41. Tous, J.; Romero, A.; Plana, J.; Espada, J.L.; Gracia, M.S.; Lizar, B.; Rallo, J.; Martorell, A.; Iñiguez, A.; García, J.; Elguea, J.A. Ficha varietal del cultivar “Empeltre”. *Olivae* **2004**, *102*, 31–32.
42. López, F.; Cabrera, M.; Cuadrat, J.M. La división climática en Aragón. In *Atlas Climático de Aragón*. Ed.; Gobierno de Aragón: Zaragoza, Spain, 2007; pp. 155–166.

43. Hermoso, M.; Uceda, M.; García, A.; Morales, B.; Frías, M.L.; Fernández, A. *Elaboración de Aceite de Oliva de Calidad. Colección: Apuntes, 5/91*; Ed. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía: Sevilla, Spain, 1991.
44. Martínez, J.M.; Muñoz, E.; Alba, J.; Lanzón, A. Informe sobre la utilización del analizador de rendimientos "Abencor". *Grasas Aceites* **1975**, *26*, 379–385.
45. Manai-Djebali, H.; Krichène, D.; Ouni, Y.; Gallardo, L.; Sánchez, J.; Osorio, E.; Douja, D.; Flamini, G.; Arrouk, M. Chemical profiles of five minor olive oil varieties grown in central Tunisia. *J. Food Compost. Anal.* **2012**, *27*, 109–119.
46. Chennit, B.; del Carmen Pérez-Camino, M.; Gómez-Coca, R.B.; Moreda, W.; Boudriche, L.; Madani, K. Characterization of kabylian virgin olive oils according to fatty alcohols, waxes, and fatty acid alkyl esters. *J. Food Meas. Charact.* **2021**, *15*, 4960–4971.
47. Chtourou, F.; Jabeur, H.; Lazzez, A.; Bouaziz, M. Characterization and discrimination of Oueslati virgin olive oils from adult and young trees in different ripening stages using sterols, pigments, and alcohols in tandem with chemometrics. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 3512–3522.
48. Abu-Alruz, K.; Afaneh, I.A.; Quasem, J.M.; Hmidat, M.A.; Abbady, J.; Mazahreh, A. S. Factors affecting 7-stigmastenol in Palestinian olive oil. *Res. J. Appl. Sci.* **2011**, *11*, 797–805.
49. Anastasopoulos, E.; Kalogeropoulos, N.; Kaliora, A.C.; Kountouri, A.; Andrikopoulos, N.K. The influence of ripening and crop year on quality indices, polyphenols, terpenic acids, squalene, fatty acid profile, and sterols in virgin olive oil (Koroneiki cv.) produced by organic versus non-organic cultivation method. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 170–178.
50. Fernández-Cuesta, A.; León, L.; Velasco, L.; De la Rosa, R. Changes in squalene and sterols associated with olive maturation. *Food Res. Int.* **2013**, *54*, 1885–1889.
51. Inês, C.; Corbacho, J.; Paredes, M.A.; Labrador, J.; Cordeiro, A.M.; Gomez-Jimenez, M.C. Regulation of sterol content and biosynthetic gene expression during flower opening and early fruit development in olive. *Physiol. Plant.* **2019**, *167*, 526–539.
52. Moreau, R.A.; Nyström, L.; Whitaker, B.D.; Winkler-Moser, J.K.; Baer, D.J.; Gebauer, S.K.; Hicks, K.B. Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid Res.* **2018**, *70*, 35–61.
53. Du, Y.; Fu, X.; Chu, Y.; Wu, P.; Liu, Y.; Ma, L.; Tian, H.; Zhu, B. Biosynthesis and the Roles of Plant Sterols in Development and Stress Responses. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2332.
54. Venkatramesh, M.; Karunanandaa, B.; Sun, B.; Gunter, C. A.; Boddupalli, S.; Kishore, G. M. Expression of a *Streptomyces* 3-hydroxysteroid oxidase gene in oilseeds for converting phytosterols to phytostanols. *Phytochemistry*, **2003**, *62*(1), 39–46.
55. Dias, M.C.; Pinto, D.C.G.A.; Figueiredo, C.; Santos, C.; Silva, A.M.S. Phenolic and lipophilic metabolite adjustments in *Olea europaea* (olive) trees during drought stress and recovery. *Phytochemistry* **2021**, *185*, 112695.
56. Lukić, M.; Lukić, I.; Moslavac, T. Sterols and triterpene diols in virgin olive oil: A comprehensive review on their properties and significance, with a special emphasis on the influence of variety and ripening degree. *Horticulturae* **2021**, *7*, 493.
57. Vekiari, S.A.; Oreopoulou, V.; Kourkoutas, Y.; Kamoun, N.; Msallem, M.; Psimouli, V.; Arapoglou, D. Characterization and seasonal variation of the quality of virgin olive oil of the Throumbolia and Koroneiki varieties from Southern Greece. *Grasas Aceites* **2010**, *61*, 221–231.
58. Dag, C.; Demirtas, I.; Ozdemir, I.; Bekiroglu, S.; Ertas, E. Biochemical characterization of Turkish extra virgin olive oils from six different olive varieties of identical growing conditions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2015**, *92*, 1349–1356.
59. Morikawa, T.; Mizutani, M.; Aoki, N.; Watanabe, B.; Saga, H.; Saito, S.; Oikawa, A.; Suzuki, H.; Sakurai, N.; Shibata, D.; et al. Cytochrome P450 CYP710A encodes the sterol C-22 desaturase in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Cell* **2006**, *18*, 1008–1022.
60. Ranalli, A.; Pollastri, L.; Contento, S.; Di Loreto, G.; Lannucci, E.; Lucera, L.; Russi, F. Sterol and alcohol components of seed, pulp and whole olive fruit oils. Their use to characterize olive fruit variety by multivariate analysis. *J. Sci. Food Agric.* **2002**, *82*, 854–859.

61. Boulkroune, H.; Lazzez, A.; Guissous, M.; Bellik, Y.; Smaoui, S.; Kamoun, N.G.; Madani, T. Characterization of sterolic and alcoholic fractions of some Algerian olive oils according to the variety and ripening stage. *Oilseeds Fats Crops Lipids*. **2017**, *24*, A502.
62. Gutiérrez, F.; Varona, I.; Albi, M.A. Relation of acidity and sensory quality with sterol content of olive oil from stored fruit. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 1106–1110.
63. Rey-Giménez, R.; Sánchez-Gimeno, A.C. Crop year, harvest date and clone effects on fruit characteristics, chemical composition and olive oil stability from an Empeltre clonal selection grown in Aragon. *J. Sci. Food Agric.* **2022**. <https://doi.org/10.1002/jsfa.11927>.
64. Fernandes-Silva, A.A.; Gouveia, J.B.; Vasconcelos, P.; Ferreira, T.C.; Villalobos, F.J. Effect of different irrigation regimes on the quality attributes of monovarietal virgin olive oil from cv. “cobrançosa.” *Grasas Aceites* **2013**, *64*, 41–49.
65. Stefanoudaki, E.; Williams, M.; Chartzoulakis, K.; Harwood, J. Effect of irrigation on quality attributes of olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 7048–7055.
66. Berenguer, M.J.; Vossen, P.M.; Grattan, S.R.; Connell, J.H.; Polito, V.S. Tree irrigation levels for optimum chemical and sensory properties of olive oil. *HortScience*, **2006**, *41*, 427–432.
67. Tous, J.; Romero, A.; Plana, J.; Selección clonal en variedades (En Arbequina). In *Variedades de olivo en España*; Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J.M., Del Río, C., Martín, A., Tous, J., Trujillo, I., Eds.; Junta de Andalucía, MAPA and Ediciones Mundi-Prensa: Madrid, Spain, 2005; pp. 395–404.



4.3. ARTÍCULO III:

Chemometric and Physico-Chemical Characterization of Fruit and Olive Oils from Autochthonous Cultivars Grown in Aragon (Spain).

Rey-Giménez, R., Vázquez Ayala, S., Laya Reig, D., Sánchez-Gimeno, A.C. (2022).

Foods, 12(4), 803.

Estado: publicado.

<https://doi.org/10.3390/foods12040803>



Article

Chemometric and Physico-Chemical Characterization of Fruit and Olive Oils from Autochthonous Cultivars Grown in Aragon (Spain)

Raquel Rey-Giménez, Sergio Vázquez Ayala, Diego Laya Reig and Ana Cristina Sánchez-Gimeno



<https://doi.org/10.3390/foods12040803>



Article

Chemometric and Physico-Chemical Characterization of Fruit and Olive Oils from Autochthonous Cultivars Grown in Aragon (Spain)

Raquel Rey-Giménez ^{1,*} , Sergio Vázquez Ayala ², Diego Laya Reig ² and Ana Cristina Sánchez-Gimeno ^{2,*} 

¹ Laboratorio Agroambiental, Gobierno de Aragón, Avda, Montañana 1005, 50071 Zaragoza, Spain

² Instituto Agroalimentario de Aragón-IA2, Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Miguel Servet 177, 50013 Zaragoza, Spain;

³ Unidad de Cultivos Leñosos, Centro de Transferencia Agroalimentaria, Gobierno de Aragón, Avda, Montañana 930, 50059 Zaragoza, Spain

* Correspondence: rreyg@aragon.es (R.R.-G.); anacris@unizar.es (A.C.S.-G.)

Citation: Rey-Giménez, R.; Vázquez Ayala, S.; Laya Reig, D; Sánchez-Gimeno, A.C. Chemometric and Physico-Chemical Characterization of Fruit and Olive Oils from Autochthonous Cultivars Grown in Aragon (Spain). *Foods* 2023, 12, 803. <https://doi.org/10.3390/foods12040803>

Received: 8 January 2023

Revised: 2 February 2023

Accepted: 10 February 2023

Published: 13 February 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

4.3.1. Abstract

Olive tree crops and the olive oil market are becoming less and less diverse due to the rise of intensive growth varieties, with the consequent loss of varietal richness provided by oils from minority and autochthonous cultivars. “Royal de Calatayud” and “Negral de Sabinán” are two local minority cultivars in Aragon (Spain). Fruit parameters such as ripening, fresh weight, and oil yield were evaluated, as well as physico-chemical and chemical composition parameters in olive oil in comparison with “Arbequina”, a cultivar widespread in Spain and other countries. Fruits were harvested from October to December in 2017 and 2019. Chemometric analysis revealed significant varietal differences among the three cultivars. In comparison with “Arbequina”, higher oil yields were obtained in the two local cultivars. “Royal de Calatayud” has a higher oleic acid content and a greater quantity of phenolic compounds. It thus displays a better nutritional profile than “Arbequina”. This preliminary study shows that “Royal de Calatayud” could be regarded as an excellent alternative to the “Arbequina” cultivar in the parameters analyzed.

Keywords: olive oil; chemical composition; crop year; chemometric analysis; Arbequina; fatty acids; sterols.

4.3.2. Introduction

Virgin olive oil (VOO), which comes from the fruit of the olive tree (*Olea europaea* L.), is one of the most highly appreciated vegetable oils due to its widely acknowledged nutritional and organoleptic characteristics. Its nutritional importance lies in its chemical composition. Virgin olive oil is mainly composed of triglycerides (98–99%), constituted of fatty acids. The high monounsaturated/polyunsaturated fatty acid ratio of olive oils is due to the high oleic acid content, which is the principal fatty acid (55–83%). Nutritionally relevant compounds such as biophenols, squalene, tocopherols, and sterols compose the minority fraction (1–2%). Thanks to its chemical profile, VOO is highly stable against oxidation compared to other vegetable oils, thus making it an agri-food product of great economic importance in the countries that produce it. The yield, quality, and chemical composition of virgin olive oils are strongly associated with environmental, agronomic, and genetic factors [1,2]. Knowledge of the effects of harvest date, cultivar, and crop year on the quality of virgin olive oils can provide olive farmers with powerful tools to make appropriate decisions regarding their crops.

On the other hand, the wide genetic diversity within the olive tree genus works in favor of its resistance in the face of diseases, pests, and new climatic scenarios, while also making it easier to obtain new cultivars in breeding programmes. However, the current trend in new plantations towards majority cultivars, which are not always local and therefore perhaps not adapted to the environment, detracts from the olive tree's rich potential for the current globalized market.

In Spain, the olive sector is an industry of great social and economic importance, as this country is the world's leading producer and exporter of olive oil [3]. Aragon, a region in the NE of Spain with 47,000 hectares dedicated to olive trees, produces 12,000 annual tonnes of olive oil [4]. It is the sixth largest olive oil-producing region in Spain. Although "Arbequina" and "Empeltre" are the cultivars with the most hectares, the Aragon region also features a wealth of local varieties [5–8]. "Royal de Calatayud" (synonyms: "Verdilla", "Verdeña", "Verdial", and "Royal") and "Negral de Sabinán" (synonymy: "Negral") are two of the secondary cultivars with the highest production in

Aragon (7% and 1% of total hectares, respectively) [5,6,9]. As both have different names depending on the area where they are grown, it is difficult to identify them in every case [5,6,10]. No other study has previously compared “Negral de Sabinán”, “Arbequina” and “Royal de Calatayud” cultivars with one another in the same orchard throughout the ripening period in separate crop years.

Our study’s aim was to characterize the fruit and the physico-chemical composition of the virgin olive oils of the “Royal de Calatayud” and “Negral de Sabinán” cultivars. We also studied the influence of harvesting date, crop year, and cultivar on the parameters under analysis, using the “Arbequina” variety as a control. Chemometric analysis was applied to elucidate differences among cultivars.

4.3.3. Materials and Methods

4.3.3.1. Experimental Design

4.3.3.1.1. Pedoclimatic Characteristics of the Study Area

This study was carried out in an experimental olive orchard of the Government of Aragon located in Alcañiz, Aragon (NE Spain; 41°03'27" N 0°08'36" W). This region’s climate is classified as cold semi-arid (type “BSk”) according to the Köppen–Geiger climate classification [11]. It also has a marked continental, Mediterranean character. Rainfall is irregular and scarce, with May being the month with the highest precipitation and July the lowest. Average annual precipitation is 394 mm. Temperatures are extreme in winter and summer, with a wide absolute temperature range. The average temperature is 15.3 °C. Meteorological data for the two years studied are shown in Figure 1. The olive orchard was planted in 2001, in clay loam soil, with a frame of 6 × 5 m, and it was surface-irrigated.

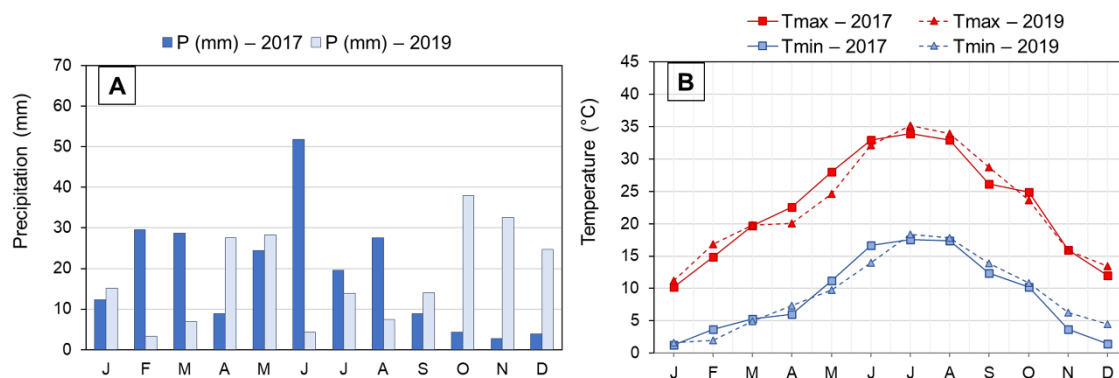


Figure 1. Monthly precipitation (A) and monthly air temperatures (maximum and minimum) (B) registered in Alcañiz (Teruel) during 2017 and 2019 crop seasons. Abbreviations: P, precipitations; Tmax, average maximum temperatures; Tmin, average minimum temperatures. J, January; F, February; M, March; A, April; M, May; J, June; J, July; A, August; S, September; O, October; N, November; D, December.

4.3.3.1.2. Olive Samples

Two local cultivars from Aragon (Spain), “Royal de Calatayud” (RdC) and “Negral de Sabiñán” (NdS), were studied in the crop years 2017 and 2019. The 2018 year was not studied due to the lack of production of “Negral de Sabiñán” and “Royal de Calatayud” cultivars because of pronounced alternate bearing behaviors. The “Arbequina” (A) cultivar was used as a control. The genotype identification of “Royal de Calatayud” was carried out by the World Olive Germplasm Bank (WOGB) (Cordoba, Spain), using the single-nucleotide polymorphism molecular marker technique (EST-SNPs).

Three olive trees per cultivar, grown under identical agronomic and pedoclimatic conditions, were harvested from October to December in 15-day intervals in each crop year. Olives (4 kg) were randomly hand-picked and immediately processed in the laboratory after harvesting.

4.3.3.1.3. Olive Fruit Analyses

Average fresh fruit weight (g) was obtained by weighing 100 fruits randomly selected from each sample. Ripeness index (RI) was determined using the methodology described by Hermoso et al. [12] based on color changes in olive skin and pulp. Oil content expressed as a percentage of dry olive paste weight was determined by first

milling the olives at 3000 rpm using a hammer mill equipped with a 3 mm sieve and then analyzing the resulting olive paste with a near-infrared (NIR) analyzer (FoodScan Lab, Type 78800, Foss, UK).

4.3.3.2. Olive Oil Extraction

Oil extraction was performed using the Abencor® system (MC2, Ingeniería y Sistemas, S.L., Seville, Spain), a laboratory mill that reproduces the industrial process of mechanical olive oil extraction. Olives were milled at 3000 rpm using a 3 mm sieve stainless hammer mill. The olive paste was subsequently malaxed at 28 °C for 30 min, and the resulting olive oil was separated by centrifugation at 3500 rpm for one minute.

The VOO thereby obtained was decanted, filtered through paper, and stored at -20 °C in amber glass bottles under a nitrogen atmosphere until analysis.

4.3.3.3. Olive Oil Analyses

4.3.3.3.1. *Physico-Chemical Quality Parameters*

Free fatty acids (FFA), peroxide value (PV), and UV absorption characteristics (K_{232} , K_{270} , ΔK) were determined according to the analytical methods established in EU Regulation No. 2568/91 and subsequent amendments [13].

4.3.3.3.2. *Fatty Acid Composition*

Fatty acid methyl esters (FAMES) were prepared as described by the EU official method [13] and analyzed by gas chromatography (GC) using an Agilent chromatograph (7890N, Agilent, Santa Clara, CA, USA) equipped with a SP-2380 60 m \times 0.25 mm i.d. \times 0.2 μ m film thickness capillary column (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Helium was used as a carrier gas with a 1.2 mL \cdot min⁻¹ flow. The split/spitless injector and flame ionization detector (FID) temperatures were 250 °C and 260 °C, respectively. The initial oven temperature was 170 °C, which was maintained for 30 min, followed by an increase of 5 °C \cdot min⁻¹ up to 200 °C.

Although all regulated fatty acids were analyzed, only five of them were taken into account in this study: palmitic (C16:0), stearic (C18:0), oleic (C18:1), linoleic (C18:2), and linolenic (C18:3) acid, expressed as a percentage of FAME. Saturated (SFA), monounsaturated (MUFA), and polyunsaturated (PUFA) fatty acids, as well as the ratio of monounsaturated to polyunsaturated fatty acids (MUFA/PUFA), were also taken into consideration.

4.3.3.3.3. *Sterols and Triterpene Dialcohols Composition*

Sterols, erythrodiol, and uvaol contents were determined following the official EU method [13]. Olive oil samples were saponified, followed by thin-layer chromatography purification on a basic silica gel plate. The recovered sterols, erythrodiol, and uvaol were silanized and subsequently analyzed using gas chromatography (6890N, Agilent, Santa Clara, CA, USA) with a CP-Sil 8CB capillary column (25 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m) (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Chromatographic working conditions were: injector and flame ionization detector (FID) temperatures, 300 $^{\circ}$ C; isothermal oven temperature, 260 $^{\circ}$ C; flow carrier gas (helium), 1 mL \cdot min $^{-1}$.

4.3.3.3.4. *Total Phenol Content*

The total phenol content in oil samples was determined by the Folin–Ciocalteu assay according to the method described by Vázquez Roncero et al. [14]. Phenolic compounds were isolated from a solution of oil (10 g) in hexane (50 mL) by triple extraction with 20 mL of a methanol/water mixture (60:40, v/v). Aqueous fractions were collected in a volumetric flask (100 mL) to obtain the total polyphenol extract. Then, 2.5 mL of Folin–Ciocalteu reagent was added to 5 mL of extract and, after 3 min, 5 mL of sodium hydroxide (6% m/m). The absorption of the solution was colorimetrically measured at 725 nm using a UV-Vis spectrophotometer (Specord 205, Analytikjena, Germany). Total phenols were expressed as mg caffeic acid \cdot kg $^{-1}$ oil.

4.3.3.3.5. *Oxidative Stability*

Oxidative stability, expressed as the oxidation induction time (h), was measured by the Rancimat method, a rapid, reliable analytical procedure [15], using a 743 Rancimat apparatus (Metrohm AG, Switzerland). For the stability test, 3 g of oil was heated at 120 °C and an air flow of 20 L·h⁻¹ was bubbled through it.

4.3.3.4. Statistical Analysis

All parameters were determined in duplicate. Data were expressed as mean ± standard deviation ($n = 2$). Significant differences among samples ($p < 0.05$) were determined by univariate factorial analysis of variance (one-way ANOVA) using Tukey's test as a multiple testing range and the t-test for independent groups. Principal component analysis (PCA) and cluster analysis were carried out using IBM SPSS Statistics 24.0 software (IBM Corp., Armonk, NY, USA). The squared Euclidean distance was used as a measure of similarity, and Ward's method was used as a rule for clustering in the cluster analysis. Further data processing was performed with Microsoft Excel, 2016 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA).

4.3.4. Results and Discussion

4.3.4.1. Olive Fruit Parameters

The evolution of olive ripening in the three cultivars during two years of study is shown in Figure 2A. The thermal similarity between the sampling periods (Figure 1) in the two crop years is reflected in the speed of ripening in the "Arbequina" variety, which is also similar. The "Royal de Calatayud" cultivar ripened much more rapidly in 2019 than in 2017, perhaps due to that crop's low yield in that year. None of the three cultivars reached a ripening index of 4 by the end of sampling.

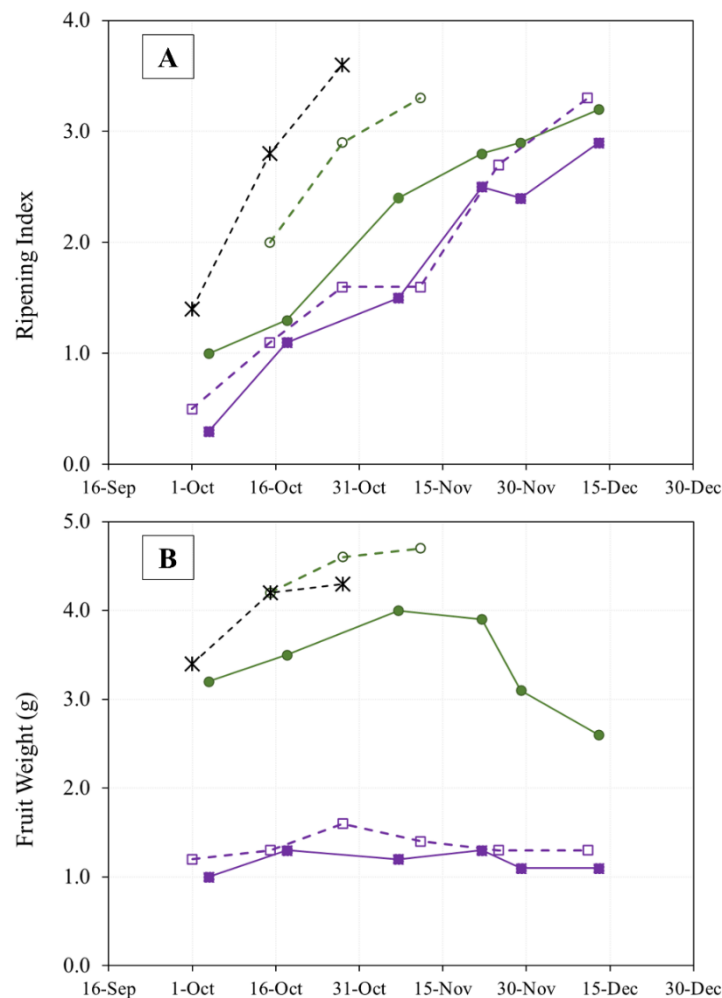


Figure 2. Evolution of olive fruit ripening (A) and fruit weight (B) of “Arbequina” (square; violet), “Royal de Calatayud” (circle; green), and “Negral de Sabiñán” (cross; black) harvested at different dates in 2017 (continuous line) and 2019 (dotted line).

On the other hand, the amount of rainfall recorded during the fall of 2019 (Figure 1) was higher than in 2017. This may explain the generally greater fruit weight observed in 2019, although the weight increase in the “Royal de Calatayud” cultivar was due to its low yield in that year [16]. The weights of “Royal de Calatayud” and “Negral de Sabiñán” olives in our samples were much greater than the weight of “Arbequina” (Figure 2B).

Olive oil content expressed as dry matter was used to avoid the influence of precipitation and frost on the study of oil accumulation or lipogenesis [17]. In general, the rate of oil accumulation progressively increased throughout the sampling period until slowing down in mid-November [16] (Figure 3).

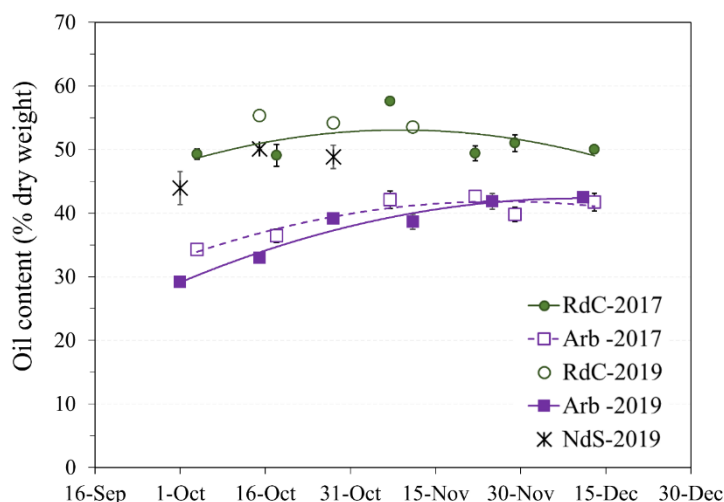


Figure 3. Evolution of oil content on a dry basis in the “Arbequina” (Arb; square; violet), “Royal de Calatayud” (RdC; circle; green), and “Negral de Sabiñán” (NdS; cross; black) olive oils according to harvest date in 2017 (continuous line) and 2019 (dotted line) crop years.

The “Arbequina” cultivar showed a higher accumulation rate during the 2019 harvest, although the curves in the two crop years were similar. Oil content in dry matter (approximately 42%) in “Arbequina” was lower than in the two autochthonous cultivars. Other authors [18,19] have described a similar content ratio in “Arbequina”. The summer of 2019 was drier, and the autumn considerably wetter (Figure 1). This could explain the differences observed in “Arbequina” olives of similar maturity (Figure 2A) in terms of the evolution of their oil contents over the two years [20,21]. The oil content of the “Royal de Calatayud” cultivar was higher in both seasons compared to “Arbequina”. The oil content reached by the “Royal de Calatayud” cultivar by the end of the 2017 sampling was 50.5%, thus 8 percentage points higher than in “Arbequina” in the same harvest. The “Negral de Sabiñán” cultivar presented a high oil content (43.9%) at the beginning of October 2019, similar to the “Royal de Calatayud” cultivar on the exact same sampling dates. Thus, “Royal de Calatayud” and “Negral de Sabiñán” displayed high yields, which were higher than “Arbequina” in both cases.

4.3.4.2. Quality Parameters

All olive oils under study were classified as extra virgin olive oils (EVOO) according to the values established by EU quality criteria regulations [13]. The physico-

chemical parameters we tested (acidity, peroxide value, K_{232} , K_{270}) showed very low values, as would be expected for oils from healthy fruits that had been processed as soon as possible after harvesting (Table 1).

Table 1. Physico-chemical quality parameters of the “Arbequina” “Royal de Calatayud” and “Negral de Sabinán” olive oils in the 2017 and 2019 crop years.

Cultivar	Harvest Date	FFA (% Oleic Acid)	PV (Meq O ₂ ·kg ⁻¹)	K ₂₇₀	K ₂₃₂
Arbequina	2017				
	4 Oct	0.11 ± 0.00	6.54 ± 0.00	0.091 ± 0.002	1.410 ± 0.004
	18 Oct	0.08 ± 0.00	4.24 ± 0.19	0.078 ± 0.000	1.339 ± 0.032
	7 Nov	0.13 ± 0.01	2.61 ± 0.18	0.082 ± 0.002	1.411 ± 0.001
	22 Nov	0.10 ± 0.00	3.96 ± 0.15	0.079 ± 0.001	1.324 ± 0.017
	29 Nov	0.09 ± 0.00	4.90 ± 0.14	0.082 ± 0.001	1.423 ± 0.017
	13 Dec	0.31 ± 0.01	5.17 ± 0.22	0.072 ± 0.001	1.345 ± 0.016
	2019				
	1 Oct	0.09 ± 0.00	2.36 ± 0.02	0.094 ± 0.000	1.509 ± 0.000
	15 Oct	0.06 ± 0.00	1.62 ± 0.00	0.083 ± 0.000	1.517 ± 0.013
	28 Oct	0.08 ± 0.00	1.40 ± 0.05	0.072 ± 0.001	1.505 ± 0.002
	11 Nov	0.08 ± 0.00	2.69 ± 0.05	0.079 ± 0.000	1.314 ± 0.004
	25 Nov	0.06 ± 0.00	2.15 ± 0.01	0.077 ± 0.001	1.341 ± 0.005
	11 Dec	0.06 ± 0.00	3.62 ± 0.04	0.074 ± 0.001	1.408 ± 0.006
Royal de Calatayud	2017				
	4 Oct	0.18 ± 0.01	5.47 ± 0.02	0.089 ± 0.001	1.378 ± 0.011
	18 Oct	0.25 ± 0.01	5.38 ± 0.09	0.090 ± 0.001	1.416 ± 0.010
	7 Nov	0.24 ± 0.01	4.72 ± 0.17	0.081 ± 0.000	1.343 ± 0.024
	22 Nov	0.23 ± 0.01	5.13 ± 0.19	0.075 ± 0.001	1.272 ± 0.036
	29 Nov	0.25 ± 0.01	4.50 ± 0.10	0.077 ± 0.001	1.463 ± 0.024
	13 Dec	0.10 ± 0.00	9.08 ± 0.14	0.073 ± 0.001	1.435 ± 0.009
	2019				
	15 Oct	0.41 ± 0.01	6.24 ± 0.81	0.106 ± 0.001	1.503 ± 0.020
	28 Oct	0.38 ± 0.00	9.64 ± 0.04	0.092 ± 0.000	1.565 ± 0.007
	11 Nov	-	7.67 ± 0.40	0.094 ± 0.001	1.520 ± 0.010
Negral de Sabinán	2019				
	1 Oct	0.09 ± 0.00	4.11 ± 0.13	0.088 ± 0.003	1.501 ± 0.041
	15 Oct	0.17 ± 0.00	2.20 ± 0.02	0.083 ± 0.000	1.531 ± 0.002
	28 Oct	0.12 ± 0.00	1.78 ± 0.08	0.082 ± 0.001	1.460 ± 0.026

Values are mean ± standard deviation ($n = 2$). FFA = free fatty acids; PV = peroxide value. Limits established by the current European legislation for extra virgin olive oils: FFA ≤ 0.80% oleic acid; PV ≤ 20.0 meq O₂·kg⁻¹; K₂₇₀ ≤ 0.22; K₂₃₂ ≤ 2.50.

4.3.4.3. Fatty Acids Composition

The evolutions of the fatty acid compositions of the oils derived from the two cultivars under study, compared to “Arbequina” in the course of the samplings carried out in 2017 and 2019, are detailed in Table 2. The differences in acidic composition among cultivars are significant. In previous studies, genotype had already been identified as the major source of variability in fatty acid composition [18,22–25]. Varying trends in the evolution of the main fatty acids in several cultivars have also been described according to fruit ripening and crop years [16,26,27].

In general, palmitic acid (C16:0) decreased with maturity, as other authors have likewise described [16,26,28], regardless of cultivar and year (except in “Negral de Sabinán”, for which we had insufficient data in 2019). This fatty acid presented the highest values in “Arbequina” olive oils, with contents similar to those reported in previous studies [24,28,29]. Other authors have described C16:0 percentages as lower [30] or higher [31] for this cultivar. Regarding differences observed between the two years under study, the palmitic acid content was lower in 2017 compared to 2019 in both the “Royal de Calatayud” and “Arbequina” oils. The results from 2017 expressed as the average of all harvest samples were 11.92% for “Royal de Calatayud” and 13.78% for “Arbequina” oils. The lower temperatures along the lipogenesis period in 2017 could partially explain the lower palmitic contents observed in that year. Analogous results have been obtained for the “Picual” cultivar according to weather conditions in three crop years [16]. Stearic (C18:0) and linolenic (C18:3) fatty acids also decreased with ripening [26,28] except in oils from the “Royal de Calatayud” cultivar harvested in 2019. That crop year presented higher C18:3 contents in “Arbequina” (harvest sample average: 0.58%) and “Royal de Calatayud” (harvest sample average: 0.67%) olive oils. “Negral de Sabinán” contained 0.60% linolenic acid in that crop year.

Table 2. Evolution of fatty acid composition and indices according to harvest date for the “Arbequina” (A), “Royal de Calatayud” (RdC) and “Negral de Sabinán” (RdS) olive oils in the 2017 and 2019 crop years.

Cultivar	Harvest Date	C16:0 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)	C18:3 (%)	SFA (%)	MUFA	PUFA	MUFA/PUFA
A	2017									
	4 Oct	14.32 ± 0.07 A _{HEX}	1.91 ± 0.01 A _{HEX}	71.84 ± 0.10 A _{HEX}	8.76 ± 0.06 A _{HEX}	0.62 ± 0.01 A _{HEX}	16.98 ± 0.09 A _{HEX}	73.65 ± 0.13 A _{HEX}	9.38 ± 0.07 A _{HEX}	7.82 ± 0.04 A _{HEX}
	18 Oct	14.88 ± 0.08 B _{HEX}	1.87 ± 0.01 B _{HEX}	70.97 ± 0.10 B _{HEX}	9.07 ± 0.06 B _{HEX}	0.57 ± 0.01 B _{HEX}	17.48 ± 0.09 B _{HEX}	72.87 ± 0.13 B _{HEX}	9.64 ± 0.07 B _{HEX}	7.53 ± 0.04 B _{HEX}
	7 Nov	14.28 ± 0.07 A _{HEX}	1.83 ± 0.01 C _{HEX}	71.63 ± 0.10 A _{HEX}	9.13 ± 0.06 B _{CHX}	0.53 ± 0.01 C _{HEX}	16.80 ± 0.09 A _{HEX}	73.53 ± 0.13 A _{HEX}	9.66 ± 0.07 B _{CHX}	7.58 ± 0.04 B _{CHX}
	22 Nov	13.69 ± 0.07 C _{HEX}	1.86 ± 0.01 B _{HEX}	72.44 ± 0.10 C _{HEX}	9.03 ± 0.06 B _{HEX}	0.48 ± 0.01 D _{HEX}	16.24 ± 0.09 C _{HEX}	74.24 ± 0.13 C _{HEX}	9.51 ± 0.07 A _{BHEX}	7.80 ± 0.04 A _{CHX}
	29 Nov	13.26 ± 0.07 D _{HEX}	1.84 ± 0.01 C _{HEX}	72.90 ± 0.11 D _{HEX}	9.04 ± 0.06 B _{HEX}	0.50 ± 0.01 E _{HEX}	15.80 ± 0.08 D _{HEX}	74.63 ± 0.13 D _{HEX}	9.54 ± 0.07 A _{BHEX}	8.30 ± 0.04 A _{CHX}
	13 Dec	12.26 ± 0.06 A _{HEX}	1.84 ± 0.01 C _{HEX}	73.66 ± 0.11 A _{HEX}	9.24 ± 0.06 C _{HEX}	0.50 ± 0.01 E _{HEX}	14.78 ± 0.08 A _{HEX}	75.46 ± 0.13 E _{HEX}	9.74 ± 0.07 C _{HEX}	7.70 ± 0.04 C _{HEX}
	2019									
	1 Oct	14.76 ± 0.10 C _{AEX}	1.87 ± 0.01 A _{EX}	71.63 ± 0.06 A _{EX}	8.50 ± 0.04 A _{EX}	0.69 ± 0.01 A _{EX}	17.40 ± 0.12 A _{HEX}	73.40 ± 0.06 A _{HEX}	9.19 ± 0.05 A _{HEX}	7.99 ± 0.04 A _{HEX}
	15 Oct	15.07 ± 0.01 B _{HEX}	1.83 ± 0.00 B _{EX}	70.62 ± 0.01 B _{EX}	9.24 ± 0.01 B _{HEX}	0.62 ± 0.00 B _{EX}	17.64 ± 0.00 B _{HEX}	72.50 ± 0.01 B _{EX}	9.86 ± 0.01 B _{EX}	7.35 ± 0.01 B _{EX}
	28 Oct	15.14 ± 0.01 B _{EX}	1.80 ± 0.01 C _{EX}	70.03 ± 0.00 C _{EX}	9.67 ± 0.01 C _{EX}	0.56 ± 0.00 C _{EX}	17.63 ± 0.00 B _{EX}	72.14 ± 0.01 C _{EX}	10.22 ± 0.01 C _{EX}	7.06 ± 0.00 C _{EX}
	11 Nov	14.20 ± 0.01 C _{EX}	1.81 ± 0.00 D _{EX}	71.60 ± 0.01 A _{EX}	9.23 ± 0.01 B _{EX}	0.56 ± 0.00 C _{EX}	16.71 ± 0.00 C _{EX}	73.51 ± 0.00 D _{EX}	9.78 ± 0.01 D _{EX}	7.52 ± 0.01 D _{EX}
RdC	25 Nov	13.76 ± 0.00 D _I	1.79 ± 0.01 C _I	71.97 ± 0.01 D _I	9.37 ± 0.01 D _I	0.55 ± 0.01 D _I	16.22 ± 0.00 D _I	73.89 ± 0.00 E _I	9.91 ± 0.00 E _I	7.46 ± 0.00 E _I
	11 Dec	12.69 ± 0.01 E _I	1.79 ± 0.00 C _I	74.03 ± 0.03 E _I	8.64 ± 0.01 E _I	0.52 ± 0.00 E _I	15.15 ± 0.01 E _I	75.69 ± 0.02 E _H	9.16 ± 0.02 A _I	8.27 ± 0.02 E _I
	2017									
	4 Oct	13.35 ± 0.07 A _Y	1.87 ± 0.01 A _Y	75.17 ± 0.11 A _Y	6.62 ± 0.04 A _Y	0.62 ± 0.01 A _X	15.97 ± 0.09 A _Y	76.79 ± 0.13 A _Y	7.24 ± 0.05 A _Y	10.57 ± 0.06 A _Y
	18 Oct	12.79 ± 0.07 B _{HEX}	1.85 ± 0.01 B _{HEX}	75.95 ± 0.11 B _{HEX}	6.54 ± 0.04 A _{HEX}	0.59 ± 0.01 B _{HEX}	15.36 ± 0.08 B _{HEX}	77.51 ± 0.13 B _{HEX}	7.13 ± 0.05 A _{HEX}	10.83 ± 0.06 B _{HEX}
	7 Nov	11.95 ± 0.06 C _{HEX}	1.81 ± 0.01 C _{HEX}	76.66 ± 0.11 C _{HEX}	6.85 ± 0.05 B _{HEX}	0.57 ± 0.01 C _{HEX}	14.45 ± 0.08 C _{HEX}	78.14 ± 0.13 C _{HEX}	7.42 ± 0.05 B _{HEX}	10.49 ± 0.06 A _{HEX}
	Nov	11.46 ± 0.06 D _{HEX}	1.87 ± 0.01 A _{HEX}	77.76 ± 0.11 D _{HEX}	6.22 ± 0.04 C _{HEX}	0.55 ± 0.01 D _{HEX}	14.04 ± 0.08 D _{HEX}	79.19 ± 0.13 D _{HEX}	6.77 ± 0.05 C _{HEX}	11.65 ± 0.06 C _{HEX}
	29 Nov	11.08 ± 0.06 E _Y	1.83 ± 0.01 D _X	77.80 ± 0.11 D _Y	6.61 ± 0.04 A _Y	0.56 ± 0.01 D _Y	13.60 ± 0.07 E _Y	79.22 ± 0.13 D _Y	7.17 ± 0.05 A _Y	11.01 ± 0.06 D _Y
	13 Dec	10.87 ± 0.06 F _Y	1.85 ± 0.01 B _X	78.27 ± 0.11 E _Y	6.30 ± 0.04 C _Y	0.56 ± 0.01 C _{DY}	13.42 ± 0.07 E _Y	79.69 ± 0.13 E _Y	6.90 ± 0.05 C _Y	11.57 ± 0.06 C _Y
	2019									
	15 Oct	13.83 ± 0.01 A _{HEX}	1.92 ± 0.01 A _{HEX}	72.21 ± 0.01 A _{HEX}	8.84 ± 0.00 A _{HEX}	0.64 ± 0.00 A _{HEX}	16.40 ± 0.02 A _{HEX}	74.11 ± 0.01 A _{HEX}	9.48 ± 0.00 A _{HEX}	7.82 ± 0.00 A _{HEX}
Nds	28 Oct	13.40 ± 0.02 B _{HEX}	1.94 ± 0.01 B _{HEX}	72.44 ± 0.01 B _{HEX}	9.09 ± 0.02 B _{HEX}	0.64 ± 0.01 A _{HEX}	15.98 ± 0.01 B _{HEX}	74.30 ± 0.01 B _{HEX}	9.72 ± 0.03 B _{HEX}	7.64 ± 0.02 B _{HEX}
	11 Nov	13.46 ± 0.00 C _{HEX}	2.06 ± 0.00 C _{HEX}	71.52 ± 0.02 C _{HEX}	9.75 ± 0.02 C _{HEX}	0.72 ± 0.00 B _{HEX}	16.23 ± 0.01 C _{HEX}	73.30 ± 0.02 C _{HEX}	10.46 ± 0.02 C _{HEX}	7.01 ± 0.02 C _{HEX}
	2019									
	1 Oct	13.63 ± 0.03 A _Y	1.90 ± 0.00 A _Y	67.35 ± 0.02 A _Y	14.41 ± 0.01 A _Y	0.61 ± 0.00 A _Y	16.19 ± 0.03 A _Y	68.79 ± 0.02 A _Y	15.01 ± 0.01 A _Y	4.58 ± 0.00 A _Y
	15 Oct	14.07 ± 0.04 B _Z	1.84 ± 0.00 B _Z	63.11 ± 0.01 B _Z	18.34 ± 0.02 B _Z	0.59 ± 0.00 B _Z	16.52 ± 0.04 B _Z	64.56 ± 0.02 B _Z	18.92 ± 0.02 B _Z	3.41 ± 0.00 B _Z
	28 Oct	13.92 ± 0.04 C _Z	1.83 ± 0.00 C _Z	62.98 ± 0.04 C _Z	18.63 ± 0.00 C _Z	0.60 ± 0.00 C _Z	16.37 ± 0.03 C _Z	64.41 ± 0.03 C _Z	19.23 ± 0.00 C _Z	3.35 ± 0.00 C _Z

Values are mean ± standard deviation ($n = 2$). Different letters for each parameter indicate significant statistical differences ($p < 0.05$) between harvest dates for each cultivar and crop year (A–F), between crop years for each harvest date and cultivar (H–I), and between cultivars for each harvest date and crop year (X–Z). SFA = sum of saturated fatty acids; MUFA = sum of monounsaturated fatty acids; PUFA = polyunsaturated fatty acids.

The trend in linoleic acid (C18:2) displayed different patterns according to cultivar and crop year. A slight increase in oils was observed throughout the “Arbequina” sampling in 2017. In the 2019 “Arbequina” oils, the rate of change was also positive, although minimal (1.62%), by the end of the sampling period. This minimal variation resulted from an initial increase in C18:2 up to the end of October, followed by a decrease until almost returning to its initial value. The variation rate of C18:2 was nil in “Royal de Calatayud” oils during 2017, but the initial points sampled in the cultivar “Royal de Calatayud”, as well as in “Negral de Sabinán”, indicate an initial increase in linoleic acid content in 2019. However, the information obtained is insufficient to determine the trend. Hernández et al. [32] suggested that the expression of the FAD2-2 gene (OeFAD2-2) is the main responsible agent that determines linoleic acid content in the mesocarp of the olive fruit. The same study found that the water regime during the autumn season affects the expression of the FAD2-2 gene in “Arbequina”, thereby increasing linoleic acid content. Our data confirm this finding, since rainfall was more abundant in autumn 2019 than in 2017, a year with lower linoleic acid contents in “Arbequina” (sample average: 9.04%) and “Royal de Calatayud” (sample average: 6.52%). On the other hand, linoleic acid displayed high values in “Negral de Sabinán” oils, reaching 18.63% at the end of October 2019; these data, however, could not be compared with 2017 due to a lack of samples.

Oleic acid (C18:1) in the “Arbequina” olive oils significantly increased along ripening in the two years under study. Average oleic acid content was similar in the two crop years. Nevertheless, Abenoza et al. [33] described different trends for this fatty acid in “Arbequina” oils in two harvests. The “Royal de Calatayud” oils in our study also showed a marked increase in C18:1 in 2017, although the pattern is unclear for 2019 due to insufficient data. The highest average oleic acid values (76.94%) could be observed in “Royal de Calatayud” olive oils in 2017. However, “Royal de Calatayud” oils in 2019 had a lower C18:1 content (72.06%) in contrast with the “Arbequina” oils, the contents of which were similar in the two years. The difference in C18:1 between the two crop years leads us to presume that varying climate conditions could have exerted an influence on the oleic acid content in the “Royal de Calatayud” cultivar. Certain authors

[16,34,35] have affirmed that rainy summers lead to lower oleic acid content in olive oil by reducing enzymatic activity in the biosynthesis of that fatty acid. However, that observation does not coincide with our results, since we noted the highest oleic acid content in the crop year with the rainiest summer. “Negral de Sabiñán” was the cultivar with the lowest oleic acid content: an average of 64.48% in 2019. Despite limited data for “Negral de Sabiñán”, a negative trend in the evolution of oleic acid could be observed in October of that same year.

The highest MUFAs/PUFAs ratio (10.49–11.65) was observed in the “Royal de Calatayud” olive oils from 2017, and the lowest in “Negral de Sabiñán” olive oils (3.35–4.58).

4.3.4.4. Polyphenols and Oxidative Stability

The total phenol content for each cultivar with ripening in the two crop years is presented in Figure 4. The oils generally exhibited a decrease in total polyphenol content as ripening progressed [36]. However, the Arbequina oils displayed a significant initial increase in polyphenol content until reaching a maximum towards the end of October or beginning of November, followed by a decrease, in agreement with the results described by Benito et al. [28]. Further, authors have also described this behavior in “Cornicabra”, “Chétoui”, and “Chemlali” cultivars [37,38]. Uceda et al. [22] described this variation in polyphenol content as a function of ripening with a quadratic curve whose maximum generally coincides with the maximum oil content in the fruit (see Figure 3). In 2017, oils from the “Royal de Calatayud” cultivar (74–266 mg·kg⁻¹) had a higher polyphenol content than “Arbequina” (73–160 mg·kg⁻¹). When comparing “Arbequina” oils between the two crop years, a higher phenolic content was found in 2019 (128–188 mg·kg⁻¹), a year with lower rainfall in summer but more rain in autumn. The environment, and its water availability, exerts a significant and dominant effect on phenolic concentration [23].

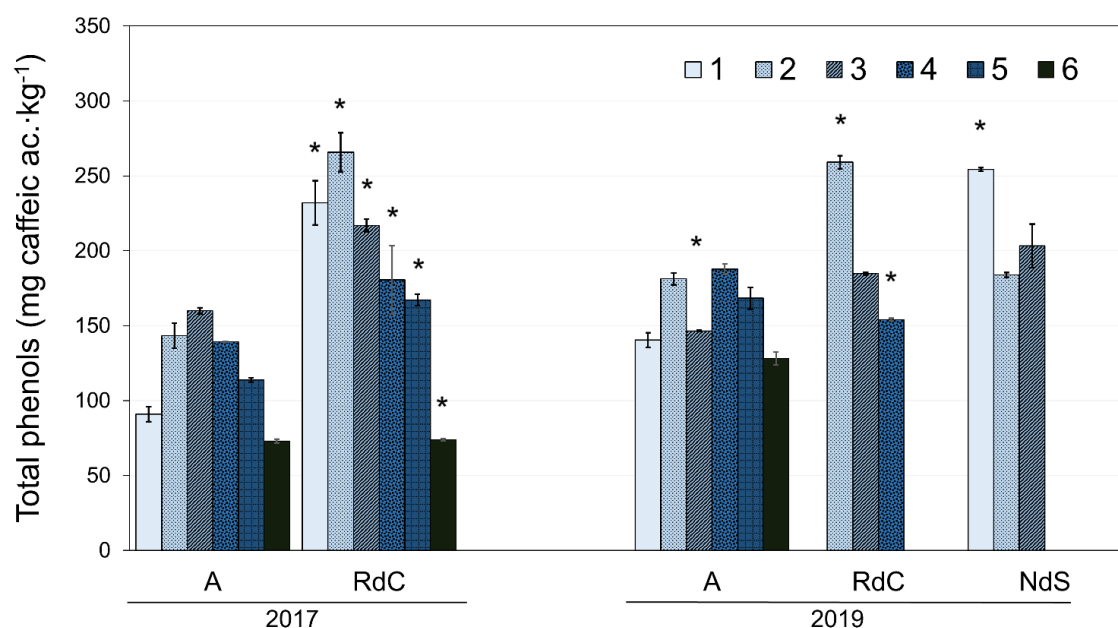


Figure 4. Evolution of polyphenol content for “Arbequina” (A), “Royal de Calatayud” (RdC), and “Negral de Sabiñán” (NdS) olive oils in 2017 and 2019 crop years. Harvest dates: 1 (1–4 October), 2 (16–18 October), 3 (28 October–7 November), 4 (11–22 November), 5 (25–29 November), and 6 (11–13 December). *, significant statistical differences ($p < 0.05$) among cultivars for the same crop year.

When comparing the phenolic contents in all three olive oils from 2019, the results show that “Negral de Sabiñán” ($184\text{--}254\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and “Royal de Calatayud” ($154\text{--}259\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) oils had higher concentrations than the “Arbequina” cultivar.

The three varieties displayed varying behaviors in terms of oxidative stability, which is a parameter directly related to phenolic content in olive oils [22,36,39,40]. The linear regression obtained for oxidative stability versus total polyphenol content in olive oils is shown in Figure 5. In “Arbequina” olive oils, the correlation between oxidative stability and polyphenol content was relatively high ($r = 0.933$, $p < 0.01$), and greater than the correlations found by other authors for the same cultivar [28,30,31,41,42]. The correlation obtained for “Royal de Calatayud” oils was lower ($r = 0.818$, $p < 0.01$). No relationship was found between oxidative stability and the MUFA/PUFA ratio in any of the varieties under study, in agreement with previous studies [31,43,44]. However, peroxide value did correlate negatively with stability in “Arbequina” ($r = -0.772$, $p < 0.01$) and “Royal de Calatayud” ($r = -0.843$, $p < 0.01$) (results not shown). Perhaps this correlation could be the reason for the lower stability of “Royal de Calatayud” oils

compared to the 2019 “Arbequina” oils, despite their higher polyphenol content. The peroxide values of “Royal de Calatayud” oils were much higher than those of “Arbequina” in that year. The data are insufficient to yield significant correlations for oxidative stability in “Negral de Sabiñán” oils.

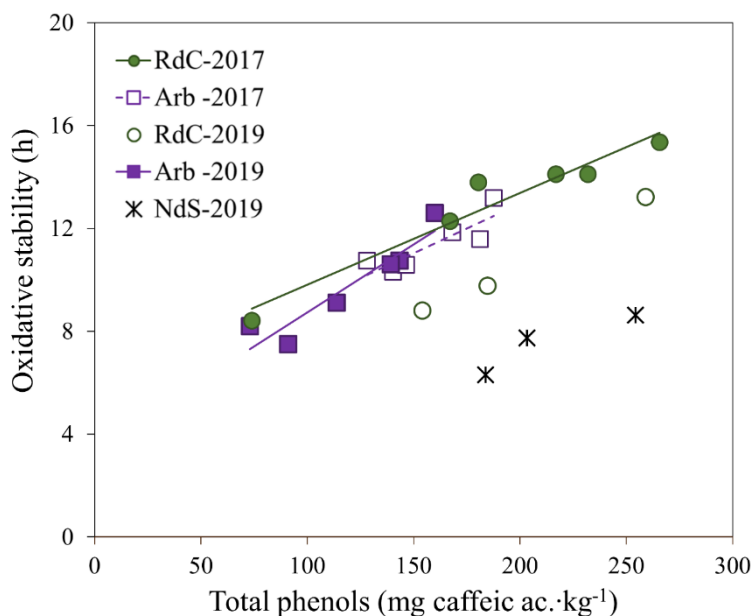


Figure 5. Linear regression of oxidative stability vs. total polyphenol content for “Arbequina” (Arb; square; violet), “Royal de Calatayud” (RdC; circle; green), and “Negral de Sabiñán” (NdS; cross; black) olive oil samples obtained in 2017 (solid marker) and 2019 (unfilled marker) crop years.

In 2019, the oils of the “Negral de Sabiñán” cultivar significantly presented the lowest oxidative stability (6–9 h), despite having a polyphenol content similar to the “Royal de Calatayud” oils, and even more similar to the “Arbequina” oils. The peroxide values were also low in “Negral de Sabiñán” oils (see Table 1). Perhaps the high linoleic acid content or the low MUFA/PUFA ratio were the cause of the low stability in these oils, although this could not be corroborated.

4.3.4.5. Minor Unsaponifiable Compounds: Sterols and Triterpenic Dialcohols

Total sterol content, individual sterol composition in relative amounts, and triterpenic diols as the sum of erythrodiol and uvaol of the analyzed olive oil samples are given in Table 3.

“Arbequina” olive oils from early ripening olives showed campesterol values above the limit (4.0%) established by European regulations [13] in both years of study (values in bold type). Other authors have also described out-of-standard campesterol contents for olive oils from the “Koroneiki” cultivar [45], for “Arbequina” and “Barnea” grown in Argentina and Australia [46,47], and for the “Cornicabra” cultivar from Spain [37,48]. The remaining parameters of the unsaponifiable fraction analyzed in all three cultivar oils comply with the limits set in the EU regulation [13].

Significant differences were found in total sterol contents among olive oils from the three cultivars. The lowest concentration of sterols was found in the oils of the “Royal de Calatayud” cultivar (1007–1360 mg·kg⁻¹), especially in the 2017 crop year, with these even approaching the acceptable limit for an oil to be considered as olive oil according to European regulation [13]. “Negral de Sabiñán” oils significantly presented the highest sterol content (1851–1947 mg·kg⁻¹). The evolution of total sterol content with ripening is not clear. In the 2017 “Arbequina” oils, after a considerable decrease at the beginning of sampling, there was an increase in sterol concentration until the initial values were reached once more. However, during the 2019 sampling, the total sterol content values remained constant. On the other hand, there was a significant increase in both crop years for the “Royal de Calatayud” olive oils and a decrease in “Negral de Sabiñán” olive oils in 2019. Certain authors have described decreases in the concentration of sterols, as these are diluted by the increase in oil that occurs during fruit ripening

Table 3. Evolution of sterol composition and triterpenic diols according to harvest date for the “Arbequina” (A), “Royal de Calatayud” (RdC) and “Negral de Sabinán” (RdS) olive oils in the 2017 and 2019 crop years.

Cultivar	Harvest Date	Cholesterol [†]	Campesterol [†]	Stigmasterol [†]	β-Sitosterol	App. β-sitosterol [†] Δ5-Avenasterol [†] Δ7-Stigmasterol [†]	Total sterols [†]	E + U [‡]		
A	2017									
	4 Oct	0.09 ± 0.01 ABHX	4.29 ± 0.03 AHX	0.89 ± 0.01 ACHX	82.51 ± 0.08 AHX	93.48 ± 0.06 AHX	8.11 ± 0.00 AHX	0.30 ± 0.01 AHX	1702 ± 1 AHX	1.65 ± 0.04 AHX
	18 Oct	0.08 ± 0.01 ACHX	4.06 ± 0.01 BHX	0.86 ± 0.01 AHX	80.96 ± 0.10 BHX	93.79 ± 0.05 BCHX	10.29 ± 0.07 BHX	0.21 ± 0.02 BHX	1489 ± 8 BHX	1.61 ± 0.34 ACHX
	7 Nov	0.11 ± 0.02 BHX	3.93 ± 0.02 CHX	0.90 ± 0.02 CHX	77.60 ± 0.08 CHX	93.70 ± 0.09 BHX	13.78 ± 0.01 CHX	0.17 ± 0.00 CDHX	1536 ± 7 BCHX	1.62 ± 0.21 ACHX
	22 Nov	0.07 ± 0.00 ACHX	3.71 ± 0.01 DHX	0.90 ± 0.00 CHX	75.35 ± 0.17 DHX	93.92 ± 0.06 CHX	15.76 ± 0.12 DHX	0.20 ± 0.01 BCHX	1601 ± 63 CHX	2.06 ± 0.80 BHX
	29 Nov	0.06 ± 0.00 CHX	3.88 ± 0.01 EH	0.82 ± 0.01 DHX	77.53 ± 0.15 CHX	93.94 ± 0.00 CHX	14.35 ± 0.16 EH	0.16 ± 0.01 DHX	1693 ± 9 AHX	1.97 ± 0.02 ABHX
	13 Dec	0.10 ± 0.0 ABHX	3.83 ± 0.01 FHX	0.88 ± 0.02 ACHX	75.99 ± 0.50 EH	93.87 ± 0.04 CHX	15.67 ± 0.14 DHX	0.17 ± 0.03 CDHX	1682 ± 8 AHX	1.22 ± 0.04 CHX
	2019									
	1 Oct	0.11 ± 0.02 AHX	4.15 ± 0.02 AX	1.00 ± 0.02 AX	81.83 ± 0.19 AX	93.35 ± 0.10 AHX	8.73 ± 0.00 AX	0.35 ± 0.02 AX	1407 ± 21 ABHX	1.46 ± 0.10 ABHX
	15 Oct	0.12 ± 0.04 AHX	3.99 ± 0.02 BHX	0.90 ± 0.02 BHX	79.71 ± 0.42 BHX	93.61 ± 0.16 ^{BD} BHX	10.75 ± 0.02 BHX	0.23 ± 0.02 BHX	1381 ± 12 AX	1.66 ± 0.10 BDHX
	28 Oct	0.11 ± 0.05 AHX	3.65 ± 0.01 CX	0.83 ± 0.02 CDHX	73.97 ± 0.42 CX	93.93 ± 0.24 ^{CHX}	17.22 ± 0.01 CX	0.16 ± 0.01 CHX	1436 ± 39 BHX	0.93 ± 0.03 CX
	11 Nov	0.12 ± 0.01 AHX	3.88 ± 0.01 DEX	0.85 ± 0.03 CDHX	76.54 ± 0.28 DHX	93.78 ± 0.29 ^{DHX}	14.78 ± 0.02 DHX	0.16 ± 0.01 CHX	1415 ± 3 ABHX	1.39 ± 0.03 AHX
	25 Nov	0.12 ± 0.00 AH	3.66 ± 0.01 CEH	0.87 ± 0.01 BCH	73.31 ± 0.11 CEI	93.90 ± 0.13 ^{CDI}	18.14 ± 0.02 EI	0.14 ± 0.01 CH	1496 ± 0 CI	1.55 ± 0.03 ABI
	11 Dec	0.10 ± 0.01 AH	3.70 ± 0.03 EI	0.81 ± 0.00 DI	74.59 ± 0.42 CEH	93.87 ± 0.17 ^{CDH}	16.88 ± 0.03 CI	0.17 ± 0.03 CH	1400 ± 2 ABI	1.84 ± 0.12 DI
RdC	2017									
	4 Oct	0.16 ± 0.00 ABY	3.70 ± 0.02 AY	1.11 ± 0.01 AY	84.90 ± 0.02 AY	93.37 ± 0.02 AX	6.06 ± 0.01 AY	0.36 ± 0.03 AX	1011 ± 2 AY	3.81 ± 0.15 ABY
	18 Oct	0.12 ± 0.02 ACHX	3.43 ± 0.01 BHY	1.25 ± 0.02 BHY	84.07 ± 0.07 BHY	93.63 ± 0.06 ^{BHX}	7.19 ± 0.06 BHY	0.28 ± 0.00 BHX	1089 ± 22 BHY	3.41 ± 0.46 ABHXY
	7 Nov	0.18 ± 0.01 BHY	3.30 ± 0.02 CHY	1.35 ± 0.01 CHY	81.64 ± 0.02 CHY	93.28 ± 0.03 ^{AHY}	9.50 ± 0.01 CHY	0.30 ± 0.02 BHY	1007 ± 9 AHY	3.25 ± 0.03 AHY
	Nov	0.10 ± 0.02 CEHX	3.36 ± 0.01 DHY	1.15 ± 0.00 DAHY	81.99 ± 0.032 CHY	93.69 ± 0.04 ^{BHY}	9.72 ± 0.17 CHY	0.22 ± 0.02 CHX	1263 ± 41 CHY	-
	29 Nov	0.06 ± 0.02 EX	3.42 ± 0.00 BEY	1.17 ± 0.02 DEY	82.63 ± 0.19 DY	93.65 ± 0.01 ^{BY}	9.06 ± 0.15 DY	0.26 ± 0.02 BCY	1360 ± 7 DY	3.92 ± 0.23 BY
	13 Dec	0.14 ± 0.02 ABCX	3.40 ± 0.03 DEY	1.10 ± 0.02 AY	82.57 ± 0.09 DY	93.70 ± 0.01 ^{BX}	9.25 ± 0.01 DY	0.27 ± 0.01 BCY	1284 ± 15 CY	3.91 ± 0.01 BY
	2019									
	15 Oct	0.05 ± 0.02 AHX	3.16 ± 0.02 AXY	1.34 ± 0.02 AHY	82.73 ± 0.10 AXY	93.76 ± 0.08 ^{AHX}	8.38 ± 0.13 AXY	0.26 ± 0.01 AHX	1185 ± 2 AHY	4.35 ± 0.04 AHXY
	28 Oct	0.08 ± 0.02 AEX	3.18 ± 0.03 AXY	1.42 ± 0.09 ABHY	81.50 ± 0.45 BHY	93.50 ± 0.22 ^{ABHX}	9.45 ± 0.11 BHY	0.24 ± 0.01 ABXY	1240 ± 22 AHY	3.83 ± 0.05 BXY
	11 Nov	0.07 ± 0.03 ^{AHX}	3.32 ± 0.02 BHY	1.56 ± 0.04 BHY	82.20 ± 0.09 ABHY	93.23 ± 0.00 ^{BHY}	8.72 ± 0.08 AXY	0.22 ± 0.00 BHX	1359 ± 29 BHX	2.79 ± 0.04 CY
	2019									
	1 Oct	0.06 ± 0.01 AX	3.59 ± 0.01 AXY	0.57 ± 0.01 AXY	84.80 ± 0.42 AXY	94.60 ± 0.18 ^{AY}	7.14 ± 0.19 AXY	0.17 ± 0.02 AXY	1947 ± 8 AXY	0.69 ± 0.14 AXY
	15 Oct	0.06 ± 0.01 AX	3.37 ± 0.02 BZ	0.58 ± 0.01 AX	84.25 ± 0.05 AZ	95.00 ± 0.10 ^{AY}	8.24 ± 0.02 AZ	0.12 ± 0.01 AZ	1873 ± 19 BZ	0.72 ± 0.11 AX
28 Oct	0.06 ± 0.01 AX	3.33 ± 0.02 BY	0.79 ± 0.02 AX	83.09 ± 0.22 AZ	94.39 ± 0.27 ^{AZ}	8.56 ± 0.26 AZ	0.12 ± 0.05 AZ	1851 ± 13 BY	0.80 ± 0.26 AZ	

Values are mean ± standard deviation ($n = 2$). Different letters for each parameter indicate significant statistical differences ($p < 0.05$) between harvest dates for each cultivar and crop year (A–F), between crop years for each harvest date and cultivar (H–I) and between cultivars for each harvest date and crop year (X–Z). [†]Limits established by the current European legislation: total sterols ≥ 1000 mg/kg; cholesterol ≤ 0.5%; stigmasterol ≤ 4.0%; campesterol ≤ 0.1%; brassicasterol ≤ 0.1%; stigmasterol ≤ 0.5%; app. β-sitosterol ≥ 93%; E + U ≤ 4.5%. E + U = Sum of erythrodiol and uvaol. Values in bold type: non-compliance.

[36,49], although in other studies this is unclear [27,37,50]. Increases in sterol content have even been observed in direct analyses of olive pulp [51].

The main sterols in the three varieties were β -sitosterol, $\Delta 5$ -avenasterol, and campesterol, making up about 95% of the total content. The significant correlations ($p < 0.01$) we found in the analyzed oils were between stigmasterol and app. β -sitosterol ($r = -0.759$), as well as between β -sitosterol and $\Delta 5$ -avenasterol ($r = -0.991$); these findings coincide with those of other studies [27,50].

“Arbequina” olive oils presented the lowest β -sitosterol content (73.31–82.51%) and the highest $\Delta 5$ -avenasterol content (8.11–15.76%). The values of both sterols were similar to those described in “Arbequina” by Fernández-Cuesta et al. in olive pulp [51] and Rivera del Álamo et al. in oil [48]. The $\Delta 5$ -avenasterol content was lower than that reported by Gracia et al. in Aragon [29]. “Arbequina” also showed significant seasonal differences for these two sterols, with lower β -sitosterol and higher $\Delta 5$ -avenasterol values in 2019 oils. The “Negral de Sabiñán” olive oils presented the highest β -sitosterol content (83.09–84.80%). The results from our complete sampling indicate that the β -sitosterol/ $\Delta 5$ -avenasterol ratio (data not shown) decreased until early November, when it stabilized until the end of sampling in all three cultivars [27]. This finding coincides with the stabilization date of olive oil content expressed as dry matter (Figure 3). Previous studies have confirmed that β -sitosterol content is minimal and $\Delta 5$ -avenasterol is maximal when olives are at optimum ripeness [37,50–52].

Campesterol content was high in all three cultivars (3.16–4.29%), although the highest was found in “Arbequina” oils, even exceeding European regulatory limit values [13]. Campesterol decreased significantly during ripening, thereby following the same trend as β -sitosterol. Then, it reached a plateau in mid-November in “Arbequina” and “Royal de Calatayud” olive oils [45], although only in 2017 in the latter cultivar. Other authors have found no relationship between campesterol content and fruit maturity [36,37,48].

One sterol related to olive oil quality, specifically to acidity, is stigmasterol [36,53]. “Royal de Calatayud” olive oils had the highest acidity (Table 1) and stigmasterol

values (1.10–1.56%). This was the only cultivar in which stigmasterol correlated significantly with acidity ($r = 0.820$, $p < 0.01$) [53]. The lowest stigmasterol values were in “Negral de Sabinán” (0.57–0.79%). The results did not indicate a clear trend along ripening for this sterol.

$\Delta 7$ -stigmastenol is a minor sterol in olive oil, but not in other vegetable oils such as sunflower. It is one of the markers used to verify the authenticity of olive oil and to detect adulteration with other vegetable oils [39]. The olive oils in our study had low amounts of $\Delta 7$ -stigmastenol. Specifically, “Royal de Calatayud” oils showed higher percentages (0.22–0.36%), and “Negral de Sabinán” oils the lowest (0.12–0.17%). Moreover, $\Delta 7$ -stigmastenol did not display a clear trend depending on ripening, as did stigmasterol. Still, a higher amount of $\Delta 7$ -stigmastenol was found at the beginning of October in the first stages of ripening in all oils under study.

Triterpenic dialcohols (erythrodiol and uvaol) are also part of the unsaponifiable fraction of olive oil, and are analyzed together with sterols to detect possible adulterations [39]. Although “Royal de Calatayud” olive oils showed high contents of those alcohols (2.79–4.35%), the sum of both lay below the maximum limit (4.5%) established by European regulations [13]. Other cultivars exhibiting high contents of these triterpenic compounds have been described [52]. At the opposite end were the “Negral de Sabinán” oils, which had very low triterpenic alcohol contents. There was no ripening influence [49], although significant differences could be detected.

4.3.4.6. Chemometric Analysis

Factor analysis extraction by Principal Component Analysis (PCA) was used to identify which of the parameters analyzed explains the differences among the oils from the three cultivars. Using Kaiser’s rule (values higher than 1), the PCA model selected three principal components that explained 88.4% of the total variance, according to the twelve studied parameters. Only the first two PCs were represented (Figure 6). The selected agronomic parameters were fresh fruit weight and oil content (% dry olive paste weight). The selected parameters in oil were principal fatty acids, such as palmitic, oleic, and linoleic acid, in addition to total sterol content, campesterol, β -sitosterol, $\Delta 5$ -

avenasterol, Δ^7 -stigmastenol, triterpenic dialcohols, and oxidative stability. Figure 6.A explains the loadings corresponding to the extracted components (PC1 and PC2) according to the selected parameter. The regression method was applied to obtain the first two factor scores, which were saved as variables and subsequently represented to generate biplot 6.B via a scatter plot, labeling the cases by cultivar.

Discrimination by PCA of the three cultivars was possible, and can be studied in Figure 6. The first component (PC1; 49.4% variance) established the difference between the “Negral de Sabiñán” cultivar (negative axis) and the “Royal de Calatayud” cultivar (positive axis) according to the results. The oils from “Negral de Sabiñán” olives presented higher linoleic acid (C18_2) and sterol (Sterols) contents in comparison with “Royal de Calatayud” olive oils as a result of the negative correlations with PC1. “Royal de Calatayud” oils, on the other hand, presented higher oleic acid (C18_1), and better oxidative stability (OX_STB) via positive correlations with the first factor, in addition to higher Δ^7 -stigmastenol (D7Stig) and eritrodiol+uvaol (E_U) contents as unsaponifiable fraction compounds. The second principal component (PC2: 26.8% variance) clearly differentiates “Arbequina” (negative axis) from “Negral de Sabiñán” and “Royal de Calatayud” cultivars on the basis of higher campesterol (Camp) and higher Δ^5 -avenasterol (D5Av), but lower β -sitosterol content (b_sito). Agronomic parameters also indicated differences. Lower fruit weight (F_W) and lower oil yield (OC_DW) in “Arbequina” (negative axis) with respect to the other two cultivars were explained by the negative correlations of PC2 in fresh fruit weight and oil content (% dry olive paste weight).

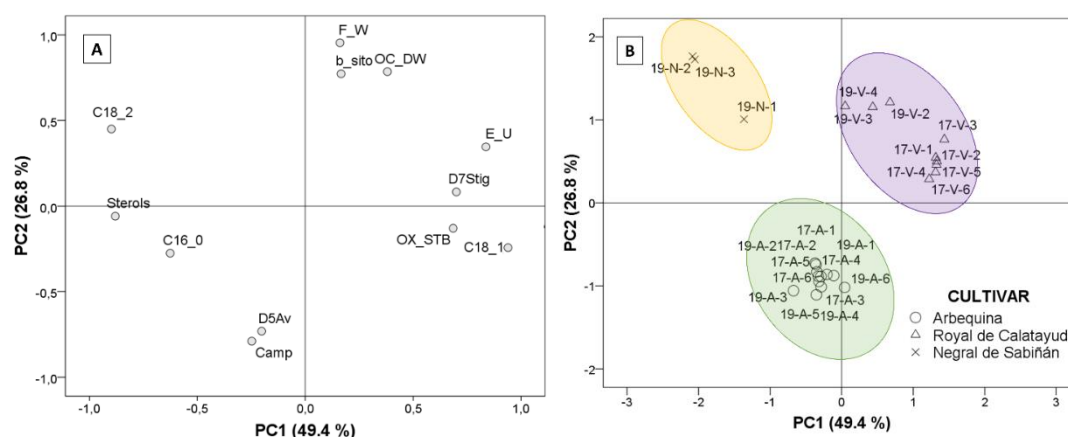


Figure 6. Plots of factor analysis loadings (A) and scores (B) of Principal Component Analysis (PCA) for the dataset. Cultivar: “Negral de Sabinán” (N), “Royal de Calatayud” (V), and “Arbequina” (A). Sample coding: YY-C-X (YY: crop year; C: cultivar; X: harvest date). Crop years: 2017 and 2019. Harvest dates: 1 (1–4 October), 2 (16–18 October), 3 (28 October–7 November), 4 (11–22 November), 5 (25–29 November), and 6 (11–13 December).

Cluster analysis successfully allowed for a varietal classification of the cultivars on the basis of the analyzed parameters as demonstrated in the dendrogram (Figure 7). Even the influence of the crop year can be observed in “Royal de Calatayud” cultivar.

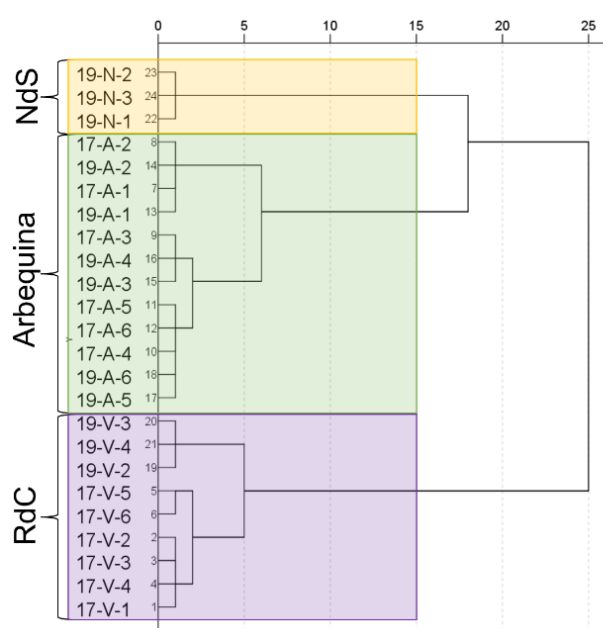


Figure 7. Dendrogram for the dataset. Cultivar: “Negral de Sabinán” (N), “Royal de Calatayud” (V), and “Arbequina” (A). Sample coding: YY-C-X (YY: crop year; C: cultivar; X: harvest date). Crop years: 2017 and 2019. Harvest dates: 1 (1–4 October), 2 (16–18 October), 3 (28 October–7 November), 4 (11–22 November), 5 (25–29 November), and 6 (11–13 December).

4.3.5. Conclusions

In this preliminary study, two minority cultivars, “Royal de Calatayud” and “Negral de Sabinán”, were characterized with respect to “Arbequina” as regards fruit parameters and olive oil quality. The chemometric analysis results showed significant differences among cultivars. Olives from “Royal de Calatayud” and “Negral de Sabinán” attained a greater degree of ripeness, weight, and oil yield than “Arbequina”. “Royal de Calatayud” olive oils presented the highest oxidative stability due to their better fatty acid composition, their higher oleic acid content, and their lower linoleic acid content. The polyphenol content in the oils of this cultivar was also higher than in “Arbequina”. On the other hand, “Negral de Sabinán” olive oils, despite their high polyphenol content, were the least stable ones, perhaps due to their high linoleic acid content. The study of the unsaponifiable fraction of the oils revealed non-compliance with EU regulations only in the case of “Arbequina” oils. The campesterol content in “Arbequina” oils from unripe olives ($IM \leq 1.0$) exceeded 4.0%.

In terms of nutritional value and oil yield, “Royal de Calatayud” oils are a possible attractive alternative to “Arbequina”, one of the most widespread cultivars in Spain and other countries.

Furthermore, by virtue of their specific advantages and characteristics, these monovarietal local cultivars stand out among the other virgin olive oils on the market. They could thus be reconsidered in terms of their economic potential and the variety they can introduce into the olive oil sector on a national and international level. Future experiments with more detailed studies on the responses of “Royal de Calatayud” and “Negral de Sabinán” to varying agronomic conditions could validate our results.

Author Contributions: Conceptualization, R.R.-G. and A.C.S.-G.; methodology, R.R.-G.; data curation, R.R.-G.; formal analysis, R.R.-G., S.V.A., D.L.R. and A.C.S.-G.; investigation, R.R.-G., S.V.A. and D.L.R.; writing—original draft preparation, R.R.-G.; writing—review and editing, A.C.S.-G. and R.R.-G.; supervision, A.C.S.-G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Data are contained within the article.

Acknowledgments: This work was supported by the Laboratorio Agroambiental and the Centro de Transferencia Agroalimentaria of the Aragon Government. The authors would like to thank Dra. Angjelina Belaj for her help in the accurate genotype identification of “Royal de Calatayud” cultivar. Raquel Rey-Giménez is especially grateful for the technical support of Lola Machina, José Luis Jiménez, Ana Julia Royo and Fernando Camuñas.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

4.3.6. References

1. Dag, C.; Demirtas, I.; Ozdemir, I.; Bekiroglu, S.; Ertas, E. Biochemical characterization of Turkish extra virgin olive oils from six different olive varieties of identical growing conditions. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2015**, *92*, 1349–1356.
2. Inglese, P.; Famiani, F.; Galvano, F.; Servili, M.; Esposto, S.; Urbani, S. Factors Affecting Extra-Virgin Olive Oil Composition. *Hortic. Rev. (Am. Soc. Hortic. Sci.)* **2011**, *38*, 83–147.
3. International Olive Council (IOC). Available online: <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/> (accessed on 1 June 2022).
4. Statistical Yearbook of Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Spanish Government. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/> (accessed on 1 June 2022).
5. Espada, J.L.; Gracia, M.S. *Variedades de Olivo Cultivadas en el Somontano de Barbastro y Características de Sus Aceites*; Gobierno de Aragón: Zaragoza, Spain, 2009.
6. Viñuales, J. *Variedades de Olivo del Somontano*; Instituto de Estudios Altoaragoneses: Huesca, Spain, 2007.
7. Benito, M.; Oria, R.; Sánchez-Gimeno, A.C. Characterization of the olive oil from three potentially interesting varieties from Aragon (Spain). *Food Sci. Technol. Int.* **2010**, *16*, 523–530.
8. Benito, M.; Abenoza, M.; Oria, R.; Sánchez-Gimeno, A.C. Physico-chemical, nutritional and sensory characterization of Verdeña, Verdilla and Royal varieties olive oil. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **2012**, *89*, 319–325.
9. Agricultural statistics of Department of Agriculture, Livestock and Environment, Government of Aragon. Spain. Available online: <https://www.aragon.es/-/estadisticas-agricolas> (accessed on 1 June 2022).
10. Barranco, D.; Trujillo, I.; Rallo, L. *Variedades de Olivo en España*; Barranco, D., Caballero, J.M., Del Río, C., Martín, A., Tous, J., Trujillo, I., Eds.; Junta de Andalucía, MAPA, Mundi Prensa: Madrid, Spain, 2005.
11. López, F.; Cabrera, M.; Cuadrat, J.M. La división climática en Aragón. *Atlas Climático de Aragón*; Gobierno de Aragón: Zaragoza, Spain, 2007; pp. 155–166.
12. Hermoso, M.; Uceda, M.; García, A.; Morales, B.; Frías, M.L.; Fernández, A. *Elaboración de Aceite de Oliva de Calidad. Colección: Apuntes, 5/91*; Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía: Sevilla, Spain, 1991.
13. European Commission (EC) Reg. No. 2568/91. On the characteristics of olive and olive-pomace oils and on their analytical methods. *Off. J. Eur. Union* **1991**, *L24*, 1.
14. Vázquez Roncero, A.; Janer del Valle, C.; Janer del Valle, M.L. Determinación de los polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas Aceites* **1973**, *24*, 350–357.
15. Gutiérrez, F. Determinación de la estabilidad oxidativa de aceites de oliva vírgenes: Comparación entre el método del oxígeno activo (A.O.M) y el método Rancimat. *Grasas Aceites* **1989**, *40*, 1–5.
16. Beltrán, G.; Del Río, C.; Sánchez, S.; Martínez, L. Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from cv picual. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 3434–3440.
17. Lavee, S.; Wodner, M.J. Factors affecting the nature of oil accumulation in fruit of olive (*Olea europaea* L.) cultivars *Hortic. Sci.* **1991**, *66*, 583–591.
18. De la Rosa, R.; Talhaoui, N.; Rouis, H.; Velasco, L.; León, L. Fruit characteristics and fatty acid composition in advanced olive breeding selections along the ripening period. *Food Res. Int.* **2013**, *54*, 1890–1896.

19. Gracia, P.; Sánchez-Gimeno, A.C.; Benito, M.; Oria, R.; Lasa, J.M. Short communication. Harvest time in hedgerow "Arbequina" olive orchards in areas with early frosts. *Span. J. Agric. Res.* **2012**, *10*, 179–182.
20. Ortega, D.; Beltrán, G.; Aguilera, M.P.; Uceda, M. *Vida Rural*; Eumedia: Madrid, Spain, 2004; p. 60.
21. Lavee, S.; Wodner, M. The effect of yield, harvest time and fruit size on the oil content in fruits of irrigated olive trees (*Olea europaea*), cvs. Barnea and Manzanillo. *Sci. Hortic.* **2004**, *99*, 267–277.
22. Uceda, M.; Hermoso, M.; Aguilera, M.P. *El Cultivo Del Olivo*; Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L., Eds.; Junta de Andalucía, MAPA, Mundi-Prensa: Madrid, Spain 2004; Chapter 17.
23. Ripa, V.; De Rose, F.; Caravita, M.A.; Parise, M.R.; Perri, E.; Rosati, A.; Pandolfi, S.; Paoletti, A.; Pannelli, G.; Padula, G.; et al. Qualitative evaluation of olive oils from new olive selections and effects of genotype and environment on oil quality. *Adv. Hort. Sci.* **2008**, *22*, 95–103.
24. Sánchez De Medina, V.; Priego-Capote, F.; Luque de Castro, M.D. The effect of genotype and ripening index on the phenolic profile and fatty acids composition of virgin olive oils from olive breeding programs. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2015**, *117*, 954–966.
25. Hernández, M.L.; Sicardo, M.D.; Belaj, A.; Martínez-Rivas, J.M. The Oleic/Linoleic Acid Ratio in Olive (*Olea europaea* L.) Fruit Mesocarp Is Mainly Controlled by *OeFAD2-2* and *OeFAD2-5* Genes Together With the Different Specificity of Extraplasmidial Acyltransferase Enzymes. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 653997.
26. Beltrán, G.; Uceda, M.; Hermoso, M.; Frías, L. *El Cultivo del Olivo*; Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L., Eds.; Junta de Andalucía, MAPA, Mundi-Prensa: Madrid, Spain 2004; Chapter 6.
27. Rey-Giménez, R.; Sánchez-Gimeno, A.C. Crop year, harvest date and clone effects on fruit characteristics, chemical composition and olive oil stability from an Empeltre clonal selection grown in Aragon. *J. Sci. Food Agric.* **2022**, *102*, 5778–5786.
28. Benito, M.; Lasa, J.M.; Gracia, P.; Oria, R.; Abenoza, M.; Varona, L.; Sánchez-Gimeno, A.C. Olive oil quality and ripening in super-high-density Arbequina orchard. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *93*, 2207–2220.
29. Gracia, M.S.; Royo, A.; Gillen, M. Composición química de aceites de las variedades Arbequina y Empeltre cultivadas en regadío. *Grasas Aceites* **2009**, *60*, 321–329.
30. Pérez-Arquillué, C.; Juan, T.; Valero, N.; Estopañán, G.; Ariño, A.; Conchello, P.; Herrera, A. *Grasas Aceites* **2003**, *54*, 151–160.
31. Montañó, A.; Hernández, M.; Garrido, I.; Llerena, J.L.; Espinosa, F. Fatty acid and phenolic compound concentrations in eight different monovarietal virgin olive oils from Extremadura and the relationship with oxidative stability. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 11–20.
32. Hernández, L.M.; Padilla, M.N.; Mancha, M.; Martínez-Rivas, J.M. Expression analysis identifies FAD2-2 as the olive oleate desaturase gene mainly responsible for the linoleic acid content in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 6199–6206.
33. Abenoza, M.; Lasa Dolhagaray, J.M.; Benito, M.; Oria, R.; Sánchez-Gimeno, A.C. The evolution of Arbequina olive oil quality during ripening in a commercial super-high density orchard in north-east Spain. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **2015**, *92*, 83–92.
34. Romero, M.P.; Tovar, M.J.; Ramo, T.; Motilva, M.J. Effect of crop season on the composition of virgin olive oil with protected designation of origin "Les Garrigues" J. *Am. Oil Chem. Soc.* **2003**, *80*, 423–430.
35. Angerosa, F.; Di Giacinto, L.; Basti, C.; Serraiocco, A. Influenza della variabile "ambiente" sulla composizione degli oli vergini di oliva. *Riv. Ital. Sostanze Grasse* **1996**, *73*, 461–467.
36. Gutiérrez, F.; Jiménez, B.; Ruíz, A.; Albi, M.A. Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on the different components involved. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 121–127.
37. Salvador, M.D.; Aranda, F.; Fregapane, G. Influence of fruit ripening on Cornicabra virgin olive oil quality. A study of four successive crop seasons. *Food Chem.* **2001**, *73*, 45–53.
38. Baccouri, O.; Guerfel, M.; Baccouri, B.; Cerretani, L.; Bendini, A.; Lercker, G.; Zarrouk, M.; Daoud, D. Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chem.* **2008**, *109*, 743–754.
39. Cert, A.; Alba, J.; León-Camacho, M.; Moreda, W.; Pérez-Camino, M.C. Effects of Talc Addition and Operating Mode on the Quality and Oxidative Stability of Virgin Olive Oils Obtained by Centrifugation. *J. Agr. Food Chem.* **1996**, *44*, 3930–3934.
40. Gutfinger, T. Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1981**, *58*, 966–968.
41. Beltrán, G.; Jiménez, A.; Aguilera, M.P.; Uceda, M. Análisis mediante HPLC de la fracción fenólica del aceite de oliva virgen de la variedad Arbequina. Relación con la medida del amargor K225 y la estabilidad. *Grasas Aceites* **2000**, *51*, 320–324.

42. Touss, J.; Romero, A.; Plana, J.; Guerrero, L.; Díaz, I.; Hermoso, J.F. Características químico-sensoriales de los aceites de oliva «Arbequina» obtenidos en distintas zonas de España. *Grasas Aceites* **1997**, *48*, 415–424.
43. Aparicio, R.; Roda, L.; Albi, M.A.; Gutiérrez, F. Effect of various parameters on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 4150–4155.
44. Tous, J.; Romero, A. *Variedades del olivo. Con Especial Referencia a Cataluña*; Fundación “La Caixa” — AEDOS: Barcelona, Spain, 1993.
45. Koutsaftakis, A.; Kotsifaki, F.; Stefanoudaki, E. Effect of Extraction System, Stage of Ripeness, and Kneading Temperature on the Sterol Composition of Virgin Olive Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1999**, *76*, 1477–1481.
46. Ceci, L.N.; Carelli, A.A. Characterization of monovarietal Argentinian olive oils from new productive zones. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2007**, *84*, 1125–1136.
47. Guillaume, C.; Ravetti, L.; Ray, D.L.; Johnson, J. Technological factors affecting sterols in Australian olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2012**, *89*, 29–39.
48. Rivera del Álamo, R.M.; Fregapane, G.; Aranda, F.; Gómez-Alonso, S.; Salvador, M.D. Sterol and alcohol composition of Cornicabra virgin olive oil: The campesterol content exceeds the upper limit of 4% established by EU regulations. *Food Chem.* **2004**, *84*, 533–537.
49. Sanchez Casas, J.; Bueno, E.O.; Montañó Garcia, A.M.; Cano, M.M. Sterol and erythrodiol + uvaol content of virgin olive oils from cultivars of Extremadura (Spain). *Food Chem.* **2004**, *87*, 225–230.
50. Lukić, M.; Lukić, I.; Krapac, M.; Sladonja, B.; Pilizota, V. Sterols and triterpene diols in olive oil as indicators of variety and degree of ripening. *Food Chem.* **2013**, *136*, 251–258.
51. Fernández-Cuesta, A.; León, L.; Velasco, L.; De la Rosa, R. Changes in squalene and sterols associated with olive maturation. *Food Res. Int.* **2013**, *54*, 1885–1889.
52. Fuentes De Mendoza, M.; De Miguel Gordillo, C.; Marín Expósito, J.; Sánchez Casas, J.; Martínez Cano, M.; Martín Vertedor, D.; Franco Baltasar, M.N. Chemical composition of virgin olive oils according to the ripening in olives. *Food Chem.* **2013**, *141*, 2575–2581.
53. Gracia, M.S. Composición química de distintas calidades de aceites de oliva virgen de la variedad “Empeltre” en el Bajo Aragón. *Grasas Aceites* **2001**, *52*, 52–58.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

4.4. ARTÍCULO IV:

Effect of cultivar and environment on chemical composition and geographical traceability of Spanish olive oils.

Rey-Giménez, R., Sánchez-Gimeno, A.C.

Journal of the American Oil Chemists' Society.

Estado: en revisión.

Effect of cultivar and environment on chemical composition and geographical traceability of Spanish olive oils

Raquel Rey-Giménez^a and Ana Cristina Sánchez-Gimeno^b

^a Laboratorio Agroambiental, Gobierno de Aragón, Avda. Montañana 1005, 50071 Zaragoza, Spain

^b Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Instituto Agroalimentario de Aragón– IA2, Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza, Spain

Correspondence:

Raquel Rey-Giménez, Laboratorio Agroambiental, Gobierno de Aragón, Avda. Montañana 1005, 50071 Zaragoza, Spain.

Ana Cristina Sánchez-Gimeno, Tecnología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, Instituto Agroalimentario de Aragón– IA2, Miguel Servet, 177, 50013, Zaragoza, Spain

KEYWORDS: olive oil; chemical composition; fatty acids; sterols; cluster; geographical origin.

Running title: Cultivar and environment affect Spanish olive oil composition

Acknowledgments. Rey-Giménez expresses her gratitude for the collaboration of olive oil mills and agricultural cooperatives in Aragon and especially to the colleagues of the Laboratorio Agroambiental.

4.4.1. Abstract

This study aimed to investigate the influence of cultivar and environment on the chemical composition of Arbequina and Empeltre olive oils, and their contribution to geographical identification of olive oils from Aragon. A total of 260 olive oil samples from different cultivars (Arbequina, Empeltre, Royal de Calatayud, Alquezrana, and Royeta de Asque) from the three main oil-producing areas of Aragon, located in northeast Spain, were selected. Fatty acid and sterol composition were analyzed in the course of three crop years (2017, 2018, and 2019). Cultivar was found the main factor influencing the variability of palmitic, palmitoleic, and linolenic fatty acid content, whereas geographic origin was the main contributor to variation in oleic and linoleic fatty acids in Arbequina and Empeltre olive oils. Cultivar also had a significant impact on sterol composition, although the effect of the production area also showed a significant effect on these oils. Crop year showed limited relevance, except for oleic and linoleic fatty acids. The interaction between environment (e.g., crop year and geographical factors) and the cultivar (Arbequina and Empeltre) exerted a significant influence on oleic/linoleic (O/L) ratio and Δ^7 -stigmastenol content, particularly in the southeast area of Aragon during the crop year with higher temperatures and drier conditions. Principal Component Analysis (PCA) and Discriminant Analysis (DA) confirmed the discriminative potential of the geographic production zone as a factor enabling the differentiation of olive oils from Aragon based on the major fatty acids and sterols.

4.4.2. Introduction

In Mediterranean countries, the olive tree (*Olea europea* L.) is a traditional, essential crop whose extended history has led to wide genetic variability. In Spain, 668 different genotypes of 1,273 accessions from 29 countries have been identified from the World Olive Germplasm Bank of Córdoba, Spain, by EST-SNP markers (Belaj, 2022).

Virgin olive oil is an olive juice obtained exclusively by physical processes. Triglycerides are its principal chemical compounds (about 98%), with monounsaturated oleic fatty acid (55-83%) as its main component. Other minor, but no less significant sterols, phenols, aliphatic and terpenic alcohols, tocopherols, pigments, and volatile compounds make up the remaining 2% of the chemical composition of olive oil. Some of these compounds, such as oleic acid or the phenolic fraction, contribute to the multiple health benefits associated with the consumption of virgin olive oil (EFSA, 2011). Moreover, an olive oil's characteristic fatty acid and sterol composition forms the basis for its authenticity and fingerprint, to avoid its adulteration with other vegetable oils or animal fats of inferior quality or price (EU, 2022). The chemical composition that characterizes and differentiates virgin olive oils is the result of complex biochemical processes that develop in the fruit and its oil. Genotype has therefore been identified as one of the most influential factors in the variability of the chemical composition of olive oils (Uceda, 2005). In turn, the biosynthetic pathways are conditioned by other factors that influence the chemical composition of olive oils, namely agronomic, environmental (climatic/geographic), and technological factors (Rallo, 2018; Mousavi, 2019; Navas-López, 2020; Sevim, 2022).

Variability in the composition of olive oils due to these or other factors can play a relevant role in their geographical traceability. Geographic origin is inseparable from a region's soil-climate conditions and cultural agronomic practices. Geographical origin is an issue of economic importance in the case of oils protected under designations of origin (PDO) that benefit local and rural economies (EC, 2021).

Spain is the world's leading producer (2020/21: 46%) and exporter (2020/21: 41%) of olive oil (IOC, 2022). Aragon, a region located in northeast Spain with two Protected Designations of Origin (Aragon Government, 2009; Aragon Government, 2010) and a third one in process (Aragon Government, 2023), is the country's sixth-largest virgin olive oil-producing region (2017/18: 17,363 tons of olive oil) (MAFF, 2022). Olives growing in this region are mainly rainfed (74%) (MAFF, 2022); thus, climatic variables such as water availability or annual temperatures exert a strong influence on oil production. Empeltre and Arbequina are the main cultivars in this region, making up 67% and 21 % of the crop, respectively (Aragon Government, 2023). The rest are autochthonous minority varieties (e.g., Royal de Calatayud, Alquezrana) that are limited to certain geographical areas, to which they confer their own specific identities.

With the aim of contributing toward the geographical traceability of olive oils produced in Aragon (Spain), the present study aims to investigate varietal and geographical differences in their composition. For this purpose, we studied the fatty acid and sterol composition of virgin olive oils from three olive-growing areas over three consecutive harvests.

4.4.3. Materials and methods

4.4.3.1. Characterization of olive oil samples and geographical areas

Virgin olive oils (n= 260) produced in three recognised geographical areas ("northeast", n =87; "west", n =74; "southeast", n = 99) of the Aragon region (Spain) (**Figure 1**) were evaluated. The study was conducted over three consecutive crop seasons (2017, n= 83; 2018, n= 94; 2019, n= 83) to evaluate the effects of interannual variability, which is mainly associated with climatological variables.

Oil samples were supplied from oil mills and cooperatives located in the geographical areas we selected. Fertilization, cultural practices, and technological processes of oil production were the ones habitually applied in the surrounding production areas. In this study, we only used olive oils classified as extra virgin olive oil based on physico-chemical quality (acidity $\leq 0.8\%$ oleic acid; peroxide value ≤ 20 meq

O₂/kg; K₂₇₀ ≤ 0.22; K₂₃₂ ≤ 2.50) according to Annex I of European Commission Regulation (EEC) n° 2568/91 (EEC, 1991) and subsequent amendments.

We carried out a study of varietal and environmental effects on fatty acid and sterol composition of Arbequina (n= 97) and Empeltre (n= 115) oils from the three selected geographical areas. To characterize the olive oils according to their geographical traceability, we selected, in addition to Arbequina and Empeltre, several autochthonous minority cultivars from Aragon as Alquezrana, Royeta de Asque, and Royal de Calatayud, as well as also coupages of local cultivars from the same three areas.

We selected the geographical areas in view of their important olive growing tradition and because they are culturally and geographically well-defined. Oils produced in the “west” and “southeast” areas can be placed under Protected Designations of Origin (PDO), while those from the “northeast” area are in the process of being recognized as such if they comply with certain requirements (Aragon Government, 2009; 2010; 2023).

The “northeast” olive-growing area (**Figure 1**, orange area) comprises 42 municipalities in the province of Huesca. In this region, due to its great diversity of local varieties, a wide range of single-varietal oils is produced. As these are minority varieties, the coupe oils produced in this area are characterized by combining many varieties with small-scale production. Local climate is classified as continental Mediterranean, characterized by warm summers and cool winters (López, 2007). The “southeast” olive-growing area includes 77 municipalities in two provinces: Zaragoza and Teruel. The main cultivars grown there are Empeltre (predominant) and Arbequina, traditionally unirrigated. Three climate types can be differentiated in that area: dry steppe, continental Mediterranean, and warm continental sub-Mediterranean (López, 2007), with a frequent phenomenon of “thermal inversion” in the winter, marked by episodes of thick fog. The “west” area, located in the province of Zaragoza, comprises 34 municipalities. Empeltre (predominant) and Arbequina are the main cultivars; as in the “southeast” area, they are traditionally dry-farmed. The climate is continental Mediterranean (López, 2007).

The climate data recorded during the three crop years under study in the main cities of each selected geographical area are shown in **Table 1**. Data on monthly temperature (mean, maximum, minimum) and monthly rainfall were taken from the Agro-Climate Information System for Irrigation (SIAR) of the Spanish Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (<https://eportal.mapa.gob.es>), as measured at meteorological stations located in Barbastro (northeast area), Borja (west area), and Alcañiz (southeast area).

4.4.3.2. Physico-chemical quality parameters

Free acidity, peroxide value, and ultraviolet absorption characteristics (K_{232} , K_{270} , ΔK) were determined according to methods indicated in European legislation (EEC, 1991). Data not shown.

4.4.3.3. Fatty acid composition

Fatty acid composition of the oils was determined following the official EU method (EC, 2015). Fatty acid methyl esters (FAME) were prepared by transesterification at room temperature, adding 0.2 ml of methanolic sodium hydroxide (2 mol/l) to 0.1 mg of oil. FAME analysis was performed by gas chromatography (GC), using an Agilent chromatograph (7890 N, Agilent, Santa Clara, CA, USA) with a capillary column SP-2380 (60 m \times 0.25 mm inner diameter \times 0.2 μ m film thickness; Supelco, Bellefonte, PA, USA). We applied the following operating conditions: helium as a carrier gas (flow: 1.2 mL min⁻¹); oven temperature was 170 °C (30 min), increasing by 5 °C min⁻¹ up to 200 °C, and the flame ionization detector (FID) and split/splitless injector temperatures were 260 and 250 °C, respectively.

4.4.3.4. Sterol composition

The oil samples were prepared and subjected to chromatographic analysis to determine their sterol composition, following the guidelines set by the European Commission implementing regulation (EU) No 2019/1604 (EC, 2019). For this purpose, the samples were saponified, purified using a elution mixture of n-hexane/ethyl ether 65:35 (V/V) through thin-layer chromatography and derivatized using a silanization

reagent (pyridine/hexamethyldisilazane/trimethylchlorosilane in a ratio of 9:3:1, v/v/v). Sterol derivatives (trimethylsilyl ethers) were subsequently analyzed by an Agilent gas chromatograph (GC) (6890, Agilent, Santa Clara, CA, USA) equipped with a split/splitless injector (injection volume: 1 μ L; split ratio, 1:50; 285 °C), a flame-ionization detector (FID) (300 °C), and a CP-Sil 8 CB capillary column (25 m length \times 0.25 mm inner diameter \times 0.25 μ m film thickness; Supelco, Bellefonte, PA, USA). Helium was used as a carrier gas (flow: 1 mL min⁻¹) and the oven temperature was isothermal at 265 °C.

Results were expressed as mg kg⁻¹ oil for total sterol oil content and, for individual sterols, as a percentage (%).

4.4.3.5. Statistical analysis

All analyses were performed in duplicate, thus utilizing the arithmetic mean of two results for subsequent statistical analysis.

On all the single-varietal olive oils selected for this study (n= 232), we performed a descriptive analysis of the variability of principal fatty acids and sterols according to cultivar and crop year. Data were presented as means \pm standard deviations, minimum, maximum, and coefficient variation. We then evaluated the effects of cultivar (Arbequina and Empeltre), crop year (2017, 2018, and 2019), and geographical area (northeast, west, and southeast), along with their interactions, on principal fatty acids (n = 212) and sterols (n = 94) by applying multivariate factorial analysis of variance (three-way ANOVA; $p < 0.05$). Scheffe post hoc test ($p < 0.05$) was used to determine the existence of significant pairwise differences between the groups.

Principal component analysis (PCA) was performed on Arbequina and Empeltre monovarietal oils (n = 94), using the fatty acid and sterol composition, in order to demonstrate the differentiation capacity of geographical production area and to determine chemical composition according to geolocation of a single-variety olive oil.

Geographic traceability was studied using a statistical procedure based on canonical discriminant analysis (DA) applied to fatty acids and sterols of single-varietal and coupage olive oils characteristic of the three geographical areas (n = 138). We

extracted the most discriminating independent variables among the olive-growing areas by applying the stepwise method, using Wilks' lambda and its chi-square approximation as the exclusion method. Snedecor's F statistic was used as the selection criterion. The model's predictive capability was estimated using the leave-one-out cross-validation method.

Statistical analyses were carried out using IBM SPSS Statistics 24.0 software (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Results and discussion

We studied three consecutive annual crops of the selected olive oils in order to include the season effect, understood as the influence of various abiotic factors such as temperature, humidity, and agronomic practices, among others, depending on the production year. Even with this premise, the variability study of the chemical composition of certain minority local cultivars over the three crop years in this Spanish area, Aragon, proved to be a complex undertaking. Certain data could not be obtained because the sample number was too small. Certain varieties, such as Royeta de Asque or Alquezrana, are only produced in the northeast area. Royal de Calatayud (also known with the synonym "Verdeña" in the northeast zone) is often marketed in the west zone as a coupage oil, although it can likewise be found in the northeast zone as a single-variety oil.

The selected coupage oil samples were only used for the geographical traceability study, as they were considered as oils bearing the identity of the production area from which they stemmed. They were not included in the fatty acid and sterol variability studies (descriptive statistics and ANOVA).

4.4.3.6. Variability in fatty acid composition: contributing factors

The composition of the principal fatty acids presents in Arbequina, Empeltre, and other single-varietal olive oils from the three olive-growing areas under study, along with their variability (CV%), is shown in **Table 2**. The acid profile of Arbequina and Empeltre olive oils is in line with that described by other authors for these two varieties (Gracia, 2009; Romero, 2011). Although they show significant differences in their fatty acid composition (**Table 2**), both have medium-high palmitic and linoleic and medium

oleic content (Uceda, 2005). Minority cultivar oils we studied, such as Alquezrana, Royeta de Asque, and Royal de Calatayud, had lower amounts of palmitic and linoleic acid than the aforementioned monovarietals, but higher amounts of oleic acid, which meant much higher O/L ratios, thereby implying that they are nutritionally healthier for the cardiovascular system (Covas, 2009).

In the main cultivars (Arbequina and Empeltre), the fatty acids with the highest variability (CV%) were palmitoleic acid (C16:1), followed by linoleic acid (C18:2) and linolenic acid (C18:3) but, in the minority monovarietals, C18:2 was the most variable fatty acid. On the other hand, oleic acid displayed less variability in all olive oils. The variability results in Empeltre coincide with those obtained in a controlled trial carried out on an experimental farm in the same crop years (Rey Giménez, 2022a). They also coincide with those shown by Navas-López et al. (2020) in nine varieties, one of them being Arbequina. The high variability in polyunsaturated fatty acids observed in each season could be caused by different harvesting dates for the olives that were used to produce the oils under study (Beltrán, 2004).

The varietal factor has been described in many studies as the main contributor to the variability of principal fatty acids in olive oils (Navas-López, 2020; Faci, 2021). The results obtained in our research indicated that the geographical location of the production area plays a role that is thoroughly relevant, and which is different for each fatty acid. Studies that analyze the environment, identified as location or as a location-crop year combination, together with the cultivar or other factors (Navas-López, 2020), corroborate the importance of the location factor and the need to study it further in depth. In our ANOVA study of Arbequina and Empeltre olive oils, we found that the variability of palmitic and linolenic fatty acids (particularly of the latter) was mainly affected by the cultivar, whereas the olive-growing area was a secondary factor (**Table 3**). The crop year factor was minimally significant for palmitic acid, and its effect was null for linolenic acid. Oleic and linoleic acids displayed different behavior: the location of the production area was the most influential factor in their variability, although the year of production was also important. According to the data in **Table 3**, the significantly

higher linoleic (10.89%) and lower oleic (70.82%) content of the oils from the southeast area could be related to higher drought and temperature stress during oil biosynthesis in that production area (monthly data not shown). These “southeast” oils also had higher linolenic acid content, which, together with their higher amount of linoleic acid, makes them more polyunsaturated (O/L ratio: 6.59%) than the oils from the “west” and “northeast” areas. The oils from the “west” area stood out for their lower palmitic and palmitoleic content and higher oleic acid content. Several authors (Navas-López, 2020; Mousavi, 2019; Contreras, 2023) have obtained results indicating that temperature exerts a regulatory effect on fatty acid synthesis. High temperatures during olive ripening would lead to a decrease in oleic acid and an increase in linoleic acid, although this effect would depend on the genotype. This hypothesis serves to explain the significant effect we observed in terms of inter-annual variability, mainly due to climatic variables. The oils produced in 2018 had higher oleic but lower palmitic and linoleic acid contents. As a result, these oils from crop year 2018 presented the highest O/L ratio. Thoroughly similar results were observed in a controlled trial on Empeltre carried out during the same period in Alcañiz, a principal town located in the “southeast” area (Rey-Giménez, 2022a).

For all fatty acids, the interaction between cultivar and production area was significant, and in some of them, it was the only significant interaction between factors. This interaction may be due to different local cultural practices according to the variety, as in the case of Empeltre in the southeast area. Empeltre olives are harvested at more advanced stages of ripening because of their dual aptitude (table and oil). This practice gives Empeltre oils their “sweet, almondy” taste as listed in the specifications of the Protected Designation of Origin “Aceite del Bajo Aragón” (Aragon Government, 2009).

Arbequina and Empeltre oils responded in equal measure to annual variation (Y x C) in all fatty acids except for linoleic acid, where the interaction was significant. However, in all acidic compositions, the response according to cultivar varied geographically (C x A). In the oil-producing areas we studied, varying responses were

also found in linoleic acid to annual variation ($Y \times A$), as well as in the triple interaction among the factors under consideration ($Y \times C \times A$).

4.4.3.7. Variability of sterol composition: contributing factors

Over three consecutive crop years, we studied the variability of sterol composition in 110 single-varietal oils produced in the three selected olive-growing areas in Aragon (**Table 2**). Empeltre oils had the lowest relative content in $\Delta 5$ -avenasterol, but the highest in β -sitosterol and $\Delta 7$ -stigmastenol compared to the other single-variety oils. At the opposite extreme were the Arbequina and Royeta de Asque oils, which differed from each other, and also from the other oils, in their campesterol percentages, which were higher in Arbequina but lower in Royeta de Asque. The latter also had very low sterol content.

All oils we analyzed complied with the limits established by European legislation and the IOC trade standard (EEC, 1991; IOC, 2022) regarding purity criteria for sterol composition (data not shown), except for $\Delta 7$ -stigmastenol. Thirty-three percent of the oils had a $\Delta 7$ -stigmastenol content higher than 0.5% (EEC, 1991; IOC, 2022), of which 29% were Empeltre single-varietal oils ($n = 60$) and the rest were coupage oils ($n = 28$) in which the Empeltre variety was predominant (individual sample data not shown; average $\Delta 7$ -stigmastenol values higher than 0.5% in bold, **Table 2**). High $\Delta 7$ -stigmastenol values that compromise the authenticity of single-varietal olive oils have been described in Empeltre (Gracia, 2009; Romero, 2011; Rey Giménez, 2022b) as well as in other varieties (Manai Djebali, 2012; Sevim, 2022). These findings could support the hypothesis that a high $\Delta 7$ -stigmastenol content is characteristic of certain cultivars.

Considerable differences can be noted in the variability (CV%) of each sterol (**Table 2**). Stigmasterol, $\Delta 5$ -avenasterol, and $\Delta 7$ -stigmastenol exhibited much higher coefficients of variation than campesterol and β -sitosterol. The variability of the two latter sterols even remained minimal in the minority cultivar oils, whose results were not segregated by year as there were not enough samples. These variabilities coincide with those described in previous studies on Empeltre (Rey-Giménez, 2022b), Arbequina, and other cultivars (Navas-López, 2020).

ANOVA analysis performed on Empeltre and Arbequina oils showed that cultivar is the main factor contributing to variability in the main sterols (**Table 4**). This is in agreement with the study by Navas-López et al. (2020) on the variability of β -sitosterol and $\Delta 5$ -avenasterol. The effect of cultivar was clear and significant for all sterols except for stigmasterol, on which other factors had effects of comparable magnitude. This result reinforces the hypothesis that high $\Delta 7$ -stigmastenol content is a varietal characteristic, analogous to the high campesterol content of the Cornicabra variety (Rivera del Álamo, 2004). The significant differences in $\Delta 7$ -stigmastenol between the Arbequina (0.19%) and Empeltre (0.59%) varieties are shown in **Table 4**. Meanwhile, in a study on Arbequina and Coratina from different regions of Argentina, Torres et al. (2022) observed that the growth environment exerted a more pronounced influence than cultivar on the variability of β -sitosterol, stigmasterol, campesterol, and total sterols. In our results, the influence of the growth environment on total sterols was likewise more important than the other factors, or had a similar effect to cultivar on stigmasterol, although the effect was always significant in all sterols. Warmer environments would tend to increase total sterol content according to some authors (Mailer, 2010; Li, 2019; Torres, 2022); in our case, this would be reflected in the “southeast” oils, which had higher sterol concentrations. Low relative humidity and high annual temperatures would tend to increase $\Delta 7$ -stigmastenol content (Sevim, 2022), as would a warmer growing environment (Li, 2019). The “southeast” production area exhibited the highest content of this sterol, which may be due to a climate that is drier and warmer than the two other zones under study. This would also corroborate the findings of Sevim et al. (2022). On the other hand, rainfall in 2017 and 2019 was low; however, as opposed to 2019, rainfall in 2017 did not occur during the period of lipogenesis. That could be the reason for the higher $\Delta 7$ -stigmastenol content of the 2017 oils. Regarding the influence of the environment on sterols, positive results have been reported in other publications, although most of them did not assess other factors simultaneously (Mailer, 2010; Bajoub, 2015). Significant interactions noted in our results suggest that the intensity of the response of certain individual sterols to the environment (geolocation and year of production) would depend on the cultivar.

4.4.3.8. Olive oil classification according to geographical origin

Cultivar was one of the factors that exerted the greatest influence (**Table 3; Table 4**) on most sterols and fatty acids. However, the variability associated with the production area could sufficiently support a differentiated chemical composition of olive oils that would also allow them to be classified according to their geographical origin.

To demonstrate this hypothesis, we carried out a principal component analysis (PCA) according to the geolocation of the oils of the main varieties, Arbequina ($n = 34$) and Empeltre ($n = 60$), basing ourselves on the fatty acid and sterol composition of the single-variety oils obtained during the three consecutive crop years. **Figure 2** shows the PCA biplots obtained for the two cultivars. The two principal components explained 65.9% of total variance for Arbequina oils and 70.8% for Empeltre. No grouping by geographical area according to scores was observed in the case of Arbequina, whereas in Empeltre three clusters (northeast, west, and southeast) were clearly differentiated (**Figure 2B**). This would support the importance of the geographical factor (**Table 3; Table 4**), in the Empeltre oils. Therefore, in this scenario, the influence of the geographical factor depends on the cultivar. In the PCA analysis of Empeltre oils, PC1 (53.21%) differentiated the cluster formed by the oils from the southeast zone from the northeast and west zones. **Figure 2B** thus shows that the oils from the southeast cluster displayed higher contents of $\Delta 7$ -stigmastenol (D7Stig), β -sitosterol (b_sito), and total sterols (Sterols), as well as of linoleic (C18_2), and linolenic (C18_3) fatty acids, but lower contents of $\Delta 5$ -avenasterol (D5Av), stigmasterol (Stig), and oleic acid (C18_1). According to this, Empeltre oils from the southeast part of Aragon would have a higher $\Delta 7$ -stigmastenol content than Empeltre oils in the other two olive-growing areas under study. Also, they are characterized by a higher content in polyunsaturated fatty acids. Oleic acid correlated negatively with the two main components (PC1, PC2): thus, Empeltre oils from the western cluster would be characterized by higher percentages of oleic acid (C18_1). Finally, Empeltre oils from the northeast cluster would be characterized by higher contents of stigmasterol and $\Delta 5$ -avenasterol.

The olive oils marketed in Aragon are not exclusively Arbequina and Empeltre monovarietal oils, but include other minority varieties as well as coupages made from the characteristic olive production of each region. To demonstrate the differentiating power of the regional factor in olive oils based on their fatty acid and sterol composition, we subjected 138 representative samples of the three geographical areas under study to a classification test using canonical discriminant analysis (DA). Two canonical discriminant functions were obtained with 100% of the total discriminant power (**Figure 3**). This finding corroborated the differentiation of oils produced in Aragon into the 3 clusters defined by PCA in Empeltre oils through 8 parameters that were finally selected as discriminant variables: palmitic, oleic, linoleic and linolenic fatty acids, the three sterols β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol, and Δ^7 -stigmastenol, as well as total sterol content. **Figure 3**, which represents the two canonical functions on the plane, shows the separation of the three geographical areas according to the oils' chemical composition. The classification functions thereby obtained were capable of correctly assigning 91.3% of the samples. Meanwhile, 88.4% of the olive oils we had analyzed were correctly assigned in the cross-validation procedure (northeast, 91.8%; west, 88.9%; southeast, 82.9%).

4.4.4. Conclusion

Cultivar was the factor which exerted the greatest influence upon the variability of chemical composition of olive oils from three oil-producing areas in Aragon. This finding would support the hypothesis of high Δ^7 -stigmastenol content (greater than 0.5%) obtained in Empeltre oils (29% of the total) as a varietal characteristic. The area of origin mainly affected oleic and linoleic acid content and was significant in all parameters under study. Moreover, significant interaction effects indicated that variability in sterol composition associated with the environment (geolocation and year of production) would depend on the cultivar. PCA analysis showed that the differentiation that the geographic area would bring to the olive oils' chemical composition allows for Empeltre oils to be classified according to their origin but is not sufficient to classify Arbequina oils. This would confirm the importance of

environmental influence depending on the cultivar. Our discriminant analysis correctly classified 91.3% of the olive oils from the three studied areas of Aragon, Spain.

Conflict of Interest. The authors declare that they have no conflict of interest.

Funding: This research received no external funding.

Figure and table captions

Figure 1. Geographical location in Aragon (Northwest Spain) of the three olive-growing areas used in the study.

Figure 2. PCA loadings (A) and scores (B) biplots for fatty acid and sterols in Arbequina and Empeltre olive oils from three different geographical areas.

Figure 3. Canonical discriminant functions plot obtained to predict the geographical area origin of olive oils.

Table 1. Meteorological data of three geographical areas of Aragon, Spain, selected for study during 2017, 2018 and 2019 crop years.

		Northeast (Barbastro*)			West (Borja*)			Southeast (Alcañiz*)		
		2017	2018	2019	2017	2018	2019	2017	2018	2019
T ^a annual	average (°C)	14.4	14.4	14.6	14.7	14.4	14.8	15.6	15.5	16.0
T ^a max	average (°C)	27.6	27.0	27.9	27.5	26.2	28.4	22.8	21.9	23.0
T ^a min	average (°C)	1.5	2.9	2.4	2.3	3.1	2.3	8.9	9.7	9.3
Rainfall	annual (mm)	473	699	442	332	546	365	223	508	216
Altitude	(m)	341			448			381		

*The data refer to the localities Barbastro, Borja, Alcañiz, which are the main cities of the indicated geographical areas.

Table 2. Statistical summary of the chemical composition analysis (fatty acids and sterols) of virgin olive oils from the Arbequina, Empeltre, Alqueznra, Royeta de Asque and Royal de Calatayud varieties from three geographical areas of Aragón over three consecutive years (n = 232 samples)

Cultivar	Year	Fatty acid composition												Sterol composition												O/L ratio			
		C16:0 (%)			C16:1 (%)			C18:0 (%)			C18:1 (%)			C18:2 (%)			C18:3 (%)			*5-avenasterol (%)			*7-stigmasterol† (%)						
		Mean ±SD	Min – Max	CV %	Mean ±SD	Min – Max	CV %	Mean ±SD	Min – Max	CV %	Mean ±SD	Min – Max	CV %	Mean ±SD	Min – Max	CV %	Mean ±SD	Min – Max	CV %	Mean ±SD	Min – Max	CV %	Mean ±SD	Min – Max	CV %	Mean ±SD	Min – Max	CV %	
Arbequina (n = 97)	2017	13.84 ± 0.96	10.98 – 15.44	7	1.37 ± 0.17	0.87 – 1.65	12	1.97 ± 0.14	1.77 – 2.31	7	71.35 ± 1.61	68.20 – 75.37	2	9.78 ± 0.85	7.53 – 11.09	9	0.51 ± 0.04	0.45 – 0.62	8	7.37 ± 0.80	6.20 – 9.60	11	0.51 ± 0.04	0.43 – 0.67	10	8.85 ± 1.35	6.00 – 10.60	15	
	2018	13.15 ± 1.00	10.85 – 14.89	8	1.16 ± 0.21	0.78 – 1.62	18	2.01 ± 0.20	1.67 – 2.43	10	73.48 ± 2.08	69.19 – 76.88	3	8.48 ± 1.20	7.13 – 11.48	14	0.51 ± 0.05	0.43 – 0.67	10	8.85 ± 1.35	6.00 – 10.60	15	0.51 ± 0.05	0.43 – 0.67	10	8.85 ± 1.35	6.00 – 10.60	15	
	2019	13.70 ± 1.01	11.33 – 15.58	7	1.27 ± 0.21	0.87 – 1.88	17	1.97 ± 0.12	1.72 – 2.28	6	72.13 ± 2.25	66.48 – 75.12	3	9.19 ± 1.33	7.78 – 12.63	14	0.53 ± 0.05	0.42 – 0.66	10	8.04 ± 1.33	5.30 – 11.10	17	0.53 ± 0.05	0.42 – 0.66	10	8.04 ± 1.33	5.30 – 11.10	17	
	2017	12.56 ± 1.13	10.88 – 15.05	9	1.09 ± 0.19	0.83 – 1.52	17	1.94 ± 0.17	1.70 – 2.34	9	71.59 ± 2.51	68.26 – 76.30	4	10.90 ± 1.43	8.07 – 13.41	13	0.69 ± 0.09	0.44 – 0.83	14	6.72 ± 1.16	5.20 – 9.50	17	0.69 ± 0.09	0.44 – 0.83	14	6.72 ± 1.16	5.20 – 9.50	17	
Empeltre (n = 115)	2018	12.24 ± 1.12	10.56 – 15.88	9	1.02 ± 0.17	0.76 – 1.33	17	1.95 ± 0.17	1.68 – 2.42	9	73.20 ± 1.92	69.40 – 76.89	3	9.63 ± 1.08	7.91 – 12.40	11	0.69 ± 0.08	0.58 – 0.86	11	7.72 ± 1.07	5.70 – 9.70	14	0.69 ± 0.08	0.58 – 0.86	11	7.72 ± 1.07	5.70 – 9.70	14	
	2019	12.82 ± 0.91	11.27 – 15.00	7	1.06 ± 0.16	0.85 – 1.39	15	1.90 ± 0.15	1.65 – 2.22	8	72.15 ± 2.05	68.04 – 75.99	3	10.16 ± 1.49	7.27 – 12.83	15	0.69 ± 0.08	0.57 – 0.85	11	7.29 ± 1.31	5.40 – 10.40	18	0.69 ± 0.08	0.57 – 0.85	11	7.29 ± 1.31	5.40 – 10.40	18	
Alquezrana (n = 5)	2017-19	11.63 ± 0.57	11.00 – 12.52	5	0.95 ± 0.08	0.81 – 1.00	9	2.14 ± 0.21	1.94 – 2.49	8	77.19 ± 2.10	74.74 – 79.77	3	6.35 ± 1.47	4.60 – 8.39	23	0.55 ± 0.06	0.51 – 0.64	11	12.76 ± 3.26	8.9 – 17.3	26	0.55 ± 0.06	0.51 – 0.64	11	12.76 ± 3.26	8.9 – 17.3	26	
Royeta Asque (n = 7)	2017-19	11.31 ± 0.50	10.69 – 12.22	4	0.87 ± 0.09	0.78 – 1.02	11	2.84 ± 0.38	2.45 – 3.38	13	76.84 ± 1.69	74.56 – 78.98	2	6.37 ± 1.01	5.29 – 7.75	16	0.51 ± 0.02	0.48 – 0.54	5	12.35 ± 2.14	9.6 – 14.9	17	0.51 ± 0.02	0.48 – 0.54	5	12.35 ± 2.14	9.6 – 14.9	17	
Royal Calatayud (n = 8)	2017-19	12.16 ± 0.53	11.23 – 12.74	4	0.99 ± 0.08	0.90 – 1.12	9	2.08 ± 0.18	1.87 – 2.43	9	76.04 ± 1.11	74.42 – 78.02	1	6.89 ± 0.74	5.67 – 7.96	11	0.55 ± 0.04	0.51 – 0.62	8	11.17 ± 1.40	9.4 – 13.8	13	0.55 ± 0.04	0.51 – 0.62	8	11.17 ± 1.40	9.4 – 13.8	13	
Cultivar	Year	Total sterols† (mg/kg)			Campesterol† (%)			Stigmasterol† (%)			*5-sitosterol (%)			*5-avenasterol (%)			*7-stigmasterol† (%)												
		Mean ±SD	Min – Max	CV %	Mean ±SD	Min – Max	CV %	Mean ±SD	Min – Max	CV %	Mean ±SD	Min – Max	CV %	Mean ±SD	Min – Max	CV %	Mean ±SD	Min – Max	CV %										
Arbequina (n = 34)	2017	1355 ± 126	1132 – 1548	9	3.33 ± 0.17	3.05 – 3.58	5	0.76 ± 0.09	0.65 – 0.91	11	74.86 ± 2.54	70.32 – 78.80	3	16.93 ± 2.63	12.80 – 21.44	16	0.21 ± 0.08	0.12 – 0.37	36	0.21 ± 0.08	0.12 – 0.37	36	0.21 ± 0.08	0.12 – 0.37	36	0.21 ± 0.08	0.12 – 0.37	36	
	2018	1237 ± 131	1101 – 1542	11	3.22 ± 0.19	2.89 – 3.49	6	0.85 ± 0.10	0.66 – 1.01	12	73.08 ± 3.29	66.12 – 77.06	5	18.76 ± 3.32	14.48 – 25.81	18	0.20 ± 0.07	0.08 – 0.30	35	0.20 ± 0.07	0.08 – 0.30	35	0.20 ± 0.07	0.08 – 0.30	35	0.20 ± 0.07	0.08 – 0.30	35	
	2019	1330 ± 164	1112 – 1671	12	3.30 ± 0.16	3.09 – 3.61	5	0.91 ± 0.16	0.67 – 1.27	18	73.58 ± 2.72	68.88 – 77.87	4	17.64 ± 2.36	14.39 – 21.44	13	0.17 ± 0.04	0.10 – 0.26	26	0.17 ± 0.04	0.10 – 0.26	26	0.17 ± 0.04	0.10 – 0.26	26	0.17 ± 0.04	0.10 – 0.26	26	
	2017	1488 ± 141	1263 – 1795	9	2.94 ± 0.12	2.80 – 3.41	4	0.68 ± 0.15	0.40 – 0.95	22	83.94 ± 1.35	81.79 – 86.80	2	7.76 ± 1.32	4.90 – 10.10	17	0.66 ± 0.09	0.44 – 0.85	14	0.66 ± 0.09	0.44 – 0.85	14	0.66 ± 0.09	0.44 – 0.85	14	0.66 ± 0.09	0.44 – 0.85	14	
Empeltre (n = 60)	2018	1490 ± 227	1180 – 1918	15	2.92 ± 0.07	2.76 – 3.04	2	1.00 ± 0.35	0.57 – 1.90	35	83.42 ± 1.88	80.05 – 86.86	2	8.35 ± 1.51	5.38 – 10.76	18	0.49 ± 0.08	0.36 – 0.66	17	0.49 ± 0.08	0.36 – 0.66	17	0.49 ± 0.08	0.36 – 0.66	17	0.49 ± 0.08	0.36 – 0.66	17	
	2019	1342 ± 143	1119 – 1571	11	2.85 ± 0.13	2.66 – 3.07	5	1.01 ± 0.34	0.60 – 1.73	34	83.19 ± 2.19	79.69 – 85.89	3	8.05 ± 1.83	5.69 – 10.96	23	0.63 ± 0.10	0.46 – 0.74	16	0.63 ± 0.10	0.46 – 0.74	16	0.63 ± 0.10	0.46 – 0.74	16	0.63 ± 0.10	0.46 – 0.74	16	
Alquezrana (n = 4)	2017-19	1334 ± 151	1116 – 1457	11	3.15 ± 0.14	3.03 – 3.34	4	1.27 ± 0.36	0.76 – 1.53	29	76.71 ± 1.12	75.11 – 77.71	1	14.59 ± 1.39	13.25 – 16.51	10	0.23 ± 0.09	0.16 – 0.36	40	0.23 ± 0.09	0.16 – 0.36	40	0.23 ± 0.09	0.16 – 0.36	40	0.23 ± 0.09	0.16 – 0.36	40	
Royeta Asque (n = 5)	2017-19	1114 ± 59	1028 – 1191	5	2.61 ± 0.11	2.47 – 2.77	4	0.61 ± 0.47	0.29 – 1.43	77	72.71 ± 2.06	70.95 – 76.24	3	18.50 ± 1.88	15.21 – 19.89	10	0.28 ± 0.06	0.21 – 0.35	21	0.28 ± 0.06	0.21 – 0.35	21	0.28 ± 0.06	0.21 – 0.35	21	0.28 ± 0.06	0.21 – 0.35	21	
Royal Calatayud (n = 7)	2017-19	1223 ± 133	1103 – 1497	11	2.93 ± 0.10	2.75 – 3.05	3	1.35 ± 0.45	0.67 – 1.97	33	80.12 ± 1.03	78.79 – 81.66	1	10.92 ± 1.43	9.62 – 13.28	13	0.29 ± 0.04	0.24 – 0.35	16	0.29 ± 0.04	0.24 – 0.35	16	0.29 ± 0.04	0.24 – 0.35	16	0.29 ± 0.04	0.24 – 0.35	16	

Abbreviations: SD, standard deviation; Min, minimum; Max, maximum; CV, coefficient of variation C16:0, palmitic acid; C16:1, palmitoleic acid; C18:0, stearic acid; C18:1, oleic acid; C18:2, linoleic acid; C18:3, linolenic acid; O/L ratio: oleic acid/linoleic acid ratio. Limits established by the current EU/IOC regulatory for OOV: total sterols ≥ 1000 mg/kg; campesterol $\leq 4.0\%$; stigmasterol \leq campesterol; $\Delta 7$ -stigmasterol $\leq 0.5\%$. Values in bold: non-compliant.

Table 3. Analysis of variance (F-values) by 3-way ANOVA with significance levels[†] and comparison of means by crop years (2017, 2018 and 2019), cultivar (Arbequina and Empeltre) and geographical area (northeast, west and southeast) for the fatty acid composition (n = 212 samples).

Variability source	Parameters						
	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	O/L ratio
Crop year (Y)	4*	10*	0	24**	30**	0	33**
Cultivar (C)	52***	58***	3	14***	6*	173***	2
Geographical area (A)	34**	22***	1	95***	81***	48***	81***
Y x C	1	1	1	0	3*	0	2
Y x A	1	2	3*	2	5***	1	7***
C x A	3*	4*	5**	5**	7**	6**	6**
Y x C x A	1	1	3*	2	6**	0	5**
Crop year							
2017	13.10 ^a	1.20 ^a	1.96	71.51 ^a	10.40 ^a	0.62	7.02 ^a
2018	12.67 ^b	1.09 ^b	1.97	73.33 ^b	9.09 ^b	0.61	8.25 ^b
2019	13.20 ^a	1.15 ^{ab}	1.94	72.11 ^c	9.79 ^c	0.62	7.57 ^c
Cultivar							
Arbequina	13.54 ^a	1.26 ^a	1.99	72.37 ^a	9.13 ^a	0.52 ^a	8.12
Empeltre	12.51 ^b	1.05 ^b	1.93	72.31 ^b	10.27 ^b	0.69 ^b	7.22
Geographical area							
Northeast	13.45 ^a	1.22 ^a	1.97	72.98 ^a	8.64 ^a	0.54 ^a	8.59 ^a
West	12.31 ^b	1.06 ^b	1.98	74.03 ^b	8.90 ^a	0.55 ^a	8.42 ^a
Southeast	13.22 ^a	1.17 ^a	1.94	70.82 ^c	10.89 ^b	0.70 ^b	6.59 ^b

[†]Significance levels: *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, p < 0.001. Different letters values (a-c) indicate significant differences (Scheffe test, p < 0.05) for each parameter. Absence of letters: no significant differences between means were found. Abbreviations: C16:0, palmitic acid; C16:1, palmitoleic acid; C18:0, stearic acid; C18:1, oleic acid; C18:2, linoleic acid; C18:3, linolenic acid; O/L ratio: oleic acid/linoleic acid ratio.

Table 4. Analysis of variance (F-values) by 3-way ANOVA with significance levels[†] and comparison of means by crop years (2017, 2018 and 2019), cultivar (Arbequina and Empeltre) and geographical area (northeast, west and southeast) for the sterol composition (n = 94 samples).

Variability source	Parameters					
	Sterols ^{††}	Campesterol ^{††}	Stigmasterol ^{††}	β -sitosterol	$\Delta 5$ -avenasterol	$\Delta 7$ -stigmastenol ^{††}
Crop year (Y)	3	3	8**	3	3	6**
Cultivar (C)	4*	120***	14***	335***	375***	353***
Geographical area (A)	7**	4*	10***	7**	4*	4*
Y x C	3	1	3	4*	3*	7**
Y x A	1	1	1	2	2	1
C x A	6**	0	9***	6**	4*	2
Y x C x A	1	2	2	0	0	3*
Crop year						
2017	1451	3.06	0.70 ^a	81.09	10.66	0.52 ^a
2018	1410	3.01	0.96 ^b	80.17	11.62	0.40 ^b
2019	1325	3.06	0.91 ^b	79.01	12.31	0.43 ^b
Cultivar						
Arbequina	1303 ^a	3.28 ^a	0.82 ^a	73.83 ^a	17.84 ^a	0.19 ^a
Empeltre	1460 ^b	2.91 ^b	0.86 ^b	83.70 ^b	7.95 ^b	0.59^b
Geographical area						
Northeast	1270 ^a	3.21 ^a	0.97 ^a	75.42 ^a	15.92 ^a	0.26 ^a
West	1357 ^b	2.95 ^b	0.84 ^b	80.69 ^b	10.97 ^b	0.48 ^b
Southeast	1528 ^c	3.01 ^b	0.77 ^b	82.90 ^c	8.96 ^c	0.55^c

[†]Significance levels: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. Not significant: ns. Different letters values (a-c) indicate significant differences (Scheffe test, $p < 0.05$) for each parameter. Absence of letters: no significant differences between means were found. ^{††}Limits established by the current EU/IOC regulatory for OOV: total sterols ≥ 1000 mg/kg; campesterol $\leq 4.0\%$; stigmasterol \leq campesterol; $\Delta 7$ -stigmastenol $\leq 0.5\%$. Values in bold: non-compliant.

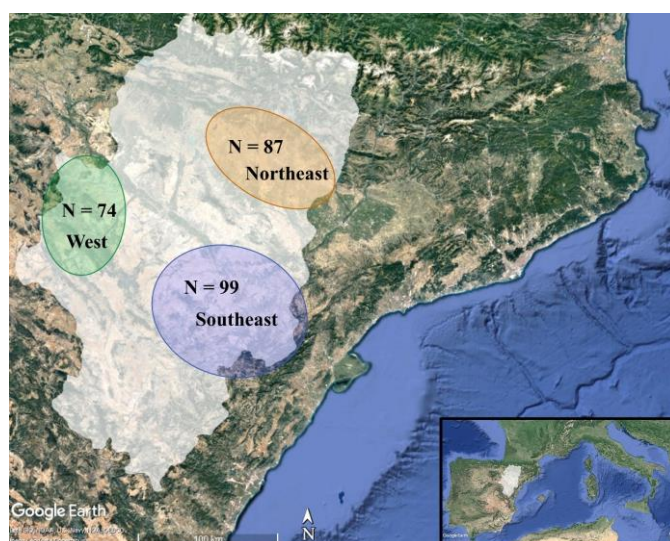


Figure 1. Geographical location in Aragon (Northeast Spain) of the three olive-growing areas used in the study.

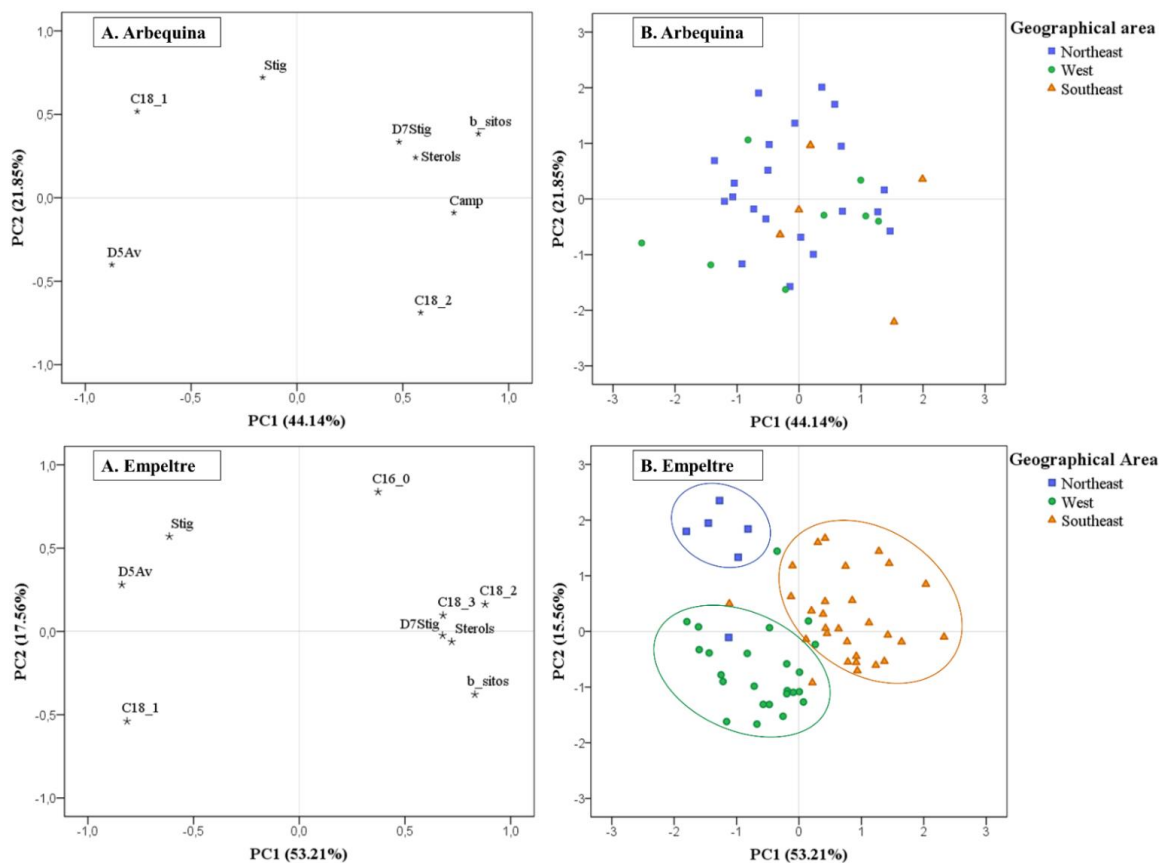


Figure 2. PCA loadings (A) and scores (B) biplots for fatty acid and sterols in Arbequina and Empeltre olive oils from three different geographical areas. Abbreviations: C16_0, palmitic acid; C18_1, oleic acid; C18_2, linoleic acid; C18_3, linolenic acid; Sterols, total sterols; Camp, campesterol; Stig, stigmasterol; b_sito, β -sitosterol; D5Av, Δ 5-avenasterol; D7Stig, Δ 7-stigmasterol.

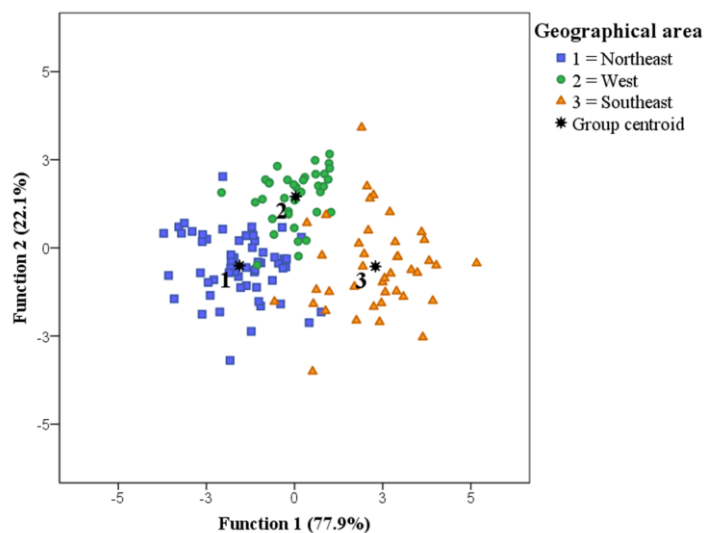


Figure 3. Canonical discriminant functions plot obtained to predict the geographical area origin of olive oils.

4.4.5. References

- Aragon Government 2023. Agricultural statistics of Aragon. <https://www.aragon.es/-/estadisticas-agrarias> (Accessed on January 2023)
- Aragon Government. Order of 17 March 2009, of the Regional Minister for Agriculture and Food, approving the specific regulations for the protected designation of origin “Aceite del Bajo Aragón”. BOA. 2009:70
- Aragon Government. Order of 19 July 2010, of the Regional Minister for Agriculture and Food, approving the specific rules for the protected designation of origin “Aceite Sierra del Moncayo” and granting transitional protection. BOA. 2010:173.
- Aragon Government. Resolution of 23 December 2022, of the Directorate-General for Innovation and Agri-food Promotion, publicising the application for registration of the protected designation of origin “Aceite del Somontano”. BOA. 2023:3.
- Bajoub A, Hurtado-Fernández E, Ajal EA, Fernández-Gutiérrez A, Carrasco-Pancorbo A, Ouazzani N. Quality and chemical profiles of monovarietal north Moroccan olive oils from “picholine Marocaine” cultivar: Registration database development and geographical discrimination. Food Chem. 2015;179:127–136.
- Belaj A, Ninot A, Gómez-Gálvez FJ, El Riachy M, Gurbuz-Veral M, Torres M, Lazaj A, Klepo T, Paz S, Ugarte J, Baldoni L, Lorite IJ, Šatović Z, de la Rosa R. Utility of EST-SNP Markers for Improving Management and Use of Olive Genetic Resources: A Case Study at the Worldwide Olive Germplasm Bank of Córdoba. Plants, 2022;11(7):921-943.
- Beltrán G, Del Río C, Sánchez S, Martínez L. Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from cv. Picual. J Agric Food Chem. 2004;52(11):3434–3440.
- Contreras C, Pierantozzi P, Maestri D, Tivani M, Searles P, Brizuela, M. et al. How Temperatures May Affect the Synthesis of Fatty Acids during Olive Fruit Ripening: Genes at Work in the Field. Plants. 2023;12(54): 17.
- Covas MI, Konstantinidou V, Fito M. Olive oil and cardiovascular health. J Cardiovasc Pharmacol. 2009;54:477–482.
- EC, Commission implementing Regulation (EU) No 2015/1833 of 12 October 2015, amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. Off J Eur Union, 2015;266:58: 9–52.
- EC, Commission implementing Regulation (EU) No 2019/1604 of 27 September 2019, amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. Off J Eur Union, 2019;250:62:14-48.
- EC, Directorate-General for Agriculture and Rural Development. Study on economic value of EU quality schemes, geographical indications (GIs) and traditional specialties guaranteed (TSGs): final report. Publications Office. 2021. Available online: <https://data.europa.eu/doi/10.2762/396490>. (Accessed on January 2023).
- EEC, Commission Regulation (EEC) No 2568/91 of 11 July 1991 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. Off J Eur Union, 1991;248:1-83.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to olive oil and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID1316, 1332), maintenance of normal (fasting) blood concentrations of triglycerides (ID 1316, 1332), maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1316, 1332) and maintenance of normal blood glucose concentrations (ID 4244) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA J. 2011;9:2044–2062.

- EU, Commission Delegated Regulation (EU) 2022/2104 of 29 July 2022 supplementing Regulation (EU) No 1308/2013 of the European Parliament and of the Council as regards marketing standards for olive oil, and repealing Commission Regulation (EEC) No 2568/91 and Commission Implementing Regulation (EU) No 29/2012. Off J Eur Union, 2022;248:1–22.
- Faci M, Hedjal M, Douzane M, Sevim D, Köseoğlu O, Tamendjari A. Locations Effects on the Quality of Chemlal and Azeradj Olives Grown in Algeria. *J Am Oil Chem Soc.* 2021;98(5):551–566.
- Gracia MS, Royo A, Gillen M. Composición química de aceites de las variedades Arbequina y Empeltre cultivadas en regadío. *Grasas Aceites*, 2009;60:321–329.
- IOC, International Olive Council. 2022. Available online: <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/> (Accessed on January 2023).
- IOC, International Olive Council. Trade standard applying to olive oils and olive pomace oils. COI/T.15/NC No 3/Rev. 19; 2022.
- Li X, Flynn JD, Wang SC. The effects of variety, growing region, and drought stress on fatty acid and sterol compositions of California olive oil. *J Am Oil Chem Soc.* 2019;96:215–230.
- López F, Cabrera M, Cuadrat JM. La división climática en Aragón. In: *Atlas Climático de Aragón; Gobierno de Aragón: Zaragoza, Spain, 2007; pp. 155–166.*
- Mailer RJ, Ayton J, Graham K. The influence of growing region, cultivar and harvest timing on the diversity of Australian olive oil. *J Am Oil Chem Soc.* 2010; 87:877–884.
- Manai-Djebali H, Krichène D, Ouni Y, Gallardo L, Sánchez J, Osorio E, Douja, D, Flamini G, Arrouk M. Chemical profiles of five minor olive oil varieties grown in central Tunisia. *J Food Compost Anal.* 2012;27:109–119.
- MAFF, Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Statistical Yearbook. <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/> (Accessed on January 2023).
- Mousavi S, de la Rosa R, Moukhli A, El Riachy M, Mariotti R, Torres M et al. Plasticity of fruit and oil traits in olive among different environments. *Sci Rep.* 2019;9:1–14.
- Navas-López JF, Cano J, de la Rosa R, Velasco L and León L. Genotype by environment interaction for oil quality components in olive tree. *Eur J Agron.* 2020;119:126115.
- Rallo L, Díez CM, Morales-Sillero A, Miho H, Priego-Capote F, Rallo P. Quality of olives: A focus on agricultural preharvest factors. *Sci Hortic.* 2018;233:491–509.
- Rey-Giménez R, Sánchez-Gimeno AC. Crop year, harvest date and clone effects on fruit characteristics, chemical composition and olive oil stability from an Empeltre clonal selection grown in Aragon. *J Sci Food Agric.* 2022a;102:5778–5786.
- Rey-Giménez R, Sánchez-Gimeno, AC. Authenticity in Olive Oils from an Empeltre Clonal Selection in Aragon (Spain): How Environmental, Agronomic, and Genetic Factors Affect Sterol Composition. *Foods*, 2022b;11(17):2587–2607.
- Rivera del Álamo RM, Fregapane G, Aranda F, Gómez-Alonso S, Salvador MD. Sterol and alcohol composition of Cornicabra virgin olive oil: the campesterol content exceeds the upper limit of 4% established by EU regulations. *Food Chem.* 2004;84:533–537.
- Romero A, Tous J, Gracia MS. Fatty acids and sterol composition of “Empeltre” virgin oil in Ebro Valley and Balearic Islands. *Acta Hortic.* 2011;924:385–392.
- Sevim D, Köseoğlu O, Özdemir D, Hakan M, Büyükgök E B, Uslu H, et al. Determination of the quality and purity characteristics of olive oils obtained from different regions of Turkey, depending on climatic changes. *J Am Oil Chem Soc.* 2022;1–17.

- Torres M, Pierantozzi P, Contreras C, Stanzione V, Tivani M, Mastio V, Gentili L, Searles P, Brizuela M, Fernández F, Toro A, Puertas C, Trentacoste E, Kiessling J, Mariotti R, Mousavi S, Bufacchi M, Baldoni L, Maestri, D. Thermal regime and cultivar effects on squalene and sterol contents in olive fruits: Results from a field network in different Argentinian environments. *Sci Hortic* 2022;303:111230.
- Uceda N, Beltrán MG, Jiménez A. Composición del aceite (Banco de Germoplasma de Cataluña). In: Rallo L, Barranco D, Caballero JM, Del Río C, Martín A, Tous J et al., editors. *Variedades de olivo en España*. Junta de Andalucía, MAPA and Ediciones Mundi-Prensa, Madrid; 2005. p. 358–372.

4.5.

Evaluación del cumplimiento de la declaración de propiedad saludable referida a los polifenoles en los aceites de oliva virgen extra de variedades autóctonas de Aragón.

4.5. EVALUACIÓN DEL CUMPLIMIENTO DE LA DECLARACIÓN DE PROPIEDAD SALUDABLE REFERIDA A LOS POLIFENOLES EN LOS ACEITES DE OLIVA VIRGEN EXTRA DE VARIEDADES AUTÓCTONAS DE ARAGÓN.

4.5.1. Selección del método de análisis adecuado para el propósito de la declaración de propiedad saludable

La declaración de propiedad saludable en relación a los compuestos fenólicos del aceite de oliva, establecida en el Reglamento (UE) nº432/2012, «los polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre frente al daño oxidativo» (UE, 2012) y respaldada por el dictamen científico de la EFSA (2011a), no especificó un método analítico adecuado para la determinación de dichos compuestos. Con el objeto del cumplimiento de la reglamentación europea sobre declaraciones nutricionales y de salud en el etiquetado de alimentos, son obligatorios protocolos analíticos específicos y validados «adecuados para el propósito». En consecuencia, la aprobación de este Reglamento generó un extenso debate científico durante aproximadamente 10 años sobre la estrategia analítica más adecuada para la implementación de un método analítico fiable y robusto que cumpliera con los requisitos establecidos en la declaración (Tsimidou, 2022). Las cuestiones técnicas surgidas, la variedad de métodos analíticos utilizados hasta la fecha para el análisis de fenoles (tales como LC-MS para análisis específicos, y Folin-Ciocalteu o HPLC-DAD para análisis globales), así como la disparidad en la expresión de resultados han dado lugar a confusiones (Mastralexi *et al.*, 2014a, 2014b; Romero y Brenes, 2014; Tsimidou *et al.*, 2018). Varios grupos de investigación se unieron con el objetivo de validar una técnica que permitiera incorporar esta declaración en el etiquetado de las botellas de aceites de oliva virgen, especialmente virgen extra, incrementando así su valor añadido (Mulinacci *et al.*, 2006; Mastralexi *et al.*, 2014a, 2014b; Purcaro *et al.*, 2014; Romero y Brenes, 2012, 2014; Reboredo-Rodríguez *et al.*, 2016; Tsimidou *et al.*, 2018). Paralelamente, el COI ha estado trabajando en la misma línea, mejorando y adaptando el método normalizado existente (COI/T.20/Doc. No. 29,

2009), que no era aplicable para la implementación de la declaración de propiedad saludable (COI, 2017).

Con el propósito mencionado, nació el proyecto OLEUM, cuyo objetivo era lograr la armonización de los procedimientos utilizados en el análisis del aceite de oliva para su aplicación tanto en regulación como en investigación (<http://www.oleumproject.eu/>). Dentro del proyecto, se llevó a cabo la validación interna de un protocolo para cromatografía líquida de ultra alta resolución con detección diodo array (UHPLC-DAD) con el fin de determinar el contenido total de hidroxitirosol (Htir) y tirosol (Tir) en los AOV. En este método se determina el contenido de estos dos fenoles, tanto en la fracción polar del aceite como en su hidrolizado, mediante dos curvas de calibración externa, una para cada fenol, a una longitud de onda de 280 nm (Tsimidou *et al.*, 2019a, 2019b). El procedimiento se fundamenta en la hidrólisis ácida de las formas ligadas de Htir y Tir, lo cual genera Htir y Tir libres, cuya concentración puede determinarse con exactitud mediante patrones comerciales disponibles. El contenido final de fenoles se expresa como la suma total de Htir y Tir (mg/20 g de aceite), después de corregir las diferencias de peso molecular entre las formas libres y las ligadas. La fase de la extracción del método propuesto estaba de acuerdo con el método COI vigente en ese momento (COI, 2017), aunque se omitió el uso del patrón interno ácido sirínico, siguiendo la justificación de Nenadis *et al.* (2018). Otro aspecto en común con el método COI (2017) fue la elución cromatográfica de los fenoles, aunque el gradiente se adaptó para su uso según UHPLC, con el fin de minimizar el consumo de disolventes y aumentar la rapidez de la cromatografía siguiendo los avances actuales en las técnicas cromatográficas. Además, la hidrólisis ácida implementada se basó en la propuesta por los investigadores Mulinacci *et al.* (2006) y Mastralexi *et al.* (2014a). La hidrólisis permite simplificar el enfoque del método al cuantificar de forma simultánea todos los derivados secoiridoides, aplicando después un factor de corrección para tener en cuenta las diferencias de pesos moleculares, como se ha mencionado anteriormente. Una vez validado el método, se adaptó a la norma ISO 17025:2017 (ISO, 2017) y posteriormente se sometió a un ensayo colaborativo organizado dentro del proyecto OLEUM, en el cual participaron 16 laboratorios y se enviaron 11 muestras de aceites de oliva. Finalmente,

los resultados de 10 laboratorios se consideraron conformes según los requisitos del método a evaluar. La mayoría de estos laboratorios respondieron correctamente la pregunta «si la muestra satisfacía o no el nivel de 5 mg de total Htir+Tir/20 g de aceite» (<http://www.oleumproject.eu/>).

Mientras se desarrollaba un método adecuado al propósito de la declaración de propiedad saludable, algunos autores han contrastado los resultados obtenidos de métodos que utilizaban la hidrólisis de los derivados secoiridoides, como estrategia simplificadora para la cuantificación del contenido fenólico, con otras metodologías más ampliamente utilizadas y con una larga trayectoria de resultados publicados. Se han constatado correlaciones relativamente buenas con el método COI (2017) (Mulinacci *et al.*, 2006; Purcaro *et al.*, 2014; Olmo-García *et al.*, 2019), así como con el ensayo colorimétrico de Folin-Ciocalteu (F-C) (Hrncirik *et al.*, 2004; Reboredo-Rodríguez *et al.*, 2016; Ricciutelli *et al.*, 2017; Olmo-García *et al.*, 2019).

El ensayo colorimétrico F-C se basa en la capacidad reductora de los grupos hidroxilo activos de los fenoles (Singleton y Rossi, 1965; Gutfinger, 1981). Este método consiste en la extracción de la fracción fenólica polar de la muestra de AOV, la medida de la absorbancia después de la reacción colorimétrica y la cuantificación del contenido total de fenoles mediante la calibración externa utilizando un patrón fenólico comercial, siendo los ácidos gálico y cafeico los más comúnmente utilizados (Vázquez *et al.*, 1973). La popularidad de este ensayo se puede atribuir principalmente a su simplicidad, bajo coste, disponibilidad de instrumentación asequible y rapidez de análisis.

A pesar de que los autores mencionados previamente han demostrado la concordancia de resultados en relación al ensayo colorimétrico, la EFSA (2011a) indicó que el método no era adecuado al presentar limitaciones debido a su baja especificidad hacia los fenoles, ya que cualquier sustancia reductora presente en la matriz puede interferir en el ensayo y sobreestimar el contenido fenólico. Estas interferencias son causadas por compuestos reductores como ácidos orgánicos, azúcares y proteínas en matrices alimentarias complejas, aunque dichas interferencias no están presentes en los AOV. Otra limitación de esta técnica son las diferentes respuestas según el patrón de

calibración utilizado además de la no distinción entre monofenoles y o-difenoles, lo que hace que aceites de oliva virgen con cantidades similares de fenoles totales, pero con una composición fenólica considerablemente variable puedan dar respuestas colorimétricas diferentes. A pesar de estas limitaciones, el ensayo colorimétrico puede proporcionar información suficientemente confiable y, por lo tanto, adecuada para controles de rutina y otras ocasiones en las que se requieren resultados rápidos.

En resumen, varios autores han concluido que tanto el método COI (2017) (HPLC-DAD, sin hidrólisis), como el ensayo F-C y el enfoque de hidrólisis pueden ser estrategias viables cuando se busca obtener un valor global del contenido fenólico, en lugar de una caracterización detallada de los perfiles fenólicos del AOV.

El objetivo principal de esta investigación fue evaluar el cumplimiento de los requisitos referidos a la concentración fenólica de los aceites obtenidos de las muestras de aceitunas procedentes de los ensayos de selección clonal de Empeltre y de variedades (Arbequina, Royal de Calatayud y Negral de Sabinán) de la finca experimental de Alcañiz. La finalidad es la posibilidad de incluir la declaración de propiedad saludable «los polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre frente al daño oxidativo» en el etiquetado de los aceites. Dado que al inicio de esta Tesis Doctoral no existía un método oficial aplicable para el propósito de la declaración, se decidió utilizar inicialmente el método Folin-Ciocalteu (F-C), teniendo en cuenta la baja contribución de otros compuestos en los AOV con actividad reductora. Posteriormente, con el objetivo de disponer del procedimiento más adecuado para la declaración saludable, se decidió aplicar el método UHPLC-DAD con hidrólisis ácida, descrito por Tsimidou *et al.* (2019a, 2019b) y ampliamente aceptado por la comunidad científica en aquel momento.

4.5.2. Contenido de fenoles en los aceites de oliva virgen de la selección clonal de Empeltre y en otras variedades autóctonas de Aragón

En primer lugar, se determinó el contenido total fenólico mediante el método colorimétrico Folin-Ciocalteu (F-C) descrito por Vázquez *et al.* (1973). Los resultados se expresaron según el patrón de calibración utilizado, que en este caso fue el ácido cafeico. Para ello, se utilizaron las muestras de aceites obtenidas de las aceitunas recolectadas tanto en el ensayo de selección clonal de Empeltre como en el ensayo de variedades. Se discuten detalladamente los contenidos fenólicos obtenidos según variedad y otros factores agronómicos en los artículos incluidos en las secciones [4.1.](#) y [4.3.](#) de esta Tesis Doctoral.

A la espera de la aprobación de un método oficial adecuado al propósito de la declaración de alegación saludable (UE, 2012), se procedió a conservar los aceites en frascos de vidrio topacio, con atmosfera de nitrógeno, y almacenarlos a una temperatura de -20 °C. Pero, debido al desarrollo de los acontecimientos, se optó por aplicar el método propuesto por Tsimidou *et al.* (2019a, 2019b) a las muestras de aceites conservadas. Los resultados se expresaron como la suma de los contenidos totales de hidroxitirosol y tirosol, utilizando ambos como patrones en las respectivas curvas de calibración. Para la puesta a punto de este método, se participó en un ensayo colaborativo convocado por el consorcio de investigadores del proyecto OLEUM. No fue necesario validar el método previamente, ya que se proporcionó un protocolo detallado y adaptado según la ISO 17025:2017 por parte del consorcio. Antes de la participación, se llevó a cabo una sesión de cualificación impartida por OLEUM, y mediante una muestra control proporcionada por OLEUM se procedió a la cualificación y adaptación del gradiente cromatográfico de UHPLC a HPLC, debido a la falta de disponibilidad de la técnica requerida en el método validado. Los autores del método propuesto describieron diferencias estadísticamente significativas en el uso de UHPLC o HPLC. A pesar de que estas diferencias fueron pequeñas, del orden de 1,03 a 1,39 veces, se obtuvieron resultados bastante comparables. Finalmente, la elección de la técnica

UHPLC fue debida a su mayor rapidez y menor gasto de disolventes, a pesar de su menor disponibilidad en los laboratorios.

Los resultados discutidos en esta sección provienen de las muestras de aceites de oliva obtenidos del ensayo de selección clonal de Empeltre (clones 2, 3, 6 y Std) de 6 muestreos por año durante los años 2017, 2018, 2019 ($n = 78$). Además, se incluyeron las muestras de AOV obtenidas en el ensayo de variedades durante las campañas 2017/18 y 2019/19 (Arbequina, $n = 12$; Royal de Calatayud, $n = 9$; Negral de Sabiñán, $n = 3$). Los resultados de ambos métodos, el ensayo colorimétrico Folin-Ciocalteu y el método de hidrólisis-HPLC-DAD, se expresaron en mg/20 g de aceite, tal y como indica la declaración de propiedad saludable, para facilitar la comparación.

En la Tabla 4.1. y la Tabla 4.2. se presentan los contenidos fenólicos de las 102 muestras de aceites de oliva virgen analizados mediante los dos métodos mencionados anteriormente. La mayoría de los aceites de la selección clonal de Empeltre presentaron altos contenidos en fenoles, cumpliendo con los requisitos de la declaración de propiedad saludable «los polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre frente al daño oxidativo» (UE, 2012). La declaración establece un mínimo de 5 mg/20 g de aceite en fenoles. Ambos métodos utilizados permitieron determinar la concentración objetivo, aunque hubo diferencias en cuanto al contenido absoluto, especialmente en valores superiores al mínimo estipulado, que se discutirán en la siguiente sección.

Tabla 4.1. Contenido total de fenoles, contenidos totales en hidroxitirosol (Htir) y tirosol (Tir) y su suma en los AOV procedentes de la selección clonal de Empeltre (C-2, C-3, C-6 y C-Std) de los años 2017, 2018 y 2019. Método A: ensayo colorimétrico Folin-Ciocalteu; método B: hidrólisis-HPLC-DAD.

Clon	Año	Fecha muestreo	Total fenoles (A)	Htir total (B)	Tir total (B)	Total fenoles (Htir+Tir) (B)
			(mg ác. cafeico/ 20 g aceite)	(mg/20 g aceite)		
Clon 2 (C-2)	2017	04-oct	18,0 ± 0,3	14,6 ± 0,2	9,4 ± 0,0	24,1 ± 0,3
		18-oct	19,5 ± 0,0	13,6 ± 0,6	7,3 ± 0,5	20,9 ± 1,1
		07-nov	13,1 ± 0,2	11,4 ± 0,8	7,3 ± 0,5	18,7 ± 1,4
		22-nov	13,5 ± 0,1	11,7 ± 0,1	7,6 ± 0,1	19,3 ± 0,0
		29-nov	13,8 ± 0,1	12,4 ± 0,5	6,9 ± 0,4	19,2 ± 0,9
		13-dic	6,4 ± 0,2	4,7 ± 0,2	2,9 ± 0,1	7,6 ± 0,2
	2018	01-oct	14,0 ± 0,1	9,4 ± 0,2	4,1 ± 0,1	13,6 ± 0,4
		15-oct	12,7 ± 0,2	9,3 ± 0,0	3,2 ± 0,1	12,5 ± 0,1
		28-oct	8,8 ± 0,2	6,4 ± 0,0	2,7 ± 0,0	9,2 ± 0,1
		11-nov	6,6 ± 0,2	6,6 ± 0,0	2,5 ± 0,0	9,1 ± 0,0
		25-nov	5,6 ± 0,2	4,2 ± 0,1	2,2 ± 0,0	6,4 ± 0,2
		11-dic	4,1 ± 0,2	2,4 ± 0,1	1,5 ± 0,0	4,0 ± 0,1
	2019	04-oct	14,4 ± 0,3	11,3 ± 0,1	5,7 ± 0,1	17,1 ± 0,1
		18-oct	19,3 ± 0,2	17,1 ± 0,4	5,7 ± 0,3	22,9 ± 0,7
		07-nov	19,7 ± 0,3	17,2 ± 0,9	5,1 ± 0,4	22,5 ± 1,3
		22-nov	11,3 ± 0,0	9,0 ± 0,4	4,7 ± 0,3	13,9 ± 0,6
		29-nov	12,5 ± 1,3	11,9 ± 0,5	4,5 ± 0,3	16,6 ± 0,8
		13-dic	5,7 ± 0,3	4,1 ± 0,3	2,3 ± 0,3	6,5 ± 0,3
Clon 3 (C-3)	2017	04-oct	14,4 ± 0,3	11,3 ± 0,1	5,7 ± 0,1	17,1 ± 0,1
		18-oct	19,3 ± 0,2	17,1 ± 0,4	5,7 ± 0,3	22,9 ± 0,7
		07-nov	19,7 ± 0,3	17,2 ± 0,9	5,1 ± 0,4	22,5 ± 1,3
		22-nov	11,3 ± 0,0	9,0 ± 0,4	4,7 ± 0,3	13,9 ± 0,6
		29-nov	12,5 ± 1,3	11,9 ± 0,5	4,5 ± 0,3	16,6 ± 0,8
		13-dic	5,7 ± 0,3	4,1 ± 0,3	2,3 ± 0,3	6,5 ± 0,3
	2018	01-oct	10,2 ± 0,1	6,2 ± 0,3	3,4 ± 0,1	9,8 ± 0,5
		15-oct	7,9 ± 0,1	6,3 ± 0,0	3,2 ± 0,1	9,7 ± 0,1
		28-oct	5,2 ± 0,2	5,6 ± 0,1	2,8 ± 0,0	8,7 ± 0,1
		11-nov	2,4 ± 0,2	2,2 ± 0,1	1,5 ± 0,1	3,9 ± 0,2
		25-nov	3,5 ± 0,2	2,8 ± 0,1	1,7 ± 0,0	4,7 ± 0,1
		11-dic	1,7 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,0 ± 0,0	2,2 ± 0,0
	2019	01-oct	5,5 ± 0,0	2,9 ± 0,1	2,4 ± 0,0	5,5 ± 0,1
		15-oct	4,0 ± 0,1	2,8 ± 0,1	1,9 ± 0,0	4,8 ± 0,1
		28-oct	3,9 ± 0,1	2,0 ± 0,2	1,2 ± 0,1	3,4 ± 0,0
		11-nov	3,4 ± 0,1	2,2 ± 0,1	1,2 ± 0,0	3,7 ± 0,1
		25-nov	2,9 ± 0,0	1,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1	2,6 ± 0,2
		09-dic	3,4 ± 0,0	2,1 ± 0,2	1,1 ± 0,1	3,4 ± 0,3

Tabla 4.1. (continuación)

Clon	Año	Fecha muestreo	Total fenoles (A)	Htir total (B)	Tir total (B)	Total fenoles (Htir+Tir) (B)
			(mg ác. cafeico/ 20 g aceite)	(mg/20 g aceite)		
Clon 6 (C-6)	2017	04-oct	11,6 ± 0,4	11,4 ± 0,3	3,1 ± 0,1	14,6 ± 0,4
		18-oct	13,7 ± 0,1	14,1 ± 0,1	3,8 ± 0,1	17,9 ± 0,2
		07-nov	9,8 ± 0,1	7,9 ± 0,4	2,6 ± 0,1	10,6 ± 0,6
		22-nov	11,3 ± 0,2	11,6 ± 0,2	2,9 ± 0,1	14,5 ± 0,1
		29-nov	9,0 ± 0,1	8,0 ± 0,9	2,0 ± 0,3	10,1 ± 1,2
		13-dic	2,5 ± 0,0	0,8 ± 0,0	0,9 ± 0,1	1,7 ± 0,1
	2018	01-oct	9,0 ± 0,1	5,2 ± 0,1	2,4 ± 0,1	7,7 ± 0,2
		15-oct	8,9 ± 0,3	5,1 ± 0,2	2,1 ± 0,1	7,3 ± 0,3
		28-oct	7,8 ± 0,1	5,8 ± 0,2	2,3 ± 0,1	8,2 ± 0,2
		11-nov	7,1 ± 0,2	4,6 ± 0,2	1,8 ± 0,1	6,4 ± 0,3
		25-nov	7,6 ± 0,1	4,5 ± 0,3	1,7 ± 0,0	6,2 ± 0,3
		11-dic	4,7 ± 0,0	2,2 ± 0,1	1,1 ± 0,0	3,3 ± 0,1
	2019	01-oct	6,1 ± 0,1	3,4 ± 0,1	3,0 ± 0,0	6,5 ± 0,1
		15-oct	5,9 ± 0,1	4,5 ± 0,2	2,9 ± 0,1	7,3 ± 0,3
		28-oct	3,0 ± 0,4	2,2 ± 0,2	1,2 ± 0,1	3,4 ± 0,3
		11-nov	3,8 ± 0,1	2,7 ± 0,1	1,5 ± 0,1	4,2 ± 0,2
		25-nov	3,7 ± 0,1	2,6 ± 0,0	1,4 ± 0,0	4,0 ± 0,0
		09-dic	2,4 ± 0,0	1,4 ± 0,0	1,0 ± 0,0	2,4 ± 0,0
Clon Std (C-Std)	2017	04-oct	13,5 ± 0,2	12,1 ± 0,3	4,5 ± 0,1	16,7 ± 0,3
		18-oct	11,9 ± 0,1	10,1 ± 0,2	5,4 ± 0,0	15,5 ± 0,1
		07-nov	10,2 ± 0,0	9,2 ± 0,2	4,4 ± 0,1	13,6 ± 0,3
		22-nov	10,7 ± 0,1	8,0 ± 0,1	3,2 ± 0,0	11,2 ± 0,1
		29-nov	8,9 ± 0,0	7,4 ± 0,0	3,0 ± 0,0	10,5 ± 0,1
		13-dic	2,9 ± 0,1	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,0	2,4 ± 0,0
	2018	01-oct	8,1 ± 0,4	5,0 ± 0,1	2,5 ± 0,0	7,5 ± 0,1
		15-oct	8,3 ± 0,0	6,2 ± 0,0	2,9 ± 0,0	9,1 ± 0,1
		28-oct	7,3 ± 0,0	5,2 ± 0,1	2,2 ± 0,0	7,4 ± 0,2
		11-nov	4,6 ± 0,2	3,3 ± 0,1	1,5 ± 0,1	4,8 ± 0,2
		25-nov	5,8 ± 0,2	3,8 ± 0,0	1,5 ± 0,0	5,3 ± 0,0
		11-dic	2,9 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,7 ± 0,0
	2019	01-oct	7,7 ± 0,1	9,7 ± 0,3	6,9 ± 0,1	16,6 ± 0,3
		15-oct	5,3 ± 0,1	8,5 ± 0,2	4,9 ± 0,0	13,4 ± 0,2
		28-oct	5,6 ± 0,0	6,8 ± 0,1	4,1 ± 0,0	10,9 ± 0,1
		11-nov	5,7 ± 0,2	4,6 ± 0,2	2,8 ± 0,1	7,4 ± 0,2
		25-nov	6,0 ± 0,1	5,4 ± 0,0	3,1 ± 0,0	8,5 ± 0,0
		09-dic	5,3 ± 0,0	4,5 ± 0,1	2,7 ± 0,1	7,2 ± 0,1

Tabla 4.2. Contenido total de fenoles, contenidos totales en hidroxitirosol (Htir) y tirosol (Tir) y su suma en los AOV procedentes de las variedades Arbequina, Royal de Calatayud y Negral de Sabiñán de los años 2017 y 2019. Método A: ensayo colorimétrico Folin-Ciocalteu; método B: hidrólisis-HPLC-DAD.

Variedad	Año	Fecha muestreo	Total fenoles (A)	Htir total (B)	Tir total (B)	Total fenoles (Htir+Tir) (B)
			(mg ác. cafeico/ 20 g aceite)	(mg/20 g aceite)		
Arbequina	2017	04-oct	1,8 ± 0,1	0,6 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,3 ± 0,0
		18-oct	2,9 ± 0,2	1,1 ± 0,0	0,8 ± 0,0	1,9 ± 0,0
		07-nov	3,2 ± 0,0	2,6 ± 0,2	0,7 ± 0,1	3,4 ± 0,1
		22-nov	2,8 ± 0,0	1,2 ± 0,0	0,8 ± 0,0	2,0 ± 0,0
		29-nov	2,3 ± 0,0	1,0 ± 0,0	0,7 ± 0,0	1,7 ± 0,0
		13-dic	1,5 ± 0,0	0,3 ± 0,0	0,5 ± 0,0	0,9 ± 0,0
	2019	01-oct	2,8 ± 0,1	1,4 ± 0,2	1,1 ± 0,1	2,5 ± 0,1
		15-oct	3,6 ± 0,1	2,4 ± 0,3	1,2 ± 0,2	3,6 ± 0,1
		28-oct	2,9 ± 0,0	2,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1	3,0 ± 0,0
		11-nov	3,8 ± 0,1	3,5 ± 0,0	0,9 ± 0,0	4,5 ± 0,0
		25-nov	3,4 ± 0,0	2,4 ± 0,0	0,9 ± 0,0	3,3 ± 0,0
		09-dic	2,6 ± 0,1	1,9 ± 0,0	0,7 ± 0,0	2,6 ± 0,0
Royal de Calatayud	2017	04-oct	4,6 ± 0,3	3,1 ± 0,1	2,0 ± 0,1	5,1 ± 0,0
		18-oct	5,3 ± 0,3	3,5 ± 0,2	1,8 ± 0,1	5,2 ± 0,1
		07-nov	4,3 ± 0,1	3,3 ± 0,3	1,4 ± 0,2	4,6 ± 0,1
		22-nov	3,6 ± 0,5	2,2 ± 0,1	1,1 ± 0,1	3,3 ± 0,0
		29-nov	3,3 ± 0,1	2,1 ± 0,0	1,0 ± 0,0	3,1 ± 0,0
		13-dic	1,5 ± 0,0	0,9 ± 0,0	0,8 ± 0,1	1,7 ± 0,0
	2019	15-oct	5,2 ± 0,1	4,2 ± 0,0	1,9 ± 0,1	6,1 ± 0,1
		28-oct	3,7 ± 0,0	3,4 ± 0,3	1,1 ± 0,2	4,5 ± 0,0
		11-nov	3,1 ± 0,0	2,4 ± 0,3	0,8 ± 0,3	3,2 ± 0,0
Negral de Calatayud	2019	01-oct	5,1 ± 0,0	2,8 ± 0,1	1,3 ± 0,2	4,1 ± 0,0
		15-oct	3,7 ± 0,0	2,6 ± 0,1	1,3 ± 0,1	4,0 ± 0,0
		28-oct	4,1 ± 0,3	3,8 ± 0,2	1,5 ± 0,1	5,3 ± 0,1

De acuerdo con lo mencionado previamente en secciones anteriores de esta Tesis Doctoral (4.1. y 4.3.), los contenidos fenólicos más altos se observaron en el año 2017. Solo algunos muestreos realizados en diciembre, posiblemente debido a las heladas de ese periodo, no cumplieron con los requisitos de la declaración de salud. La mayoría de los aceites del año 2018 también cumplieron con la declaración, aunque presentaron concentraciones más bajas. En cambio, solo los aceites tempranos de la campaña 19/20, cosechados en octubre, presentaron contenidos de fenoles superiores a 5 mg/20 g de aceite. El clon Std fue la excepción, ya que todos sus aceites cumplieron con la declaración, mostrando contenidos totales de tirosol muy elevados en comparación con las demás muestras. El clon 2 fue el de con el contenido fenólico más alto, aunque no se analizó durante el año 2019.

En cambio, pocos aceites del ensayo de variedades presentaron contenidos fenólicos superiores a 5 mg/20 g de aceite. Específicamente, ninguno de los aceites de la variedad Arbequina alcanzó el contenido objetivo, y solo los aceites de Royal de Calatayud y Negral de Sabiñán en los muestreos tempranos de octubre cumplieron con la declaración. Las conclusiones fueron similares independientemente del método de análisis utilizado.

La Figura 4.1. muestra el contenido fenólico total obtenido en las 102 muestras de aceites de oliva (aunque no pueden apreciarse todos los códigos de las muestras en la figura), ordenadas de menor a mayor según las concentraciones determinadas por el método hidrólisis-HPLC-DAD (línea morada). Se aprecia una tendencia similar entre ambos métodos aplicados respecto a los resultados del contenido total de fenoles obtenidos. Además, se observan mayores diferencias entre los resultados obtenidos por ambos métodos a medida que aumenta el contenido fenólico del aceite analizado. Los aceites con contenidos fenólicos superiores a 5 mg/20 g de aceite están conformes a la declaración de propiedad de salud.

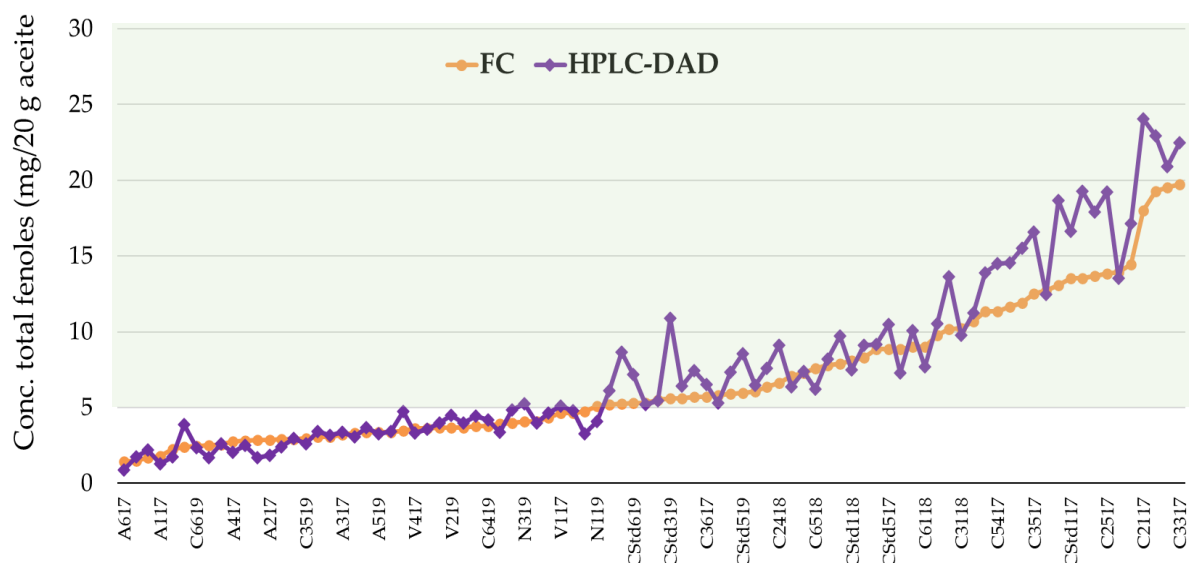
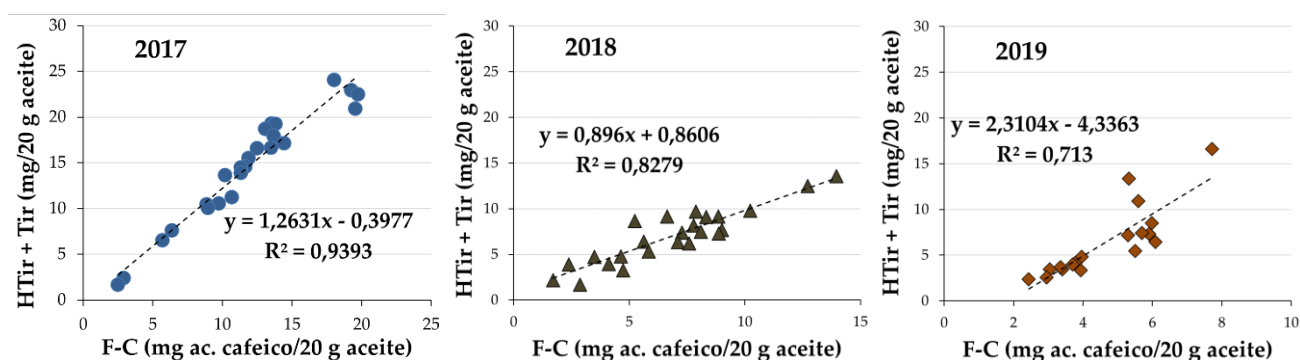


Figura 4.1. Contenido fenólico total (mg/20 g aceite) de los AOV analizados (n=102). Comparación métodos: F-C (curva calibración: ácido cafeico) y HPLC-DAD (curvas de calibración de Htir y Tir). Código muestra: Xx-y-zz (Xx: tipo clon/variedad; y: punto muestreo; zz: año de cosecha).

4.5.3. Comparación de resultados entre el ensayo Folin-Ciocalteu (sin hidrólisis) y HPLC-DAD (con hidrólisis)

Para llevar a cabo la comparación entre ambas metodologías se procedió primeramente a realizar un estudio de las ecuaciones de regresión específicas para cada campaña, en las muestras de aceites de la selección clonal, y para cada variedad respecto a Arbequina y Royal de Calatayud (Figura 4.2.). Tras aplicar la prueba estadística t-Student a las pendientes de las tres rectas de calibrado obtenidas en la selección clonal, se observaron diferencias significativas entre ellas. Este hallazgo respalda la influencia del año de cosecha en el contenido fenólico de los AOV, tal como se ha descrito anteriormente en secciones previas de la esta Tesis Doctoral (4.1. y 4.3.). Por el contrario, las pendientes obtenidas para las variedades Arbequina y Royal de Calatayud no presentaron diferencias significativas. Sin embargo, para confirmar la falta de influencia de la variedad en este caso, se requeriría un estudio más detallado, ya que el número de muestras utilizado fue limitado.

A



B

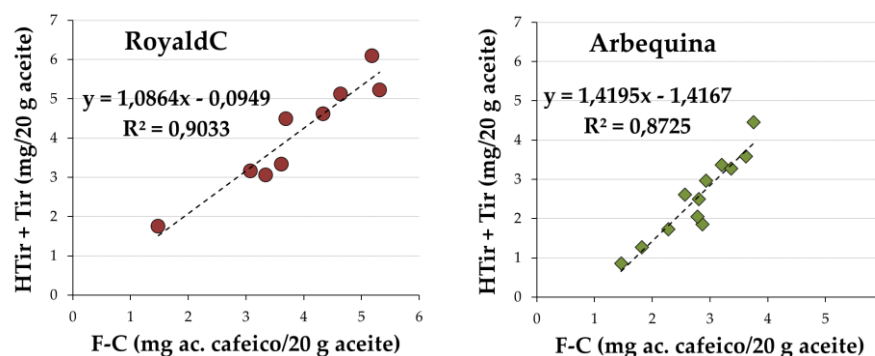


Figura 4.2. Correlaciones entre el contenido fenólico total determinado según método de análisis (Folin-Ciocalteu e hidrolisis-HPLC-DAD) en función de la campaña y variedad. (A) Selección clonal de Empeltre, años 2017 (n=24), 2018 (n=24) y 2019 (n=18). (B) Variedades Royal de Calatayud y Arbequina.

Haciendo referencia a los resultados obtenidos en la selección clonal, se observó que durante la campaña 2018/19 se obtuvieron los resultados más similares entre ambos métodos, con una pendiente cercana a 1. Por otro lado, se encontró que los aceites del año 2017, que presentaban los contenidos fenólicos más altos, mostraron la mejor correlación de determinación (R^2). Además, las correlaciones de Pearson respaldaron las buenas relaciones entre los resultados de ambos métodos ($r_{2017} = 0,969$, $p < 0,001$; $r_{2018} = 0,910$, $p < 0,001$; $r_{2019} = 0,844$, $p < 0,001$; 2017-2019)

La comparación global entre los dos métodos aplicados se presenta en la Figura 4.3, donde se muestran todos los resultados obtenidos, incluyendo los tres años de la selección clonal de Empeltre a pesar del efecto interanual mencionado anteriormente, así como los resultados de las variedades Arbequina, Royal de Calatayud y Negral de Sabinán.

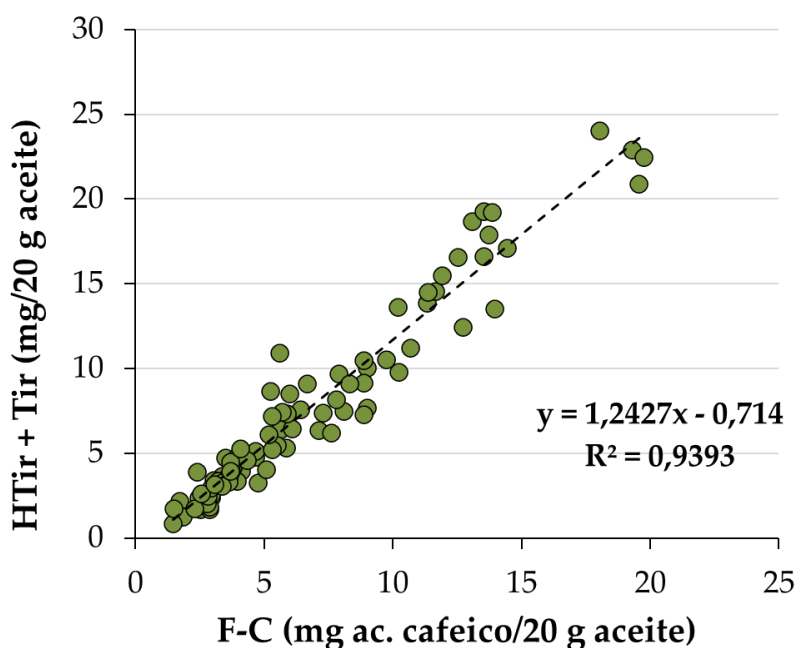


Figura 4.3. Comparación global del contenido fenólico total determinado según método de análisis (Folin-Ciocalteu e hidrólisis-HPLC-DAD).

Se encontró una correlación significativa entre ambos métodos ($r_{conjunta} = 0,969$, $p < 0,001$) con una correlación de determinación muy aceptable ($R^2 = 0,9393$), incluso al considerar posibles variaciones en los perfiles fenólicos de los aceites debidas a efectos ambientales (como los efectos interanuales de las cosechas), genéticos y de maduración de los aceites analizados. Estudios previos han descrito correlaciones similares entre el método colorimétrico F-C, utilizando ácido cafeico u otros patrones para la cuantificación, y otros métodos globales como HPLC-DAD, e incluso específicos por LC-MS (Alessandri *et al.*, 2014; Olmo-García *et al.*, 2019).

En promedio, el método hidrólisis-HPLC-DAD arrojó resultados 1,19 veces mayores que el método colorimétrico (F-C), lo cual concuerda con lo reportado por otros autores (Ricciutelli *et al.*, 2017; Olmo-García *et al.*, 2019). Aunque los resultados del análisis gráfico demuestran una correlación entre los métodos y se observan tendencias similares, se hallaron diferencias significativas entre ellos, al aplicar el análisis estadístico t-Student para muestras pareadas, al igual que describieron Tsimidou *et al.* (2019b) en la validación del método cromatográfico utilizado en este estudio. Estos mismos autores declararon que el ensayo F-C no puede respaldar la declaración de salud. Las diferencias halladas pueden deberse principalmente al uso de diferentes patrones en las

calibraciones y posiblemente a la especificidad variable del reactivo F-C para las diferentes especies fenólicas (Alessandri *et al.*, 2014; Olmo-García *et al.*, 2019). Otros autores no encontraron diferencias significativas al aplicar métodos similares, pero reportaron resultados respecto al mismo patrón, y expresaron opiniones favorables sobre el potencial del método F-C como una alternativa rápida, incluso sin hidrólisis ácida, (Reboredo-Rodríguez *et al.*, 2016; Ricciutelli *et al.*, 2017; Olmo-García *et al.*, 2019).

Por otro lado, al realizar el análisis estadístico t-Student para muestras pareadas en el conjunto de resultados con valores inferiores a 5,0 mg/20 g de aceite ($n = 31$), no se encontraron diferencias significativas. Esto sugiere que el método F-C podría ser utilizado como un método de cribado por su rapidez y bajo coste respecto al método hidrólisis-HPLC-DAD.

4.5.4. Contenido de hidroxitirosol y tirosol en los AOV

Por otro lado, se observó que el contenido total de hidroxitirosol (libre + formas ligadas) fue considerablemente mayor que el contenido total de tirosol (libre + formas ligadas). Mientras, los contenidos en sus formas libres fueron muy bajos, como se muestra en la Tabla 4.1. y Tabla 4.2. La Figura 4.4. ilustra la evolución de los contenidos de las formas ligadas de tirosol e hidroxitirosol y la suma de sus formas libres, expresados en porcentaje relativo, en función de la maduración de las aceitunas (muestreos del 1 al 6; ver fechas de muestreos en Tabla 4.1.) durante las campañas 2017, 2018, 2019 en los aceites de la selección clonal (A. clon 2; B: clon 3; C: clon 6; D: clon Std). En líneas generales, se observó que los contenidos relativos de las formas libres de Htir y Tir aumentaron en el aceite según la maduración de la aceituna, aunque su importancia es mínima comparado con las formas ligadas. Los aceites de la campaña 2019 presentaron contenidos relativos más altos de HTir y Tir libres en comparación con los contenidos de la campaña 2017. No se observó una tendencia clara en los contenidos relativos de las formas ligadas de Htir y Tir según avanzó la fecha de muestreo, excepto en los últimos muestreos, especialmente en los de la campaña 2017. En estos aceites, el contenido fenólico cayó drásticamente, presumiblemente a consecuencia de las heladas que precedieron a esos muestreos. En estas situaciones, los aceites presentaron menores

diferencias entre los contenidos de las formas ligadas de Htir y Tir, incluso el contenido relativo de las formas ligadas de Tir sobrepasó a las de Htir. Las formas secoirideas de los fenoles del AOV sufren hidrólisis, lo que produce ácido elenólico y fenoles simples como tirosol e hidroxitirosol. Este fenómeno ocurre de forma espontánea y se utiliza para evaluar la «frescura» del aceite de oliva mediante la medición del porcentaje de hidrólisis (calculado como la suma de los dos fenoles simples en relación al total de fenoles), ya que aumenta con el tiempo (Mulinacci *et al.*, 2006).

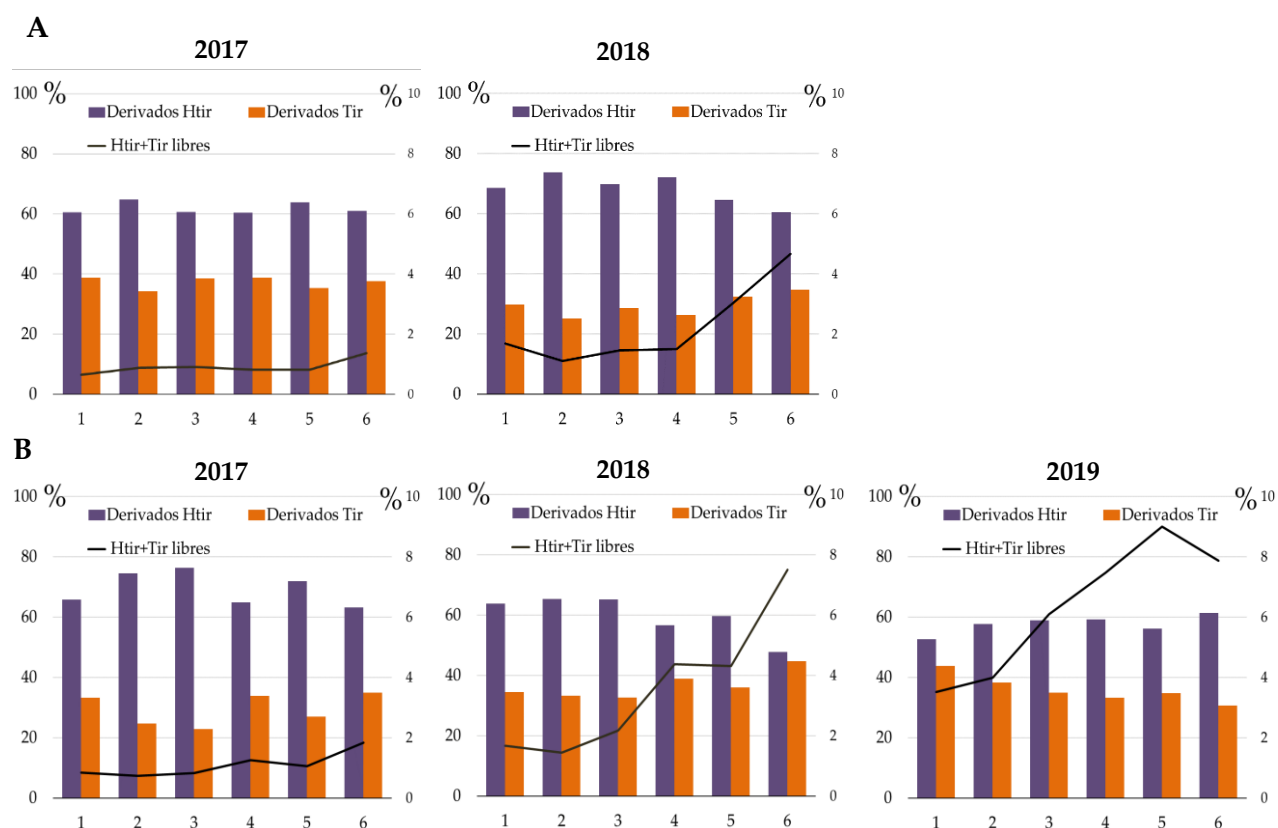


Figura 4.4. Evolución del contenido total (%) de (1) Htir + Tir libres, (2) formas ligadas de Htir y (d) formas ligadas de Tir a lo largo del periodo de muestreo (octubre a diciembre) en los años 2017, 2018, 2019. Muestras de AOV de clon 2 (A), clon 3 (B), clon 6 (C) y clon Std (D).



Figura 4.4. (Continuación).

5. DISCUSIÓN GENERAL

La Tesis Doctoral se ha estructurado en torno a cinco objetivos, establecidos al inicio de la investigación. Entre los objetivos planteados, cuatro de ellos se han centrado en analizar la variabilidad generada por factores agronómicos, como la genética, el ambiente o el entorno y la maduración, en relación a las características de la aceituna, así como en la calidad y composición química de los aceites de oliva virgen. Se ha demostrado que el ambiente o el entorno es determinante en la variabilidad de la composición lipídica de los aceites de oliva virgen extra, lo que permite diferenciarlos tanto o incluso más que la genética. Además, se llevó a cabo un estudio exhaustivo para comprender cómo los factores agronómicos influían en la evolución de la calidad y el perfil lipídico de los aceites a lo largo del proceso de maduración de la aceituna. Por último, los compuestos fenólicos, como parte de la fracción minoritaria de los aceites de oliva virgen extra, juegan un papel crucial en la calidad nutricional de los mismos. Se ha demostrado, en el último objetivo de esta Tesis Doctoral, el cumplimiento de los requisitos establecidos por la legislación europea en algunos de los aceites de oliva virgen extra de variedades autóctonas de Aragón, lo que permite incluir la declaración de propiedad saludable en relación con su contenido fenólico en su etiquetado.

El aceite de oliva virgen es el zumo oleoso de las aceitunas, por tanto, la calidad y la producción del aceite de oliva virgen está íntimamente ligada con las características de la aceituna utilizada como fruto. Es por ello, que la investigación y el análisis del impacto de los factores agronómicos, entendidos principalmente como factores intrínsecos, se ha enfocado tanto en la aceituna como en el aceite de oliva. Los factores agronómicos intrínsecos en el cultivo del olivo se refieren a las características inherentes a la planta de olivo y a su interacción con el entorno agrícola. Estos factores, difíciles de regular, como la variedad o el medio agrológico, desempeñan un papel fundamental en el desarrollo, crecimiento y producción del olivo, y por tanto en el desarrollo de la aceituna (Barranco *et al.*, 2008).

El olivo es un cultivo milenario adaptado a las variaciones del clima mediterráneo; sin embargo, sus procesos fisiológicos de adaptación a los fenómenos

meteorológicos pueden modular ciertas características en el fruto que pueden conllevar afecciones o no en la producción o incluso en la composición química del aceite de oliva virgen. En este sentido, el estudio del medio agrológico, como conjunto de las condiciones edáficas y climáticas en la ubicación en que el olivo es cultivado, es esencial para comprender y analizar las interacciones entre el cultivo del olivo y su entorno.

Las características genéticas, inherentes de la variedad elegida en la plantación o incluso del clon seleccionado de una determinada variedad, influyen en aspectos clave como la adaptabilidad a diferentes condiciones climáticas, la producción de aceitunas, el rendimiento graso, la composición química o incluso las características organolépticas del aceite. En cierto modo, la selección adecuada de la variedad de olivo es un aspecto crítico de su cultivo, ya que diferentes variedades presentan perfiles genéticos distintos que determinan sus características y atributos específicos. Al elegir la variedad, se busca optimizar la adaptación al entorno, maximizar la producción y obtener un aceite de oliva con las características organolépticas y químicas deseadas. En esta línea, las variedades de olivo locales brindan una serie de beneficios significativos en el contexto agrícola y en la producción de aceite de oliva. Estas variedades, adaptadas a las condiciones climáticas y edáficas específicas de su región, han desarrollado características genéticas y fisiológicas que les permiten aprovechar al máximo los recursos disponibles y optimizar su rendimiento.

Otro factor agronómico de creciente interés es la fecha de recolección, la cual sí que puede ser controlada, a diferencia de los anteriores factores. La recolección del fruto ha sido uno de los costes más importantes de la explotación de un olivar, y, el modo en el que se realiza, tiene un impacto notorio sobre la calidad reglamentada del aceite de oliva (UE, 2022a; COI, 2022a; Codex Alimentarius, 2021). La fecha de recolección debería ser esa ventana temporal en la que la aceituna está en el momento óptimo de su desarrollo; un fruto sano en el que la lipogénesis haya posibilitado la acumulación suficiente de aceite, y en el que la actividad enzimática haya permitido sintetizar en cantidades adecuadas los compuestos que conforman el perfil lipídico, como los ácidos grasos, esteroides y fenoles. Algunos de estos compuestos químicos son la base en la que

se sustenta la posterior evolución del perfil organoléptico de los aceites de oliva virgen y su estabilidad oxidativa. Además, es importante considerar la conveniente extractabilidad del fruto, es decir, la capacidad de obtener el rendimiento graso deseado durante el proceso de extracción del aceite. Por consiguiente, la selección cuidadosa de la fecha de recolección de la aceituna es fundamental para obtener un aceite de oliva virgen de alta calidad, con un perfil químico y organoléptico óptimo, con el menor detrimento en su rendimiento y que cumpla con los estándares regulatorios y expectativas del mercado y de los consumidores.

Tradicionalmente, la fecha de recolección de la aceituna en Aragón ha sido tardía. La variedad principal Empeltre, por ejemplo, tiene un patrón de maduración muy temprano, además de un doble uso comercial potencial; bien como aceituna negra de mesa o bien como aceite de oliva. Por ello, las aceitunas, se han recolectado muy maduras. Esto ha hecho que los aceites de oliva Empeltre se hayan caracterizado químicamente por un bajo contenido fenólico, con una estabilidad oxidativa media - baja, y, organolépticamente, por su frutado maduro y bajo amargor y picor (Gracia, 2001; Gracia *et al.*, 2009; Abenoza *et al.*, 2019). Hoy en día, se observa una diversificación en la demanda de aceites, con una tendencia creciente hacia el consumo de aceites de oliva virgen de recogida más temprana. Algunos consumidores buscan aceites de oliva virgen que presenten un perfil lipídico más saludable, así como una mayor complejidad e intensidad organoléptica, lo cual lleva implícito una revalorización del producto en el mercado. Con el fin de profundizar en el conocimiento sobre el fruto, su rendimiento graso y la calidad y composición química de los aceites de oliva virgen recolectados en etapas más tempranas, resulta indispensable contar con una mayor cantidad de información.

Teniendo en cuenta estas premisas, y para lograr los objetivos planteados sobre el análisis del impacto de diversos factores agronómicos (genotipo, ambiente y fecha de recolección) en la aceituna y en el aceite de oliva virgen en el contexto del olivar aragonés (objetivos nº 1, 2 y 3), se establecieron las siguientes pautas. En primer lugar, se seleccionaron únicamente variedades autóctonas de Aragón, algunas de ellas principales

y otras secundarias, como: Empeltre, Arbequina, Royal de Calatayud y Negral de Sabinán. En cuanto a la variedad Empeltre, se decidió evaluar además la posible variabilidad genética que podrían aportar seis clones procedentes de una selección clonal previa (Tous *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2011). Las aceitunas fueron muestreadas en una única finca, la Finca Experimental de Cultivos Leñosos del Gobierno de Aragón y ubicada en Alcañiz (Teruel). La finalidad del uso de esta finca fue minimizar la variabilidad que podría introducir el uso de diferentes ubicaciones, por consiguiente, diferentes climas, condiciones edáficas, prácticas agronómicas y fenómenos meteorológicos, en cuanto al factor agrológico o del medio. Además, el muestreo de las cuatro variedades se realizó durante las mismas campañas oleícolas, tres consecutivas (2017/18, 2018/19 y 2019/20), con el fin de observar la influencia interanual del ambiente en cuanto a la variabilidad causada por los diferentes fenómenos meteorológicos. Para estudiar la influencia de la fecha de recolección se decidió realizar los muestreos de todas las variedades, de forma simultánea y cada quince días, desde octubre hasta diciembre, por ser el periodo completo que abarca la recogida de la aceituna para la elaboración de aceites de oliva virgen en Aragón.

Los ensayos de los clones de Empeltre (ensayo clonal) y de las variedades Arbequina, Royal de Calatayud y Negral de Sabinán (ensayo variedades) estaban ubicados en parcelas distintas pero cercanas dentro de la misma finca, aunque con condiciones de riego diferentes. Los muestreos se realizaron de forma simultánea en todos los casos, pero, con el fin de mitigar la posible variabilidad aportada por el riego, se optó por analizar los resultados de manera independiente para cada grupo.

Por otro lado, en el cuarto objetivo se estudiaron en conjunto los factores genéticos y ambientales, variando esta vez la ubicación de los olivares estudiados. Los aceites de oliva virgen extra utilizados en este estudio fueron obtenidos de distintas almazaras o cooperativas agrarias ubicadas en las tres zonas oleícolas principales de Aragón. Este estudio permitió no solo confirmar las hipótesis planteadas en los objetivos anteriores, sino también demostrar la trazabilidad geográfica de los AOVE de Aragón en base a su composición química.

En el quinto objetivo, se utilizaron los ensayos de clones de Empeltre y de variedades y sus muestreos para evaluar el contenido fenólico de los aceites de oliva virgen extra y determinar si cumplían con los requisitos establecidos en la declaración de propiedad saludable según el Reglamento (UE) 432/2012.

5.1. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE FACTORES AGRONÓMICOS (GENÉTICOS, AMBIENTALES Y MADURACIÓN) SOBRE LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS ACEITUNAS DE VARIEDADES AUTÓCTONAS DE ARAGÓN DESTINADAS A ALMAZARA

El primer objetivo consistió en el estudio de la variación de ciertas características en la aceituna considerando factores agronómicos como la variedad, el clon, la campaña oleícola y la fecha de muestreo. Se llevaron a cabo análisis de parámetros clave como el peso del fruto, el índice de maduración, el rendimiento graso y la extractabilidad en las muestras de aceitunas obtenidas de diferentes clones de la variedad Empeltre, así como de las variedades Arbequina, Royal de Calatayud y Negral de Sabinán. Los resultados obtenidos se encuentran recogidos en los artículos de las secciones [4.1.](#) y [4.3.](#)

Considerando en primer lugar los clones de Empeltre, el rango del índice de madurez en las aceitunas muestreadas a lo largo de las tres campañas osciló entre los valores 0,6 (piel verde amarillenta) y 6,1 (piel negra y pulpa morada sin llegar al hueso) aumentando progresivamente a lo largo de la cosecha (Figura 1.22) (Tabla 2, artículo 4.1.). El análisis factorial de la varianza (ANOVA) realizado al conjunto de índices obtenidos con el objeto de evaluar la posible variabilidad generada por las tres variables agronómicas (clon, año y fecha de cosecha), y sus interacciones, sobre este parámetro determinó que la fecha de cosecha fue el factor de mayor contribución significativa (Tabla 3, artículo 4.1.). Este resultado respalda los hallazgos previamente publicados por otros investigadores (de la Rosa *et al.*, 2013; Fernández-Cuesta *et al.*, 2013). Durante el periodo otoñal, que coincide con la cosecha de la aceituna en España, se producen de manera notable los principales cambios en la pigmentación de la piel y la pulpa como parte de los procesos fisiológicos que experimenta este fruto durante su maduración. El año fue otro factor que tuvo un efecto significativo, mientras que el clon o las posibles interacciones entre los factores no tuvieron significación alguna. Los índices de madurez en la campaña 18/19 fueron significativamente menores (Tabla 3, artículo 4.1.),

observándose pigmentaciones más bajas tanto al inicio como al final de la cosecha, alrededor de 1 y 4 respectivamente, en comparación con las otras dos campañas estudiadas (Tabla 1, Anexo). Así, en las campañas 17/18 y 19/20, la pigmentación de las aceitunas experimentó un aumento progresivo desde valores iniciales alrededor de 2 hasta alcanzar los valores finales entre 5 y 6. Cabe destacar que la velocidad de aumento en la pigmentación fue mayor en 2017, cuyo otoño fue especialmente seco (Tabla 1, artículo 4.1.). Quizás las temperaturas medias más bajas y las mayores precipitaciones en octubre de 2018 podrían haber ralentizado el proceso de pigmentación de la aceituna durante ese año (Deiana *et al.*, 2019) (Tabla 1, artículo 4.1.). Otros autores, relacionan la carga del olivo con la pigmentación de los frutos. Por ejemplo, Beltrán *et al.* (2008) indicó que el nivel de carga del olivo, significativamente mayor en 2018, podría retrasar la maduración por inhibición parcial de antocianinas. Trentacoste *et al.* (2010), por otro lado, observó que la tasa del cambio de color dependía de la carga de frutos del olivo y recomendó calibrar el índice de madurez para años de alta y baja carga de frutos. Según sus resultados, años de mayor carga equivalen a una pigmentación menor.

En las campañas 17/18 y 19/20, se observaron valores de índice de maduración más bajos en las variedades Arbequina, Royal de Calatayud y Negral de Sabinán en comparación con los clones de Empeltre (Figura 2., artículo 4.3.). Durante el otoño de 2017, solo fue posible muestrear las variedades Arbequina y Royal. No llegaron a alcanzar la coloración negra-violácea total del fruto, como sí lo hizo la variedad Empeltre ya que, hacia mediados de diciembre, al finalizar el muestreo, ambas variedades presentaron un índice de alrededor de 3 (con la piel rojiza o morada en más de la mitad del fruto), lo que indicaba el final del envero en esa fecha. Este mismo valor fue el máximo alcanzado por las aceitunas de Arbequina al final del muestreo de 2019. La variedad Negral de Sabinán solo tuvo producción durante el año 2019, debido a su marcada vecería. Esta circunstancia, a su vez, hizo que no se pudiera completar su muestreo hasta diciembre, al igual que la variedad Royal de Calatayud. Ambas variedades mostraron índices más altos en comparación con Arbequina en las mismas fechas de muestreo. Por ejemplo, a finales de octubre, los índices de maduración fueron

2 (inicio de enero), 3 (final de enero) y 4 (piel negra y pulpa blanca) en Arbequina, Royal de Calatayud y Negral de Sabinán, respectivamente.

Otro de los parámetros estudiados en la aceituna fue el peso fresco que puede ser muy variable dependiendo de la variedad, la cantidad de agua que contenga por fluctuaciones ambientales de humedad o incluso la carga del árbol (Lavee y Wodner, 1991, 2004; Beltrán *et al.*, 2004a). Así ocurrió en la selección clonal de Empeltre, donde el peso de las aceitunas osciló entre 1,23 y 4,24 g en todo el muestreo realizado durante los tres años (Tabla 2, artículo 4.1.). El análisis de la varianza (ANOVA) realizado reveló que múltiples factores agronómicos influyen en el peso de la aceituna (Tabla 3, artículo 4.1.). Sin embargo, la principal fuente de variabilidad se atribuyó a la campaña oleícola. Hernández *et al.* (2021a, 2021b) describió que la expresión de diversos genes que contribuyen a la síntesis de aceite en la aceituna está en cierto modo regulada por factores ambientales. En este sentido, la campaña 2019/20 se caracterizó por la producción significativa de aceitunas de mayor peso. Esta circunstancia podría ser debida a la menor producción y carga del árbol ocurrida en la variedad Empeltre durante este año oleícola, cuyo otoño fue de los de mayor pluviometría de las campañas estudiadas (Tabla 1, artículo 4.1.). El clon, al igual que la interacción entre este factor y el año, mostró un efecto significativo en el peso fresco del fruto destacando los clones número 3 y el agrupado Std por tener mayor peso. Por otro lado, a pesar de que el efecto de la fecha de cosecha fue estadísticamente significativo sobre el peso de la aceituna, su impacto fue muy limitado, posiblemente debido a que el aumento de peso durante la lipogénesis se equilibra con la pérdida de humedad que ocurre después de la acumulación de aceite (Beltrán *et al.*, 2004a).

Arbequina fue la variedad muestreada, incluyendo a los clones de Empeltre, con menor peso de fruto, oscilando entre 0,96 y 1,57 g durante el período comprendido entre octubre y diciembre de los años estudiados, 2017 y 2019 (Figura 2, artículo 4.3.). La aceituna de Royal de Calatayud presentó un rango de peso entre 2,6 y 4,7 g en las dos campañas, mientras que Negral de Sabinán, en octubre de 2019, tuvo un peso aproximado de 3,97 g. En ese mismo año, Royal de Calatayud mostró pesos superiores,

alrededor de 4,40 g, en comparación con Negral de Sabiñán en las mismas fechas de muestreo, e incluso mayor que los pesos registrados en las mismas fechas de 2017. Este aumento de peso en Royal de Calatayud entre campañas podría deberse principalmente a la escasez de frutos en el árbol en 2019, y quizás también sumado a la mayor cantidad de precipitaciones otoñales en 2019 en comparación con 2017, ya que el peso del fruto de Arbequina fue solo ligeramente superior en 2019, conclusión que respalda la generada en el estudio del peso del fruto en los clones de Empeltre.

El rendimiento graso de la aceituna, es decir, la cantidad de aceite que puede extraerse de ella, es un factor crucial para los agricultores, ya que afecta significativamente a la rentabilidad y al valor económico del olivar (Dag *et al.*, 2011). Para determinar el momento óptimo de cosecha, es conveniente vigilar el perfil de la acumulación del contenido de aceite en relación al peso seco (GSS), evitando así la influencia de la humedad ambiental causada por el régimen hídrico o inclemencias meteorológicas en el peso del fruto (Beltrán *et al.*, 2008; Navas-López *et al.*, 2019, 2020). Sin embargo, para las almazaras, estimar el rendimiento graso en fresco (GSM) conjuntamente con la humedad (HUM) puede ser más útil con el fin de optimizar la extracción de aceite y evitar la formación de pastas difíciles (Trentacoste *et al.*, 2010).

El rendimiento graso sobre seco (GSS) en la selección clonal de Empeltre mostró durante el muestreo un amplio rango, con valores que oscilaron entre 28,6% y 54,0% (Tabla 2, artículo 4.1.). Los resultados fueron similares a los obtenidos en estudios preliminares anteriores de la selección clonal (Tous *et al.*, 2006), pero inferiores a los obtenidos en el ensayo clonal comparativo ubicado en Cataluña (Romero *et al.*, 2012). La dispersión de los resultados fue menor en el GSS, al no influir el contenido de humedad, en comparación con el rendimiento graso sobre peso fresco (GSM), que tuvo valores entre 11,4% y 33,2%. El contenido de aceite, expresado en términos de peso fresco, coincide con la variación indicada en otros estudios, entre el 10% y el 35% (Vossen, 2005). La fecha de cosecha, coincidiendo con los resultados descritos por de la Rosa *et al.* (2013), y la interacción entre el clon y el año fueron los principales factores que influenciaron sobre la variabilidad en el GSS (Tabla 3, artículo 4.1.). También fueron significativos los

factores año y clon. En el caso del GSM, los factores más relevantes fueron la campaña oleícola y la fecha de cosecha (Tabla 3, artículo 4.1.). Así, el año 2017, con un otoño especialmente seco y con unas condiciones ambientales que provocaron aún más pérdida de la humedad de la aceituna, registró el mayor rendimiento graso, con un promedio de 44,2% de GSS y un 24,0% de GSM y, por el contrario, un contenido de agua significativamente menor (45,8%). La campaña 2017/18 también fue, en promedio, la de mejor extractabilidad de aceite en Abencor® de las aceitunas de la selección clonal (60%) (Tabla 1, Anexo), aunque suele existir un bajo grado de correlación entre el contenido en aceite del fruto en peso seco y el aceite extraído (Lavee y Wodner 1991; Rallo *et al.* 2005). El contenido de humedad promedio en las aceitunas de las campañas 2018/19 y 2019/20 alcanzó el 58% lo que propició la formación de «pastas difíciles» (Tabla 3, artículo 4.1.). En las tres campañas oleícolas, se utilizó idéntico proceso de extracción en el Abencor®, independientemente del rendimiento graso obtenido y de la humedad. Probablemente, no optimizar la extracción mediante adición de talco en algunas de las pastas demasiado húmedas de los años 2018 y 2019, afectó en la extractabilidad del proceso (Motilva *et al.*, 2000; Vossen, 2005; Di Giovacchino, 2013).

El rendimiento graso sobre materia seca (GSS) en las aceitunas Arbequina durante las campañas 17/18 y 19/20 (29,2-42,6%) fue menor que en Royal de Calatayud (49,1-57,6%) y Negral de Sabiñán (43,9-50,1%), a pesar de no poder completarse los muestreos en estas dos últimas variedades y determinar con certeza si se alcanzó o no el máximo en 2019 (Figura 3, artículo 4.3.). Aunque los ensayos (clonal y variedades) tenían diferente tratamiento de riego y no ha podido realizarse una comparación estadística rigurosa entre ambos, las dos variedades locales destacan por su alto rendimiento frente a Empeltre y Arbequina en la investigación realizada. En cuanto a la afección interanual en Arbequina, fue significativa en los parámetros GSM y HUM, pero no en GSS lo que corrobora el uso del rendimiento graso sobre materia seca (GSS) como indicador del rendimiento graso sin interferencias ambientales anuales.

Observando las correlaciones entre los parámetros analizados en las aceitunas en la selección clonal, y aunque el índice de madurez no sea un indicador muy fiable de

cómo la maduración progresa (Beltrán *et al.*, 2004a), se hallaron correlaciones positivas entre la pigmentación respecto al rendimiento graso (GSS, $r = 0,812$; GSM, $r = 0,769$) en la selección clonal de Empeltre estudiada, quizás porque en este caso los parámetros están influenciados principalmente por factores ambientales y no por el clon. Las escasas diferencias genéticas entre los clones podrían tener mucho menor peso en el índice de madurez que las existentes entre variedades. No hubo correlación alguna entre el peso fresco del fruto con el rendimiento graso como sí que describen algunos autores en otras variedades (Trentacoste *et al.*, 2010; de la Rosa *et al.*, 2013; Navas-López *et al.*, 2020).

En general, respecto a los resultados obtenidos en la selección clonal de Empeltre, destaca una baja influencia del clon en las características del fruto, de forma similar a las conclusiones entresacadas de la selección clonal realizada en Arbequina (Tous *et al.*, 2005). En cambio, los factores abióticos, como pueden serlo la temperatura, la humedad, la radiación solar, etc. han condicionado a la aceituna en su maduración (Navas-López *et al.*, 2019; Navas-López *et al.*, 2020). Serían necesarios estudios más exhaustivos respecto a la influencia de los factores abióticos para dilucidar sus efectos sobre la aceituna. Adicionalmente, tres de las cuatro variedades cultivadas en la misma finca: Empeltre, Arbequina y Royal de Calatayud, alcanzaron el contenido máximo de aceite (peso seco) en fechas similares según la campaña, en general a mediados de noviembre, independientemente del índice de maduración logrado. El máximo de GSS no pudo determinarse con fiabilidad suficiente en Negral de Calatayud al no tener suficientes muestreos. Este hallazgo incide sobre la no conveniencia del uso del índice de maduración como parámetro para determinar el momento óptimo de recolección en el olivar, si el objetivo es la obtención del máximo rendimiento (Beltrán *et al.*, 2004a, 2008; Trentacoste *et al.*, 2010).

5.2. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LA CALIDAD Y PERFIL LIPÍDICO DE LOS ACEITES DE OLIVA VIRGEN EXTRA DE VARIEDADES AUTÓCTONAS DE ARAGÓN DESTINADAS A ALMAZARA A LO LARGO DE LA MADURACIÓN DEL FRUTO Y SU EFECTO EN LA OBTENCIÓN DE ACEITES DE OLIVA DIFERENCIADOS

Los resultados obtenidos en el desarrollo del presente objetivo se encuentran recogidos en los artículos de las secciones [4.1.](#), [4.2.](#) y [4.3.](#)

Los cambios fisiológicos y bioquímicos que tienen lugar durante el proceso de maduración de la aceituna no solo implican modificaciones en las características del fruto, sino que también conllevan alteraciones en la composición química de los aceites de oliva virgen. En términos generales, se espera que el aceite de oliva virgen, obtenido siempre a partir de aceitunas sanas y procesado y conservado adecuadamente, cumpla con los criterios de calidad establecidos por las regulaciones para la máxima categoría, virgen extra (UE, 2022a; COI, 2022a; Codex Alimentarius, 2021). Mediante el estudio de la evolución de los compuestos químicos presentes en el aceite, es posible identificar el momento óptimo de cosecha que garantice aceites de oliva con perfiles lipídicos de mayor calidad nutricional y una mayor estabilidad, y así poder adelantar o retrasar la fecha de cosecha dentro del período previsto. De este modo, adquirir conocimiento sobre la composición química de los aceites de oliva virgen en función del momento de la cosecha permite a los agricultores posicionarse en un sector oleícola competitivo al obtener un producto diferenciado.

Por esta razón, una vez realizada la caracterización de los parámetros en las aceitunas muestreadas en el primer objetivo, se llevó a cabo la extracción del aceite de oliva virgen en el laboratorio utilizando el método Abencor®, con el fin de estudiar la evolución de las características fisicoquímicas y de la composición lipídica de los aceites

de oliva virgen obtenidos de la selección clonal de Empeltre y de otras variedades autóctonas de Aragón seleccionadas y muestreadas durante la maduración del fruto.

Los parámetros fisicoquímicos de todos los aceites de oliva virgen analizados cumplieron con las características de calidad establecidas en la legislación europea vigente durante el desarrollo de esta investigación (CEE, 1991; UE, 2019) para categorizarlos como aceites de oliva virgen extra (Tabla 2, Anexo.). Estas características y sus límites no fueron modificadas tras la aprobación de la legislación vigente, en lo que concierne a la categoría virgen extra, en el momento de la discusión de los resultados (UE, 2022a).

En el estudio de selección clonal de Empeltre, se observaron porcentajes de acidez muy bajos (0,09-0,26% ác. oleico), de acuerdo con lo esperado para aceitunas sanas. Estos resultados son similares a los obtenidos por otros investigadores en Empeltre en estudios previos (Gracia, 2001; Gracia y Marco, 2010). En algunos clones, y no en todas las campañas, se observó un aumento de la acidez en los últimos muestreos, lo cual puede atribuirse a la lipólisis enzimática, proceso mediante la cual los triglicéridos se hidrolizan y aumentan los ácidos grasos libres (Martínez Suárez, 1973). A medida que avanza la maduración del fruto, las lipasas endógenas presentes en el fruto aumentan su actividad, lo que implicaría mayor acidez, siendo más pronunciado su efecto en frutos que han sufrido golpes o han sido picados por insectos. Sin embargo, la evolución de la acidez en los aceites analizados en relación con la maduración no arrojó resultados concluyentes. Otros autores han descrito incremento de la acidez en relación con la maduración (Salvador *et al.*, 2001; Dag *et al.*, 2011; Benito *et al.*, 2013), sin embargo, también se han descrito resultados sin una tendencia aparente (Abenoza *et al.*, 2015b).

Los parámetros utilizados para evaluar la oxidación de los aceites de oliva, como el índice de peróxidos y los coeficientes de absorción ultravioleta (K_{270} y K_{232}), disminuyeron en la mayoría de los muestreos realizados durante el proceso de maduración de la aceituna, lo cual coincide con algunos estudios previos (Salvador *et al.*, 2001; Dag *et al.*, 2011; Benito *et al.*, 2013), aunque de manera variable. En general, los valores del índice de peróxidos fueron inferiores a 10 meqO₂/kg, excepto en el clon Std

durante la campaña 2019/20, aunque aún se mantuvieron por debajo de 15 meqO₂/kg. No se observó una correlación entre este parámetro y la maduración, medida en días de cosecha transcurridos, ni tampoco según el índice de maduración. Sin embargo, es posible que la falta de correlación se deba al aumento significativo del índice de peróxidos en los aceites muestreados en la primera quincena de diciembre de 2017, después de varios episodios de heladas en la finca donde se realizó el estudio clonal. El daño por heladas en la aceituna se traduce en una pérdida de estabilidad a la oxidación, relacionado con la disminución en la concentración de la mayoría de los compuestos fenólicos, especialmente los derivados secoiridoides (Rallo *et al.*, 2018). Otros aumentos en el índice de peróxidos se han asociado con un incremento en la actividad de la enzima lipoxigenasa (Salvador *et al.*, 2001; Baccouri *et al.*, 2008). El parámetro K₂₃₂, utilizado para evaluar la oxidación primaria de los aceites, al igual que el índice de peróxidos, mostró una clara disminución a medida que avanzaba la maduración, al igual que el parámetro K₂₇₀, que mide la oxidación secundaria. Ambos parámetros mostraron correlaciones negativas significativas con la maduración, especialmente K₂₇₀ ($r_{2017/18} = -0,916$; $r_{2018/19} = -0,711$; $r_{2018/19} = -0,738$). No se encontró una correlación entre los parámetros de oxidación primaria, es decir, el índice de peróxidos y K₂₃₂.

En relación a los resultados de los parámetros que evaluaron la calidad fisicoquímica de los aceites de las variedades Arbequina, Royal de Calatayud y Negral de Sabiñán (Tabla 1, artículo 4.3.), se observaron, en general, valores más bajos en los cuatro parámetros en comparación con los obtenidos en la selección clonal de la variedad Empeltre. Sin embargo, se encontró una excepción en la acidez de los aceites de la variedad Royal de Calatayud (0,10-0,41% ác. oleico), especialmente durante la campaña 2019/20. En las cosechas de Arbequina y Royal de Calatayud del año 2017, se observó un aumento en el índice de peróxidos en el último muestreo, al igual que ocurrió en general con la variedad Empeltre. Este aumento podría estar relacionado, como se ha mencionado, con los efectos de las heladas ocurridas ese año. Los aceites de la variedad Negral de Sabiñán mostraron los valores más bajos de índice de peróxidos, K₂₇₀ y K₂₃₂ en comparación con todos los aceites muestreados, incluidos los clones de la variedad Empeltre, durante el mes de octubre de 2019, cuando se pudo realizar el muestreo de

esta variedad. Por otro lado, la evolución de los parámetros fisicoquímicos de calidad en el ensayo de variedades no fue tan clara como en el ensayo clonal. Solo se observó una disminución evidente en el parámetro K_{270} de la variedad Royal de Calatayud durante la campaña 2017/18, en relación con la maduración, y se encontró una correlación significativa tanto con los días de cosecha ($r_{\text{días}} = -0,957$) como con el índice de maduración ($r_{\text{IM}} = -0,978$).

La amplia variedad de compuestos químicos presentes en los aceites de oliva virgen dificulta la caracterización exhaustiva de cada uno de ellos, especialmente al considerar múltiples factores que generan variabilidad. Por lo tanto, se decidió seleccionar y estudiar aquellos compuestos que podían influir tanto en la autenticidad, es decir, en la calidad reglamentada, como en la calidad nutricional del aceite.

Dentro de la legislación europea y de otras normativas aplicables (UE, 2022a; COI, 2022a; Codex Alimentarius, 2021), las características de pureza incluyen la composición de ácidos grasos y esteroides como herramientas para detectar posibles adulteraciones en los aceites de oliva virgen, como por ejemplo la mezcla con otros aceites vegetales (Aparicio *et al.*, 2013; García-González *et al.*, 2017; Conte, 2020a; Conte *et al.*, 2020b). Estos compuestos también son útiles para la identificación varietal, además del origen geográfico, de los aceites de oliva (García-González, *et al.*, 2009; Aparicio y García-González, 2013; Bajoub *et al.*, 2015). Dado que la mejora genética de las semillas ha ocasionado cambios significativos en la composición de ácidos grasos de ciertos aceites vegetales, se ha incrementado el interés en la composición de esteroides como indicador de la autenticidad de los aceites de oliva en los últimos años (Conte *et al.*, 2020b).

La composición de ácidos grasos de la selección clonal de Empeltre analizada en tres campañas consecutivas a lo largo del proceso de maduración (Tabla 3, Anexo), mostró resultados conformes en todos los muestreos de acuerdo con la legislación europea vigente durante el periodo de investigación (CEE, 1991; UE, 2019) y las distintas normas comerciales aplicables al aceite de oliva del Consejo Oleícola Internacional (COI), las cuales se actualizan anualmente (T.15/NC No 3). Los rangos en los que se

encontraron los principales ácidos grasos son consistentes con los informados por otros investigadores para la variedad Empeltre. Sin embargo, a diferencia de este estudio, que realizó muestreos en seis fechas diferentes entre octubre y diciembre, en la mayoría de los estudios previos de otros autores no se consideró la evolución de los ácidos grasos según la maduración de la aceituna. Se han descrito valores específicos para estos ácidos grasos en diferentes etapas de maduración o épocas de cosecha (Tous *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2011; Gracia *et al.*, 2009; Mousavi *et al.*, 2019) y en diversos entornos de cultivo (Mousavi *et al.*, 2019). Gracia y Marco (2010) presentaron resultados basados en la maduración durante tres campañas, pero se enfocaron exclusivamente en el ácido linoleico y en la relación entre ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (M/P). Además, la composición de ácidos grasos determinada en la variedad Arbequina también concuerda con lo descrito previamente por otros autores (Gracia *et al.*, 2009; Benito *et al.*, 2013; Montaña *et al.*, 2016).

Se han observado diferentes tendencias en la evolución de los principales ácidos grasos en diversas variedades de acuerdo con el grado de madurez de las aceitunas y algunas fluctuaciones han mostrado inconsistencias interanuales debido a interacciones entre los efectos de la fecha y el año de cosecha como se discutirá en el siguiente objetivo (Gutiérrez *et al.*, 1999; Beltrán *et al.*, 2004b, 2008; Baccouri *et al.*, 2008; de la Rosa *et al.*, 2013; Deiana *et al.*, 2019) (Figura 1, artículo 4.1.; Tabla 2, artículo 4.3.). En este estudio, se encontró una disminución del ácido palmítico, en todos los clones y en las tres campañas, como ya se ha descrito en diferentes variedades (Beltrán *et al.*, 2004b, 2008; Uceda *et al.*, 2008; Dag *et al.*, 2011; Benito *et al.*, 2013). Lo mismo ocurrió con el ácido palmítico en las variedades Arbequina y Royal de Calatayud. En general, se observó una tendencia a la disminución del ácido esteárico y el ácido linolénico a medida que avanzaba la campaña, como se ha informado en estudios anteriores (Beltrán *et al.*, 2008; Benito *et al.*, 2013), excepto en el caso del ácido esteárico en Royal de Calatayud. Por el contrario, el ácido linoleico generalmente aumentó al igual que el contenido total de ácidos grasos polinsaturados, excepto en los clones de la campaña 18/19, donde no se encontraron diferencias significativas entre los muestreos, y en Arbequina de la campaña 19/20, donde se mantuvo más o menos constante. El ácido oleico mostró resultados

contradictorios causados por la interacción entre efectos comentada anteriormente. En el estudio clonal de la variedad Empeltre, el ácido oleico no presentó diferencias significativas en relación a la fecha de cosecha al analizar los resultados de las tres campañas en conjunto, pero al analizar las campañas por separado, se observó un aumento en todos los clones, excepto en el clon 3, en la cosecha 18/19. Este ácido graso también aumentó a lo largo del período de cosecha de 2017 en Arbequina y Royal de Calatayud, pero se mantuvo constante durante la campaña 2019/20 en Arbequina. Estas diferencias en la evolución del ácido oleico ya han sido descritas por otros autores (Salvador *et al.*, 2001; Beltrán *et al.*, 2004b; Uceda *et al.*, 2008). La relación entre ácidos grasos mono y poliinsaturados (M/P) no mostró diferencias significativas en la selección clonal en función de la fecha de cosecha, debido al valor constante del ácido oleico y al ligero aumento del ácido linoleico (Uceda *et al.*, 2008). No se observa una evolución clara de este parámetro en los aceites del ensayo de variedades en la campaña 2017 ni en Arbequina durante del año 2019. No se pudo evaluar con precisión la evolución de los ácidos grasos en la variedad Negral de Sabiñán debido a que solo se realizaron tres muestreos en octubre de 2019. En cierto modo, se intuye una tendencia en los aceites tempranos de esta variedad, que consiste en una disminución del ácido oleico y un aumento del ácido linoleico, lo que resulta en una disminución de la relación M/P al igual que ocurre en la variedad Royal de Calatayud en la cosecha de ese mismo año. Es importante destacar que, debido al número limitado de muestreos, estas observaciones deben ser interpretadas con precaución y se requieren más estudios para confirmar estas tendencias.

Con respecto a la relación entre los ácidos grasos oleico y linoleico, se identificó una correlación negativa significativa entre ambos ($r = -0.875$) en los aceites de la selección clonal, en línea con otros estudios (de la Rosa *et al.*, 2013; Navas-López *et al.*, 2020). Se ha señalado que el aumento del ácido linoleico y la reducción del ácido oleico pueden ser atribuidos a una alta tasa de desaturación del oleato (Hernández *et al.*, 2021a). Sin embargo, se han observado diferencias en el metabolismo del ácido linoleico según el genotipo (Hernández *et al.* 2020). Este hecho también se ha observado en la discusión de este objetivo (Figura 1, artículo 4.1.). Las diferencias en el control de la relación entre

ambos ácidos grasos en el olivo podrían estar reguladas por las variaciones en las especificidades de las enzimas aciltransferasa, como se documenta en la introducción de esta Tesis Doctoral (Hernández *et al.*, 2021a).

Paralelamente a la biosíntesis de los triglicéridos, entre otros compuestos químicos, se produce la síntesis de esteroides y diol de triterpeno, a través de múltiples rutas enzimáticas, cuya actividad está codificada por genes específicos (Beltrán *et al.*, 2004a; Moreau *et al.*, 2018; Du *et al.*, 2022). La complejidad de estas vías, además de la implicación de los esteroides en la biosíntesis de otros compuestos (Venkatramesh *et al.*, 2003; Sakouhi *et al.*, 2009), junto con los posibles efectos causados por estrés abiótico en las aceitunas, un aspecto aún poco explorado (Dias *et al.*, 2001; Du *et al.*, 2022), contribuyen a la variabilidad en la concentración de esteroides a lo largo del proceso de maduración. En este sentido, tanto en los aceites de la selección clonal estudiada de la variedad Empeltre como en los aceites obtenidos en el ensayo de variedades, estas variaciones han demostrado ser significativas en referencia a la evolución de los esteroides durante la maduración de la aceituna. No obstante, se han encontrado escasas referencias que aborden específicamente las tendencias del contenido total e individual de esteroides durante el proceso de maduración de la aceituna en las variedades estudiadas en esta Tesis Doctoral (Lukić *et al.*, 2021). Por tanto, es posible que la dinámica de la biosíntesis y acumulación de esteroides en las aceitunas de Empeltre, Arbequina, Royal de Calatayud o Negral de Sabiñán difiera de lo descrito hasta ahora en otras variedades.

La concentración total de esteroides, a pesar de mostrar diferencias significativas, no presentó un patrón evolutivo claro en el conjunto de las tres campañas estudiadas en la selección clonal de Empeltre (Tablas 3-7, artículo 4.2.). Esto podría atribuirse al año de cosecha, que parece ser el principal factor que contribuye a la variabilidad de este parámetro (Tabla 2, artículo 4.2.), como se discutirá en el próximo objetivo. Este hallazgo coincide con lo observado en los aceites de la variedad Arbequina del ensayo de variedades, analizados durante dos campañas completas (Tabla 3, artículo 4.3.). Esta observación corrobora los resultados reportados por Salvador *et al.* (2001) en la variedad

Cornicabra. Mientras algunos estudios han señalado una disminución en el contenido de esteroides en el aceite de oliva atribuyéndolo al efecto de dilución causado por el aumento del contenido de aceite durante la lipogénesis (Gutiérrez *et al.*, 1999; Beltrán *et al.*, 2004b, Sánchez-Casas *et al.*, 2004), otros han descrito un incremento en la concentración de esteroides al examinar directamente la pulpa de la aceituna (Fernández-Cuesta *et al.*, 2013; Inês *et al.*, 2019). Por otro lado, en los aceites de la variedad Royal de Calatayud, se observó un aumento significativo en las dos campañas estudiadas (Tabla 3, artículo 4.3.).

Los resultados obtenidos en relación a las dinámicas de evolución del contenido relativo de los principales esteroides individuales coincidieron en su gran mayoría con los resultados recopilados por Lukić *et al.* (2021) en otros estudios realizados en aceites monovarietales (Tablas 3-7, artículo 4.2.; Tabla 3, artículo 4.3.).

Dos de los esteroides más importantes en el aceite de oliva, β -sitosterol y Δ^5 -avenasterol, mostraron una fuerte correlación negativa tanto en el estudio de la selección clonal de Empeltre ($r = -0.902$, $p < 0.01$) como en el ensayo de variedades ($r = -0.991$, $p < 0.01$). Esta correlación se explica por la actividad enzimática que regula la relación entre ambos, ya que el esteroide Δ^5 -avenasterol es el precursor en la biosíntesis de β -sitosterol (Gutiérrez *et al.*, 1999; Morikawa *et al.*, 2006; Moreau *et al.*, 2008; Fernández-Cuesta *et al.*, 2013). Estos resultados son consistentes con estudios previos realizados en otros aceites monovarietales de diferentes países (Beltrán *et al.*, 2004b; Sánchez-Casas *et al.*, 2004; Vekiari *et al.*, 2010; Dag *et al.*, 2015). En general, en ambos ensayos, se observó una ligera disminución neta en el contenido relativo de β -sitosterol debido a una disminución leve durante el período inicial de muestreo, seguida de una estabilización en su contenido (Tablas 3-7, artículo 4.2.; Tabla 3, artículo 4.3.). A su vez, se observó una evolución inversa en el contenido de Δ^5 -avenasterol, en línea con la correlación descrita con β -sitosterol. Algunos autores han descrito contenidos mínimos de β -sitosterol, aunque máximos en Δ^5 -avenasterol, cuando las aceitunas alcanzan su punto óptimo de maduración en referencia al rendimiento graso expresado en materia seca (GSS) (Salvador *et al.*, 2001; Fernández-Cuesta *et al.*, 2013; Fuentes de Mendoza *et al.*,

2013; Lukić *et al.*, 2013). A este respecto, se encontró la mejor correlación significativa con el parámetro GSS respecto a la relación β -sitosterol/ Δ 5-avenasterol ($r = -0,649$, $p < 0.01$) en el estudio clonal considerando las tres campañas estudiadas. En cambio, en el ensayo de variedades, solo se observó correlación entre estos esteroides y GSS en el caso específico de la variedad Arbequina. Tanto en el contenido individual ($r_{\beta\text{-sitosterol}} = -0,815$, $p < 0.01$; $r_{\Delta 5\text{-avenasterol}} = 0,848$, $p < 0.01$) como en la relación entre ellos ($r_{\beta\text{-sitosterol}/\Delta 5\text{-avenasterol}} = -0,858$, $p < 0.01$) mostraron correlaciones significativas respecto a GSS.

Otro de los esteroides importantes en el aceite de oliva es el campesterol. Su contenido relativo disminuyó a lo largo de la maduración de la aceituna en los estadios iniciales para permanecer relativamente constante tras el envero, en los aceites de ambos ensayos (Tablas 3-7, artículo 4.2.; Tabla 3, artículo 4.3.). Al igual que lo comentado anteriormente, el campesterol correlacionó negativa y significativamente con el parámetro GSS ($r_{\text{clones}} = -0,669$, $p < 0.01$; $r_{\text{Arbequina}} = -0,771$, $p < 0.01$; $r_{\text{RoyaldeCalatayud}} = -0,689$, $p < 0.05$). Los aceites tempranos de Arbequina (IM: 0-1) presentaron contenidos de campesterol ligeramente superiores a 4,0%, límite máximo regulatorio o normativo (UE, 2022a, COI, 2022a, Codex Alimentarius, 2021), para considerarlos auténticos aceites de oliva, es decir, sin adulteración con otros aceites vegetales o grasas animales. Esta circunstancia también ha sido descrita por otros autores (Ceci y Carelli, 2007; Guillaume *et al.*, 2012).

En la revisión realizada por Lukić *et al.* (2021), la mayoría de los estudios indican un aumento en el contenido de estigmasterol durante la maduración especialmente en las etapas finales, aunque algunos casos no son significativos. Este aumento de estigmasterol también se ha asociado con una disminución en la calidad del fruto, lo cual se refleja en un aumento en la acidez del aceite (Gutiérrez *et al.*, 2000; Gracia, 2001). La tasa de aumento de este esteroide entre el primer y último muestreo de octubre en los aceites de la selección clonal varió según el año de cosecha (2017: 22%; 2018: 252%; 2019: 97%) y no mostró correlación con la acidez de los aceites, posiblemente debido a la baja acidez de los mismos, en contraste con los resultados de los estudios mencionados.

Después del aumento, se observó un período de estabilización o ligera disminución hasta diciembre (artículo 4.2.: Figura 2, Tablas 3-7.). Se encontró una fuerte correlación negativa entre el estigmasterol y el β -sitosterol aparente ($r = -0.975$; $p < 0.01$), similar a lo reportado en estudios anteriores con la variedad Empeltre (Gracia, 2001) y otras variedades (Temime *et al.*, 2007; Kyçyk, *et al.*, 2009; Lukić *et al.*, 2013). El extraordinario incremento del estigmasterol después del período de lluvias en octubre de 2018 y la correlación negativa de este esteroide con el parámetro β -sitosterol aparente, sugiere la hipótesis de que el estrés abiótico causado por las lluvias durante la maduración de la aceituna de Empeltre sea la causa de que el parámetro de β -sitosterol aparente presente valores inferiores al 93% requerido según los criterios de pureza establecidos por la legislación europea (UE, 2022a) y otras normativas (COI, 2022a; Codex Alimentarius, 2021) en los aceites de oliva virgen. Aunque serían necesarios más ensayos que pudieran corroborar esta hipótesis.

No se observó una tendencia clara relativa al contenido de estigmasterol en el ensayo de variedades (Tabla 3, artículo 4.3.). No fue posible contrastar el notable incremento de estigmasterol observado en los clones de Empeltre después de la época de lluvias, debido a la ausencia de muestreos durante el año 2018 en el ensayo de variedades. En el caso específico de los aceites de la variedad Royal de Calatayud de la campaña 19/20, se encontró una correlación significativa entre el estigmasterol y la acidez ($r = 0,820$, $p < 0,01$). Estos aceites presentaron una acidez más elevada, alcanzando un 0,40%. Solo la variedad Arbequina mostró una correlación significativa entre el estigmasterol y el β -sitosterol aparente ($r = -0.759$; $p < 0.01$).

El esteroide Δ^7 -estigmasterol, a pesar de ser un esteroide minoritario en el aceite de oliva, es uno de los que junto con el campesterol presenta más casos de incumplimiento legislativo o normativo en los aceites de oliva virgen, lo cual puede generar inconvenientes a la hora de demostrar su pureza como aceite de oliva. En los aceites de la selección clonal de la variedad Empeltre, no se observó una tendencia clara según la maduración debido quizás a la implicación conjunta de otros factores en su evolución (artículo 4.2.: Figura 3, Tablas 3-7.). Como se detallará en la discusión del próximo

objetivo, la evolución de este esteroide durante el periodo de muestreo estuvo modulada por las interacciones maduración x año y maduración x clon, de tal manera que el efecto de la maduración por sí solo no fue significativo (Tabla 2, artículo 4.2). Es importante destacar que debido al alto contenido relativo de Δ^7 -estigmastenol en los aceites de la variedad Empeltre, cualquier aumento en su contenido podría implicar superar el límite máximo del 0,5% establecido para los aceites de oliva. Por otro lado, tanto en la variedad Arbequina como en la variedad Royal de Calatayud, este esteroide correlacionó con el índice de maduración ($r_{\text{Arbequina}} = -0,786$; $p < 0.01$; $r_{\text{RoyaldeCalatayud}} = -0,764$; $p < 0.01$), y se observó una disminución en su contenido a medida que la aceituna maduraba (Tabla 3, artículo 4.3.).

Otros compuestos importantes en los aceites de oliva, como los dialcoholes triterpénicos eritrodiol y uvaol fueron analizados únicamente en los aceites del ensayo de variedades. Aunque se observaron diferencias significativas entre las fechas de muestreo de los aceites de las tres variedades, no se encontró una tendencia clara en su evolución (Tabla 3, artículo 4.3.).

A lo largo del proceso de maduración de la aceituna, los aceites obtenidos experimentan cambios significativos en la concentración de compuestos fenólicos, los cuales tienen un impacto considerable en los atributos sensoriales, la vida útil y el valor nutricional del aceite de oliva (Rallo *et al.*, 2018). Todos los aceites de la selección clonal de Empeltre disminuyeron significativamente y de forma lineal su contenido fenólico durante el avance otoñal de las campañas, lo que coincide con otros autores (Gutiérrez *et al.*, 1999; Beltrán *et al.*, 2008; Baccouri *et al.*, 2008; Deiana *et al.*, 2019), aunque su tasa de descenso fue diferente según el año y clon estudiado (2017: 70%, 2018: 57%; 2019: 43%). Los aceites de Arbequina, Royal de Calatayud y Negral de Sabiñán también sufrieron un descenso en su concentración de fenoles según avanzó el muestreo (Figura 4, artículo 4.3.). Arbequina, única variedad de este ensayo de variedades completamente muestreada en ambas campañas, presentó una tasa de descenso similar al de la selección clonal, aunque menos acusada en 2019 (2017: 72%, 2019: 29%). Royal de Calatayud presentó el mismo descenso en 2017, 68%. Este descenso en la concentración de fenoles

tan acusado, que se observa en todas las variedades al final del muestreo en 2017, podría ser debido a las heladas que tuvieron lugar en diciembre, lo que coincide con el incremento en el índice de peróxidos anteriormente comentado. La variedad Arbequina mostró especialmente un perfil de descenso diferenciado respecto al resto de variedades estudiadas, ya que experimentó un incremento significativo en el contenido de polifenoles durante las etapas iniciales de la maduración, alcanzando su punto máximo a finales de octubre o principios de noviembre, seguido de un declive posterior. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados por Benito *et al.* (2013) en Arbequina y otros autores en Cornicabra, Chétoui y Chemlali (Salvador *et al.*, 2001; Baccouri *et al.*, 2008). En otro estudio, Uceda *et al.* (2008) describieron esta variación en el contenido de polifenoles a lo largo de la maduración, mostrando una curva cuadrática en la cual el punto máximo generalmente coincide con el contenido máximo de aceite en el fruto lo que coincide con lo observado en esta Tesis Doctoral.

La estabilidad oxidativa de los aceites de oliva virgen ha sido asociada en primer lugar con la concentración de compuestos antioxidantes, como los fenoles, y con la composición de ácidos grasos en menor medida (Gutiérrez, 1989; Aparicio *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2001; Gracia *et al.*, 2009). Sin embargo, en el estudio realizado en el ensayo clonal, no se encontró ninguna correlación entre la estabilidad oxidativa y estos parámetros. En contraste, en los aceites de Arbequina y Royal de Calatayud, sí se observó una correlación entre la estabilidad oxidativa y la concentración de fenoles ($r_{\text{Arbequina}} = 0,933$; $p < 0.01$; $r_{\text{RoyaldeCalatayud}} = 0,818$; $p < 0.01$) mayor que la descrita por otros autores en Arbequina (Tous *et al.*, 1997; Benito *et al.*, 2013; Montaña *et al.*, 2016). No hubo, por el contrario, correlación respecto a la composición de ácidos grasos en concordancia con otros estudios (Aparicio *et al.*, 1999; Montaña *et al.*, 2016). A propósito de la evolución de la estabilidad oxidativa, disminuyó de igual manera que el contenido fenólico en la selección clonal, aunque su tasa de descenso no fue tan elevada especialmente en las campañas 2018 y 2019, años con mayor relación entre ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (M/P), aunque no haya habido correlación entre estos parámetros. También se observó una disminución en la estabilidad de los aceites de Arbequina, Royal de Calatayud y Negral de Sabinán durante el período de cosecha, siguiendo un patrón

similar al de la evolución fenológica, con un aumento inicial y posterior descenso en el caso de Arbequina.

5.3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE FACTORES AGRONÓMICOS EN LA CALIDAD, EL PERFIL LIPÍDICO Y AUTENTICIDAD DE LOS ACEITES DE OLIVA VIRGEN EXTRA DE VARIEDADES AUTÓCTONAS DE ARAGÓN DESTINADAS A ALMAZARA Y EN LA OBTENCIÓN DE ACEITES DE OLIVA CON CARACTERÍSTICAS FISICOQUÍMICAS SINGULARES

Los resultados obtenidos en el desarrollo del presente objetivo se encuentran recogidos en los artículos de las secciones [4.1.](#), [4.2.](#) y [4.3.](#)

La calidad reglamentada del aceite de oliva en cuanto a sus características fisicoquímicas no se ve significativamente influenciada ni por la variedad de la aceituna ni por las condiciones agrológicas habituales si se hacen uso de unas buenas prácticas en el procesado de la aceituna y del aceite de oliva obtenido. Tampoco tienen influencia significativa las diferentes prácticas culturales agronómicas aplicadas al olivar (Uceda *et al.*, 2008). Sin embargo, la calidad nutricional, referida a la composición en ácidos grasos y la concentración de compuestos fenólicos, entre otros compuestos, o la autenticidad del aceite de oliva virgen, pueden verse condicionadas tanto por factores genéticos como agrológicos y sus interacciones (Ripa *et al.*, 2008; Mailer *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2019; Mousavi *et al.*, 2019; Navas-López *et al.*, 2020; Sevim *et al.*, 2022; Torres *et al.*, 2022; Contreras *et al.*, 2023).

En este contexto, se llevó a cabo una investigación con el objetivo de analizar cómo diversos factores agronómicos, tales como la variedad, el clon, la campaña oleícola y la fecha de muestreo asociada a la maduración del fruto, pueden influir en la variabilidad de ciertos compuestos presentes en el aceite de oliva y en su estabilidad. Para ello, se utilizaron, como se ha hecho en el anterior objetivo discutido, los aceites de oliva virgen extra obtenidos tras el muestreo de las aceitunas de diferentes clones de la variedad Empeltre, así como de las variedades Arbequina, Royal de Calatayud y Negral de Sabinán.

El análisis factorial ANOVA realizado sobre la composición de ácidos grasos de los aceites de oliva virgen extra obtenidos de la selección clonal estudiada reveló información acerca de las fuentes de variabilidad (Tabla 4, artículo 4.1.). Los factores examinados en este caso fueron el año y fecha de cosecha, como factores agrológicos o ambientales, y el clon como fuente de variación genética.

La composición ácida estuvo principalmente influenciada por factores ambientales (Navas-López *et al.*, 2020; Mousavi *et al.*, 2019; García-Inza *et al.*, 2018). El año tuvo un efecto predominante en todos los ácidos grasos, así como en la relación entre ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (M/P), a excepción del ácido linolénico, que estuvo principalmente influenciado por la fecha de cosecha. En cuanto al efecto ambiental, se han descrito asociaciones entre las fluctuaciones de las temperaturas según la estación y la ubicación del cultivar con la composición de ácidos grasos (Ripa *et al.*, 2008; Inglese *et al.*, 2011; Piravi-Vanak *et al.*, 2012; Mousavi *et al.*, 2019). Se ha observado que los aceites obtenidos de zonas o épocas más cálidas presentan contenidos más bajos de ácido oleico, pero mayores contenidos de ácido palmítico y ácidos grasos insaturados como el linoleico o linolénico (Ripa *et al.*, 2008; Inglese *et al.*, 2011; García-Inza *et al.*, 2018), aunque otros únicamente consideran el efecto del ácido oleico (Mousavi *et al.*, 2019; Navas-López *et al.*, 2020). Esto justifica el mayor contenido de ácido palmítico y menor contenido de ácido oleico en los aceites del año más cálido estudiado, que fue el año 2019. Sin embargo, en el año 2017, que fue el menos cálido, se observó un menor porcentaje de ácido palmítico en los aceites de esa cosecha de acuerdo con lo observado en otras investigaciones, pero un mayor contenido de ácido linoleico. Aunque el contenido de ácido oleico en 2017 fue mayor que en 2019, resultó menor que en 2018. De hecho, la relación M/P fue la más baja de las tres cosechas debido al incremento del porcentaje de C18:2. También se ha observado que la interacción significativa entre los factores genotipo y ambiente puede interferir en la asociación mencionada anteriormente (Inglese *et al.*, 2011). En el estudio clonal, la interacción entre el clon y el año fue significativa para los ácidos C16:0, C18:1 y C18:2. La amplia diferencia observada en la relación M/P entre los años 2017 (5,58) y 2018 (8,38) se debe principalmente a la elevada variabilidad relativa que presentó el contenido de ácido linoleico en los aceites

analizados, ya que la variación en el contenido del ácido oleico fue mucho menor que la del ácido linoleico.

La composición ácida de los aceites en el ensayo de variedades también mostró diferencias significativas respecto al año en Arbequina y Royal de Calatayud (Tabla 2, artículo 4.3.). Ambas variedades presentaron mayores contenidos de ácido palmítico, menor contenido de ácido oleico y mayor contenido de ácido linoleico, lo que resultó en una menor relación M/P, en el año más cálido de los dos estudiados, que fue el año 2019. No se pudieron estudiar los efectos de las interacciones entre los factores ambiente y variedad, por lo que no se dispone de información sobre si estas interacciones pudieron ser significativas.

En cuanto al régimen hídrico del año de cultivo, estudios anteriores han sugerido que los veranos lluviosos resultan en un menor contenido de ácido oleico en el aceite de oliva, debido a una reducción en la actividad enzimática en la biosíntesis de este ácido graso (Angerosa *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 2003; Beltrán *et al.*, 2004b). Sin embargo, estos hallazgos difieren de los resultados de esta Tesis doctoral, ya que se ha observado un mayor contenido de ácido oleico en los aceites de la selección clonal durante el año 2018 y en los aceites del ensayo de variedades en 2017 (el año 2018 no fue analizado en este ensayo). Cabe destacar que ambos años presentaron los veranos más lluviosos de los tres años. Según otro estudio realizado en aceitunas de la variedad Arbequina, se sugiere que un mayor régimen hídrico durante la estación otoñal afecta la expresión del gen FAD2-2, que es determinante en el contenido de ácido linoleico en la pulpa de la aceituna, lo que resulta en un aumento de su contenido (Hernández *et al.*, 2009). Los aceites obtenidos de la variedad Arbequina durante el otoño de la campaña 2019/20, que fue más lluvioso que el de 2017/18, mostraron un mayor contenido de ácido linoleico, lo que corrobora el estudio descrito. Se observó un patrón similar en los aceites de la variedad Royal de Calatayud, pero no en los aceites obtenidos de la selección clonal de Empeltre.

Otro de los factores estudiados fue la fecha de cosecha. En la selección clonal no tuvo un impacto significativo sobre el ácido oleico ni en la relación M/P, pero sí de forma secundaria para el resto de ácidos grasos excepto, como se ha dicho, en el linolénico que

fue el factor principal. En el ensayo de variedades, se encontró un efecto significativo en todos los ácidos grasos, aunque no se pudo determinar si su impacto fue notable o no. Otros autores también han descrito cambios significativos en la composición ácida asociados a la maduración de la aceituna (Dag *et al.*, 2011; Inglese *et al.*, 2011; de la Rosa *et al.*, 2013; Sánchez de Medina *et al.*, 2015). La implicación del efecto de la maduración en la composición de los ácidos grasos ha sido considerada en el objetivo anterior, referido a la evolución en el perfil lipídico de los AOVE a lo largo de la maduración.

Varios estudios previos han atribuido al factor genético la principal contribución a la variabilidad en la composición de ácidos grasos (Tous *et al.*, 2005; Uceda *et al.*, 2005; Uceda *et al.*, 2008; Ripa *et al.*, 2008; de la Rosa *et al.*, 2013; Mousavi *et al.*, 2019). Estas investigaciones han utilizado diferentes variedades, las cuales presentan una mayor variabilidad genética en comparación con la que podría proporcionar la selección clonal utilizada en el presente estudio. En los resultados obtenidos, aunque la diferenciación clonal contribuyó significativamente a la variabilidad de todos los principales ácidos grasos, su efecto fue mínimo, excepto en el caso de los ácidos palmítico (C16:0) y linolénico (C18:3). La contribución del clon fue más destacada para el resto de ácidos grasos cuando interactuaba con el año, principalmente en los ácidos C16:0 y C18:1, debido a variaciones interanuales significativas observadas en algunos clones resultando menos «plásticos», mientras que otros eran más estables, como el clon 3 respecto al ácido oleico. Este tipo de interacción sobre la composición de ácidos grasos ha sido descrita en múltiples estudios, abarcando una amplia variedad de variedades, en los cuales la variabilidad genética provenía de la variedad en lugar del clon como en el presente estudio (Tous *et al.*, 2005; Mousavi *et al.*, 2019). Podría concluirse que el clon Std presenta mejor relación M/P (7,06) por su mayor contenido en ácido oleico y menor linoleico pero los márgenes que lo separan del resto de los clones son mínimas, aunque significativas. En general, los valores entre los que oscilaron los principales ácidos grasos de la selección clonal fueron: C16:0, 11,57-16,99%; C18:0, 1,33-2,20%; C18:1, 65,42-75,74%; C18:2, 6,66-15,65%; C18:3, 0,67-1,01%; M/P: 4,09-10,48 (Tabla 2, artículo 4.1.).

Se observaron diferencias significativas entre las variedades Arbequina, Royal de Calatayud y Negral de Sabiñán en términos de composición de ácidos grasos debido al factor genético. Sin embargo, a causa del análisis estadístico utilizado, no se pudo determinar su contribución a la variabilidad de la composición de ácidos grasos respecto a otros factores. La variedad Royal de Calatayud presentó el mayor porcentaje de ácido oleico (75,31%) y el menor porcentaje de ácido linoleico (7,42%), lo que resultó en una mayor relación M/P (9,84). Por otro lado, la variedad Negral de Sabiñán mostró un menor porcentaje de ácido oleico (64,48%) y un mayor porcentaje de ácido linoleico (17,12%), lo que resultó en una menor relación M/P (3,78), aunque se contó con un número limitado de muestras para esta variedad. La variedad Arbequina presentó un mayor porcentaje de ácido palmítico (14,03%), con una relación M/P de 7,66. Estos resultados confirman las diferencias en las capacidades varietales de las enzimas de la oleato desaturasa descritas por Hernández *et al.* (2021a).

El ácido linolénico merece una mención aparte, ya que mostró un comportamiento distinto al resto de ácidos grasos determinados en los aceites de la selección clonal tras el análisis de varianza (ANOVA). Fue el único ácido graso que presentó una mayor influencia de la fecha, pero menor respecto al año de cosecha. Esta observación es consistente con los hallazgos de otros estudios (Tous *et al.*, 2005; Uceda *et al.*, 2005; De la Rosa *et al.*, 2013).

Las variaciones en la composición de ácidos grasos inducidas por los factores estudiados no fueron tan grandes como para afectar a la idoneidad comercial del aceite según la legislación europea o las principales normativas comerciales en cuanto a la autenticidad (UE, 2022a; COI, 2022a; Codex Alimentarius, 2021). Otros estudios sí que han descrito no conformidades en Arbequina en aceites argentinos respecto a los ácidos grasos palmítico, oleico, linoleico y linolénico (Ceci y Carelli, 2007).

Al igual que se llevó a cabo con la composición de ácidos grasos, se realizó un análisis similar para evaluar la composición de esteroides en los aceites procedentes de la selección clonal de la variedad Empeltre y del ensayo de variedades. El procesamiento de los resultados para determinar los factores que influyen en la composición de esteroides se

ejecutó agrupando los datos por parcela de ensayo, siguiendo el enfoque metodológico descrito anteriormente.

En estudios previos se han descrito variaciones naturales en la composición de esteroides en los aceites de oliva, las cuales han sido atribuidas a diversos factores como el genotipo (Sánchez Casas *et al.*, 2004; Lukić *et al.*, 2013; Kyçyk *et al.*, 2016; Navas-López *et al.*, 2020), el ambiente (suelo, ubicación geográfica, clima, agua) (Temime *et al.*, 2007; Mailer *et al.*, 2010; Piravi-Vanak *et al.*, 2012; Noorali *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019; Navas-López *et al.*, 2020; Hamze *et al.*, 2022; Torres *et al.*, 2022), la maduración (Gutiérrez *et al.*, 1999; Salvador *et al.*, 2001; Sánchez Casas *et al.*, 2004; Sakouhi *et al.*, 2009; Mailer *et al.*, 2010) y los procesos tecnológicos (Salvador *et al.*, 2003; Guillaume *et al.*, 2012). Estas variaciones en la composición de esteroides podrían explicar, al menos parcialmente, las diferencias observadas en la pureza de los aceites de oliva de ciertas variedades en diversos países, en relación con los límites reglamentarios o normativos establecidos respecto a campesterol (Koutsaftakis *et al.*, 1999; Salvador *et al.*, 2001, 2003; Rivera del Álamo *et al.*, 2004; Ceci y Carelli, 2007; Mailer *et al.*, 2010; Guillaume *et al.*, 2012; Srigley *et al.*, 2016), β -sitosterol aparente (Rivera del Álamo *et al.*, 2004; Mailer *et al.*, 2010; Lukić *et al.*, 2013; Noorali *et al.*, 2014; Kyçyk *et al.*, 2016; Srigley *et al.*, 2016; Chtourou *et al.*, 2017; Chennit *et al.*, 2021) y Δ^7 -stigmasterol (Gracia, 2001; Tous *et al.*, 2006; Ceci, y Carelli, 2007; Gracia *et al.*, 2009; Abu-Alruz *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2012; Manai-Djebali *et al.*, 2012; Chennit *et al.*, 2021). Es importante destacar que este aspecto ha sido considerado de manera significativa en la presente Tesis Doctoral, debido a la previa documentación de incumplimientos respecto a la legislación europea y otras normativas (UE, 2022a; COI, 2022a; Codex Alimentarius, 2021) en relación a algunos esteroides presentes en los aceites de oliva de la variedad Empeltre (Gracia, 2001; Tous *et al.*, 2006; Gracia *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2012).

En contraste con la composición de ácidos grasos, donde no se observaron irregularidades en los aceites analizados, se identificaron algunas desviaciones en la composición esteroidea, aunque no en su concentración total (artículo 4.2.: Tabla 1, Tablas 3-7). De las 78 muestras analizadas de la selección clonal de Empeltre estudiada, el 28%

de los aceites presentaron valores no conformes de β -sitosterol aparente ($>93,0\%$). Además, el 12% mostraron porcentajes no conformes de $\Delta 7$ -estigmastenol ($>0,5\%$). El uso del parámetro β -sitosterol aparente, que engloba la suma de cinco esteroides (clerosterol, β -sitosterol, sitostanol, $\Delta 5$ -avenasterol y $\Delta 5,24$ -stigmastadienol), en lugar de considerar el esteroide β -sitosterol de forma individual como criterio de pureza, se debe a la falta de una base de datos confiable sobre β -sitosterol y $\Delta 5$ -avenasterol (Conte *et al.*, 2020b). En el ensayo de variedades, fue el campesterol el que presentó resultados no conformes ($>4,0\%$) en tres de los doce aceites analizados de la variedad Arbequina procedentes de aceitunas de cosecha temprana. El resto de esteroides cumplieron con los criterios estipulados en la legislación europea (UE, 2022a) y las principales normativas (COI, 2022a; Codex Alimentarius, 2021) tanto en los aceites de la selección clonal de Empeltre como en los aceites procedentes de las variedades Arbequina, Royal de Calatayud y Negral de Sabiñán.

El análisis de varianza (ANOVA) reveló que el año de cosecha fue la variable principal que presentó un impacto significativo en la composición de esteroides en la selección clonal (Tabla 2, artículo 4.2.). Este efecto se observó tanto en los esteroides regulados como en los no regulados, así como en la concentración total de esteroides. El hallazgo concuerda con otros estudios en los que también se encontraron efectos significativos de este factor en los esteroides del aceite de oliva (Salvador *et al.*, 2003; Anastasopoulos *et al.*, 2011). Aunque nuestro estudio no investigó directamente la influencia de los factores abióticos en la composición de esteroides, se evidencia claramente que estos factores ejercen un efecto significativo sobre ellos de forma análoga, como se ha discutido en el objetivo anterior, en relación a la composición de ácidos grasos. Se requieren investigaciones adicionales para comprender mejor el papel regulador de las enzimas involucradas en las rutas de biosíntesis de esteroides, ya que desempeñan un papel fundamental en las respuestas de las plantas al estrés abiótico. Aunque esta línea de estudio se ha abordado en el contexto del olivo, ha sido de manera limitada (Guillaume *et al.*, 2012; Dias *et al.*, 2021, Du *et al.*, 2022). Además, otras investigaciones han demostrado el impacto del entorno en ensayos realizados en diferentes ubicaciones geográficas con distintas características climáticas (Temime *et al.*,

2007; Abu-Alruz *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2011; Piravi-Vanak *et al.*, 2012; Noorali *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019).

Durante la campaña del año 2017, caracterizada por un otoño extremadamente seco, se obtuvieron aceites que destacaron por tener la mayor concentración de esteroides y los mayores porcentajes de los esteroides Δ^7 -estigmastanol y Δ^7 -avenasterol (artículo 4.2.: Tabla 2, Tablas 3-7). Estos resultados están de acuerdo con otros estudios previos tanto en Empeltre (Gracia, 2001) como en otras variedades (Guillaume *et al.*, 2012; Fernandes-Silva *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2019). Durante esta campaña se observó un mayor número de no conformidades debido a los niveles de Δ^7 -estigmastanol, aunque no fue el único año en el que se presentaron estas irregularidades (Figura 3, artículo 4.2.). En cuanto a la relación de la concentración de esteroides según el régimen hídrico se ha observado inconsistencia en los resultados descritos por otros autores (Berenguer *et al.*, 2006; Stefanoudaki *et al.*, 2009; Fernandes-Silva *et al.*, 2013). En esta campaña, el contenido relativo de estigmasterol fue el más bajo de las tres campañas analizadas.

En el año 2018, distinguido por ser extraordinariamente lluvioso, se observó un alto porcentaje de estigmasterol en los aceites de oliva (artículo 4.2.: Tabla 2, Tablas 3-7), siguiendo la tendencia encontrada en otros estudios que evaluaron la disponibilidad de agua en Empeltre (Romero *et al.*, 2011) y en otras variedades (Stefanoudaki *et al.*, 2009; Fernandes-Silva *et al.*, 2013). Estos resultados respaldan los hallazgos observados en relación a este esteroide durante la campaña de 2017, debido a su menor contenido en una temporada de condiciones de humedad reducida. Como se mencionó en el capítulo dedicado a la aceituna en la introducción de esta Tesis Doctoral, estudios previos han demostrado que la sobreexpresión de la enzima esteroide C22-desaturasa, que convierte el β -sitosterol en estigmasterol, conduce a un aumento significativo en los niveles de estigmasterol (Morikawa *et al.*, 2006, 2009; Arnqvist *et al.*, 2008; Gutiérrez-García *et al.*, 2021). Esta situación se dio a partir del tercer muestreo, cuando todos los clones tenían un índice de madurez alrededor de 3. Además, se obtuvieron los porcentajes más bajos de Δ^5 -avenasterol y β -sitosterol aparente, lo que resultó en no conformidades en este último parámetro. Algunos estudios también han observado una asociación entre un

mayor régimen hídrico y un menor contenido de β -sitosterol aparente, aunque no coinciden con el mayor porcentaje de estigmasterol (Guillaume *et al.*, 2012).

Se observaron los menores contenidos relativos de β -sitosterol, pero los más altos de $\Delta 5$ -avenasterol en la campaña 2019/20, aunque ninguno de estos dos esteroides tiene límites establecidos de forma individual (artículo 4.2.: Tabla 2, Tablas 3-7).

En el ensayo de variedades también se observaron diferencias significativas respecto al año de cosecha, aunque el estudio no fue tan exhaustivo debido a la alternancia de cosechas (Tabla 3, artículo 4.3.). Se pudo constatar que los aceites de Arbequina y Royal de Calatayud del año 2017 presentaron mayores contenidos relativos de campesterol, así como mayores concentraciones de esteroides totales en los aceites de Arbequina, lo cual corrobora los resultados obtenidos en la selección clonal de Empeltre. Además, los aceites de Arbequina mostraron diferencias significativas entre campañas para los esteroides β -sitosterol y $\Delta 5$ -avenasterol, con valores más bajos y más altos, respectivamente, en los aceites de la campaña 2019, al igual que los aceites de Empeltre.

El impacto de la maduración de la aceituna en la composición esteróica de los aceites obtenidos del ensayo clonal de Empeltre también fue evaluado mediante el análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 2, artículo 4.2.). Se consideraron tres estados de maduración distintos: verde, entreverado y maduro, al igual que la mayoría de estudios previos que han investigado el efecto de la maduración sobre los esteroides en el aceite (Lukić *et al.*, 2021). Aunque este factor mostró significancia en la mayoría de los esteroides, su efecto fue inferior al de la campaña de cosecha, e incluso nulo en el caso del esteroide $\Delta 7$ -estigmastenol. En cambio, en el caso de este esteroide, su efecto combinado con el año o con el clon sí resultó significativo, al igual que la interacción entre el clon y el año. Estas interacciones significativas dificultan en gran medida la comprensión de la evolución del esteroide $\Delta 7$ -estigmastenol para minimizar su contenido relativo en los aceites Empeltre. El esteroide campesterol también mostró significativas las mencionadas interacciones entre factores. La evolución de los esteroides en relación a la maduración de la aceituna ha sido discutida, al igual que la composición de ácidos grasos, en el anterior objetivo.

La influencia del factor genético, referido al clon, sobre los esteroides de los aceites de Empeltre tuvo un impacto muy leve, en la mayoría de ellos no significativo, tal como se ha observado en otros estudios de selección clonal tanto en Empeltre (Tous *et al.*, 2006; Romero *et al.*, 2012) como en Arbequina (Tous *et al.*, 2005), a excepción de los esteroides campesterol, Δ^7 -estigmastenol y Δ^7 -avenasterol. Varios estudios han informado una influencia del genotipo significativa en el contenido de campesterol (Rivera del Álamo *et al.*, 2004; Guillaume *et al.* 2012, Lukić *et al.*, 2013; Sánchez Casas *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2022). La influencia de la variedad puede reflejarse en la regulación enzimática diferencial en la biosíntesis de esteroides, donde la ruta se bifurca en dos vías diferenciadas, una hacia la síntesis de 24-etilesteroides como el β -sitosterol (incluyendo Δ^5 -avenasterol y estigmasterol) y otra hacia la formación de 24-metilesteroides como el campesterol (Bouvier-Nave *et al.*, 1997; Schaeffer *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 2022). En relación al esteroide Δ^7 -estigmastenol, se manifiesta en este caso la importancia de seleccionar cuidadosamente el clon para la producción de aceites de oliva de Empeltre con una autenticidad indiscutible. Se observaron porcentajes más bajos de este esteroide en los aceites del clon 6, mientras que los aceites de los clones Std y 2 mostraron una proporción significativamente mayor de resultados no conformes, especialmente durante el año 2017. Llama la atención que el clon 6 y el clon 2 sean los de mayor y menor contenido en campesterol, respectivamente, aunque no hubo correlación entre ambos esteroides. Ahora bien, dado que no fue posible estudiar todos los clones durante los tres años puesto que hubo alternancia en las cosechas, es necesario ser cautelosos y plantear un estudio más exhaustivo que involucre un mayor número de campañas para obtener resultados concluyentes sobre el clon con menor contenido relativo de Δ^7 -estigmastenol.

El efecto genético varietal tuvo un mayor efecto diferenciador en comparación a la influencia del clon sobre la composición de esteroides (Tabla 3, artículo 4.3.). Se observaron diferencias significativas en el contenido total de esteroides, siendo los aceites de la variedad Negral de Sabiñán los que presentaron el contenido más alto (1890 mg/kg), mientras que los de la variedad Royal de Calatayud tuvieron el contenido más bajo (1200 mg/kg). También se encontraron diferencias en los esteroides individuales, como campesterol, estigmasterol, β -sitosterol y Δ^5 -avenasterol. En el caso de la variedad

Arbequina, se observaron altos contenidos de Δ^5 -avenasterol (13,17%) y de campesterol (3,89%), en cambio, bajos de β -sitosterol (77,49%), lo cual concuerda con otros estudios previos (Rivera del Álamo *et al.*, 2004; Fernández-Cuesta *et al.*, 2013; Kyçyk *et al.*, 2016) pero no con otros autores (Ceci y Carelli, 2007; Gracia *et al.*, 2009). Como se ha comentado en el objetivo anterior, los aceites de Arbequina, en los primeros estadios de maduración de ambas campañas estudiadas, presentaron incumplimiento en la regulación de este esteroide al presentar valores ligeramente superiores a 4,0% (UE, 2022a, COI, 2022a, Codex Alimentarius, 2021). Por otro lado, la variedad Negral de Sabiñán mostró un menor porcentaje de estigmasterol (0,65%), menor Δ^5 -avenasterol (7,98%) y mayor β -sitosterol (84,04%) en comparación con las otras variedades, quizás por no haber completado el muestreo, y Royal de Calatayud mostró el mayor contenido en estigmasterol (1,27%).

Con respecto al contenido relativo de los principales esteroides que definen la composición de los aceites de la selección clonal de Empeltre estudiada (β -sitosterol: $85,58 \pm 1,54\%$; Δ^5 -avenasterol: $5,62 \pm 1,32\%$; campesterol: $3,16 \pm 0,21\%$; estigmasterol: $1,34 \pm 0,81\%$) está en consonancia con lo descrito en Empeltre en otros estudios anteriores (Gracia, 2001; Tous *et al.*, 2006; Ceci y Carelli, 2007; Gracia *et al.*, 2009; Kyçyk *et al.*, 2016) (Tabla 1, artículo 4.2.).

Los dialcoholes triterpénicos, eritrodiol y uvaol, que forman parte de la fracción insaponificable del aceite de oliva virgen, pueden experimentar variaciones en su concentración según la variedad, el medio y el grado de madurez de las aceitunas (Mailer *et al.*, 2010; Lukić *et al.*, 2013). En este objetivo de la Tesis Doctoral, se examinó la influencia de estos factores en el ensayo de variedades, aunque no se realizó un análisis estadístico conjunto para determinar el peso de cada factor en estos compuestos (Tabla 3, artículo 4.3.). Se encontraron diferencias significativas en cuanto a la variedad y la fecha de cosecha. Específicamente, los aceites de la variedad Royal de Calatayud mostraron el contenido relativo más alto de estos compuestos, alcanzando valores elevados en algunas muestras (4,35%), mientras que los aceites de Negral de Sabiñán presentaron el menor porcentaje (0,74%).

El contenido total de compuestos fenólicos desempeña un papel fundamental en la protección contra la autooxidación de los aceites de oliva (Aparicio *et al.*, 1999; Gutiérrez *et al.*, 2001), así como en su importancia nutricional y biológica (EFSA, 2011a), y son responsables de ciertas características organolépticas (Kiritsakis, 1998; Gutierrez-Rosales *et al.*, 2003; Mateos *et al.*, 2004; Servili *et al.*, 2014). El contenido fenólico en el aceite de oliva virgen depende de numerosas variables, como el genotipo, el ambiente, la tecnología de extracción y el procesado posterior del aceite (El Riachy *et al.*, 2011a; Rugini *et al.*, 2016; Miho *et al.*, 2021; Serrano *et al.*, 2021).

La concentración de fenoles en los aceites de la selección clonal de Empeltre exhibió gran variabilidad (85-987 mg ác. cafeico/kg), algo mayor a la descrita por Beltrán *et al.* (2007) en variedades como Arbequina y Hojiblanca (Tabla 2, artículo 4.1.). Esta variabilidad se atribuyó principalmente al efecto del año de cosecha, seguido de la fecha de recolección (Tabla 4, artículo 4.1.). Según se describió en la introducción, la actividad de una de las enzimas clave en la biosíntesis de los compuestos fenólicos en las aceitunas, conocida como PAL (fenilalanina amoniaco liasa), es susceptible tanto al estrés abiótico como al estado de maduración de las aceitunas (Parr y Bolwell, 2000; Ryan *et al.*, 2002). Además, se observaron otros efectos significativos relacionados con el clon y las interacciones entre el año y el clon o la fecha de cosecha, aunque su impacto fue de menor magnitud. Aun así, el clon 2 destacó respecto al resto de clones en su contenido promedio en fenoles (568 mg ác. cafeico/kg). En particular, los aceites del año 2017 mostraron la mayor concentración de polifenoles totales (590 mg ác. cafeico/kg), lo cual coincidió con un otoño más seco y un menor contenido de humedad en las aceitunas de las tres campañas analizadas (45,8%). Los años con menor acumulación de lluvia durante el período de acumulación de aceite producen aceitunas con contenidos fenólicos mayores (Rugini *et al.*, 2016; Miho *et al.*, 2021). Se han propuesto diversas hipótesis sobre la influencia del contenido de agua en la aceituna en el contenido de fenoles del aceite durante el proceso de triturado, batido de la pulpa y extracción, debido a la naturaleza hidrófila de los fenoles (Artajo *et al.*, 2006, 2007; Baccouri *et al.*, 2008; Abenoza *et al.*, 2019). Por otro lado, el contenido más bajo de compuestos fenólicos (232 mg ác. cafeico/kg) se registró en 2019, año en el que el contenido de humedad de las aceitunas no mostró

diferencias significativas con el año 2018, ambos con altas precipitaciones. Sin embargo, se observó una menor extractabilidad en el año 2019. En el ensayo de variedades, el año solo tuvo un efecto significativo en el contenido fenólico de los aceites de Arbequina, con una mayor concentración observada en el año 2019, en contraposición a lo observado en la selección clonal.

El impacto de la fecha de muestreo en los resultados se reflejó en una reducción en el contenido de polifenoles a medida que avanzaba la maduración. Los aceites obtenidos a partir de aceitunas cosechadas antes de mediados de noviembre mostraron una concentración más alta de compuestos fenólicos (500 mg ác. cafeico/kg), en comparación con los aceites obtenidos de aceitunas cosechadas después de esa fecha (306 mg ác. cafeico/kg) (Tabla 4, artículo 4.1.). Esta reducción significativa en el contenido fenólico también ha sido observada en el ensayo de variedades como se ha comentado en el anterior objetivo discutido.

El genotipo ha sido descrito por otros investigadores como la principal fuente de variabilidad en la concentración fenólica en los aceites de oliva (Miho *et al.*, 2021; Serrano *et al.*, 2021). Aunque en el ensayo de variedades no se pudo realizar un análisis estadístico conjunto de los efectos del genotipo, ambiente y maduración para determinar cuál de ellos tenía una influencia predominante, se observaron diferencias significativas entre los aceites de Arbequina (73-188 mg ác. cafeico/kg) y Royal de Calatayud (74-266 mg ác. cafeico/kg), siendo estos últimos los que presentaron un mayor contenido fenólico (Figura 4, artículo 4.3.). Referente a la concentración fenólica interanual de los aceites de Royal de Calatayud, Inglese *et al.* (2011) describieron mayor contenido total fenólico en cosechas menos productivas, pero esta circunstancia no fue observada en el ensayo de Royal de Calatayud. Por su parte, el contenido fenólico de Negral de Sabiñán osciló entre 184 y 254 mg ác. cafeico/kg en los tres muestreos realizados en octubre. Ninguna de las tres variedades alcanzó el alto contenido fenólico que se determinó en los aceites de oliva virgen de la selección clonal de Empeltre analizada.

Los factores que influyeron de manera significativa en la estabilidad oxidativa de los aceites de oliva de la selección clonal fueron principalmente la fecha de cosecha,

observándose valores de 15,5 horas en los aceites obtenidos de aceitunas cosechadas antes de mediados de noviembre y 11,5 horas en los aceites obtenidos de aceitunas cosechadas después de esa fecha, seguido del año de cosecha (Tabla 4, artículo 4.1.). El clon no presentó diferencias significativas, pero sí la interacción clon x año debido a que los clones 3 y 6 presentaron comportamientos interanuales diferentes. Aunque el año 2017 presentó la mayor concentración fenólica, no fue el único año con mayor estabilidad oxidativa. Los aceites obtenidos en 2017 y 2018 mostraron una estabilidad oxidativa similar, sin diferencias significativas (14,4 h y 14,8 h respectivamente). Es posible que, a pesar de no haber encontrado correlación entre la estabilidad oxidativa y la composición de ácidos grasos, la relación más alta de ácidos monoinsaturados/poliinsaturados (M/P) en 2018 (8,38) en comparación con 2017 (5,58) podría haber compensado el menor contenido en fenoles.

El efecto varietal sobre la estabilidad no resultó significativo al estudiar las variedades Arbequina y Royal de Calatayud en el conjunto de las dos campañas, como ocurrió con la selección clonal. A pesar de esto, al evaluar cada variedad por separado según el año, se encontraron diferencias significativas, así como una interacción significativa entre el clon y el año. Los aceites Royal de Calatayud presentaron menor estabilidad en el año 2017, a pesar de tener un mayor contenido de polifenoles, en comparación con el año 2019. Esta discrepancia podría explicarse por la correlación significativa encontrada entre la estabilidad oxidativa y el índice de peróxidos ($r_{\text{RoyaldeCalatayud}} = -0,843$; $p < 0.01$) ya que los aceites de Royal de Calatayud presentaron un mayor índice de peróxidos en 2019. Por otra parte, en 2017, esta variedad fue la de mayor estabilidad (13,0 h). Negral de Sabinán, a pesar de tener concentraciones más altas de polifenoles en sus aceites en comparación con los aceites de Arbequina en las fechas de muestreo, presentaron una menor estabilidad. La baja relación entre los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados (3,78) en la variedad Negral de Sabinán podría ser una posible causa, pero se requiere un estudio más exhaustivo para establecer hipótesis sólidas al respecto. En relación a la variabilidad anual, no se observaron diferencias significativas en la estabilidad oxidativa de los aceites de Arbequina, a diferencia de los aceites de la selección clonal. Al evaluar la posible influencia de la fecha de cosecha en

la estabilidad oxidativa, dividiendo el periodo de muestreo en cosecha temprana y cosecha tardía, al igual que la selección clonal, no se observaron diferencias significativas en los aceites del ensayo de variedades.

5.4. DIFERENCIACIÓN DE LOS ACEITES DE OLIVA VIRGEN EXTRA DE DISTINTAS ZONAS PRODUCTORAS DE ARAGÓN A TRAVÉS DE SU PERFIL LIPÍDICO E IDENTIFICAR LAS CARACTERÍSTICAS ESPECÍFICAS PARA CADA ZONA PRODUCTORA.

El objetivo de este estudio fue investigar el impacto de la variedad y el entorno en la composición química de los aceites de oliva Arbequina y Empeltre, así como su contribución a la identificación geográfica de los aceites de oliva virgen extra de Aragón e identificar características distintivas en los aceites en función de la zona oleícola aragonesa de procedencia. Los resultados generados en este objetivo se encuentran recogidos en el artículo de la sección 4.4.

Investigaciones previas han sugerido que las composiciones químicas de los aceites están parcialmente asociadas con su origen geográfico (Conte *et al.*, 2022b; Aparicio y García-González, 2013). Estudios que han analizado el entorno, ya sea en términos de ubicación o combinando la ubicación con el año de cultivo, junto con la variedad u otros factores, respaldan la importancia de la localización del olivar y de su estudio (Temime *et al.*, 2007; Abu-Alruz *et al.*, 2011; Romero *et al.*, 2011; Piravi-Vanak *et al.*, 2012; Noorali *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2019; Navas-López, 2020). El origen geográfico está estrechamente vinculado a las condiciones de suelo y clima de una región, así como a las prácticas agronómicas culturales. De hecho, es un aspecto relevante en la identidad de los aceites protegidos bajo la figura de las Denominaciones de Origen (DOP).

A diferencia de los objetivos anteriores, en los que las muestras de aceites procedían de olivares ubicados en una única localización, las muestras analizadas para este objetivo procedieron de tres zonas oleícolas distintas situadas en el sureste, noreste y oeste de Aragón. Se llevaron a cabo los ensayos en los años 2017, 2018 y 2019. La investigación fue ambiciosa ya que se analizaron un total de 260 muestras de aceites de oliva virgen extra en los tres años.

Aunque las variedades minoritarias proporcionaron un número reducido de muestras debido a su producción local limitada, se pudo caracterizar su composición fisicoquímica. Así, los aceites de las variedades Alquezrana, Royeta de Asque y Royal de Calatayud destacaron por su elevado contenido en ácido oleico y menor linoleico en comparación con las variedades caracterizadas en esta Tesis, como Empeltre, Arbequina y Negral de Sabiñán (Tabla 2, artículo 4.4.). Por lo tanto, presentaron una relación elevada de ácido oleico/linoleico, lo cual tiene implicaciones nutricionales para el sistema cardiovascular (López-Miranda *et al.*, 2010; Gaforio *et al.*, 2019). Además, se observó que la variedad Royeta de Asqué presentaba bajas concentraciones de esteroides totales debido a su bajo contenido de β -sitosterol, bajo contenido de campesterol y alto contenido en Δ^5 -avenasterol, similar a la variedad Arbequina en este último esteroide.

En este estudio, los resultados de ANOVA (Tabla 3 artículo 4.4.) revelaron la influencia significativa del ambiente de las variedades Empeltre y Arbequina (de la zona de procedencia de los aceites en primer lugar y en segundo lugar del año de producción), frente al factor genético, en los ácidos grasos oleico y linoleico. Esto difiere de los ácidos palmítico y linolénico en los que la mayor influencia fue la variedad. Ambas observaciones corroboran los resultados obtenidos en el tercer objetivo. Quizás la influencia del genotipo descrita por otros autores sea menos relevante en estas variedades debido a que presentan una composición en ácidos grasos similar (Navas-López *et al.*, 2020; Faci *et al.*, 2021). Por otro lado, los resultados obtenidos en la composición de ácidos grasos de estos aceites según el año de producción, también respaldaron lo observado en el tercer objetivo en cuanto a la influencia de la temperatura durante la maduración de las aceitunas. Se ha observado que altas temperaturas conducen a una disminución del ácido oleico y un aumento del ácido linoleico en los aceites, aunque el efecto puede variar según la variedad (Ripa *et al.*, 2008; Inglese *et al.*, 2011; Navas-López *et al.*, 2020; Mousavi *et al.*, 2019; Contreras *et al.*, 2023). El efecto significativo del ambiente observado en este estudio se atribuye a la variación de la composición en ácidos grasos debido a la interacción ubicación x variedad. Esto puede deberse, quizás, a las diferentes prácticas agronómicas culturales que se aplican según la variedad y la zona geográfica. Este es el caso de la variedad Empeltre, cuyas aceitunas

se recolectan tradicionalmente en etapas más avanzadas de maduración en el sureste de Aragón. Así, los aceites de oliva virgen extra de la zona oleícola sureste se diferencian del resto, principalmente, por su mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados y menor en ácido oleico.

En el análisis ANOVA efectuado sobre la composición esterólica de las variedades Arbequina y Empeltre se incluyeron los factores ambientales, como el año de producción y la zona de origen de los aceites, además del factor varietal (Tabla 4, artículo 4.4). Los resultados mostraron que el factor genético tuvo un claro predominio en todos los esteroides principales que componen los aceites de oliva virgen, a diferencia de lo discutido en el tercer objetivo, donde principalmente influyó el año. Este hallazgo refuerza aún más la hipótesis ya planteada sobre el alto contenido relativo de Δ^7 -estigmastenol como una característica varietal en los aceites de Empeltre. Cabe destacar que en el análisis estadístico realizado en el tercer objetivo no se compararon directamente los aceites de las variedades Arbequina y Empeltre. Las diferencias genéticas investigadas se centraron en los distintos clones de Empeltre incluidos en el estudio, las cuales suelen ser mínimas, como se demostró en los tres objetivos anteriormente discutidos. Sin embargo, en el tercer objetivo se demostró la influencia significativa del efecto genético del clon en los esteroides campesterol y Δ^7 -estigmastenol de la selección clonal de Empeltre. En este estudio, el contenido promedio de Δ^7 -estigmastenol en los aceites analizados de Empeltre fue del 0,59%, mientras que en los aceites de Arbequina fue del 0,19%. Se encontró que el 29% de las muestras de aceite de oliva virgen extra de Empeltre analizadas en este estudio presentaban contenidos relativos de Δ^7 -estigmastenol superiores al límite legislativo (0,5%) (UE, 2022a).

Otra observación que se desprende del análisis de la varianza (ANOVA) (Tabla 4, artículo 4.4), es la diferencia significativa que se observa en el caso del Δ^7 -estigmastenol, debido a la interacción combinada de los factores variedad, año y zona de procedencia de los aceites, así como la interacción entre la variedad y el año. Esto denota la complejidad de dilucidar los factores que contribuyen a la variabilidad en el contenido de este esteroide. La zona de producción del sureste de Aragón mostró el

contenido más alto de Δ^7 -estigmastenol, lo cual podría atribuirse a un clima más seco y cálido en comparación con las otras dos zonas estudiadas (Li *et al.*, 2019; Sevim *et al.*, 2022). Además, las diferencias en la pluviometría durante el otoño de 2017 (Tabla 1, artículo 4.4) también podrían ser la razón del mayor contenido de contenido en Δ^7 -estigmastenol que presentan los aceites analizados. Estos resultados coinciden con los descritos en el tercer objetivo en cuanto al Δ^7 -estigmastenol.

Respecto al resto de esteroides, se observan diferencias significativas entre ambas variedades. Los aceites de Empeltre presentan menores contenidos relativos en campesterol y Δ^5 -avenasterol, mientras que muestran mayores en estigmasterol, β -sitosterol y Δ^7 -estigmastenol, así como mayores concentraciones en esteroides totales. Estas diferencias varietales en la composición esteróica hacen que el análisis de composición de esteroides en los aceites de oliva sea utilizado como «huella dactilar» varietal.

Otro de los hallazgos en la investigación relacionada con el quinto objetivo planteado es la capacidad de diferenciación geográfica de los aceites de Empeltre en términos de su composición en ácidos grasos y esteroides, a diferencia de los aceites de Arbequina, cuya composición química no es suficientemente discriminante (Figura 2, artículo 4.4.). Específicamente, se observó que los aceites monovarietales de Empeltre procedentes del sureste de Aragón presentaban concentraciones más altas de esteroides totales y mayores contenidos relativos de ácidos grasos poliinsaturados y Δ^7 -estigmastenol, en comparación con los aceites del noreste que presentaban mayor contenido de estigmasterol (%).

En la misma línea de investigación, se incluyó una mayor diversidad varietal para evaluar la capacidad de discriminación de la zona oleícola de procedencia de las muestras basándose en la composición de ácidos grasos y esteroides. Para ello, se incorporaron aceites de variedades locales de Aragón, como Royal de Calatayud, Alquezrana y Royeta de Asque, que se comercializan tanto como monovarietales como en aceites coupage característicos de Aragón. Además, se incluyeron las variedades mayoritarias, Arbequina y Empeltre, así como otros aceites coupage conformados por

mezclas de Arbequina y Empeltre en diferentes proporciones, pero característicos de la producción de aceites de Aragón. El análisis estadístico realizado permitió clasificar correctamente, con un éxito del 91,3%, los aceites de oliva virgen extra en las tres principales zonas oleícolas de producción: sureste, oeste y noreste. Para esta clasificación se utilizaron los siguientes parámetros discriminantes: los ácidos grasos palmítico, oleico, linoleico y linolénico, así como los esteroides β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol y Δ^7 -stigmastanol, junto con la concentración total de esteroides (Figura 3, artículo 4.4.).

5.5. EVALUACIÓN DEL CUMPLIMIENTO DE LA DECLARACIÓN DE PROPIEDAD SALUDABLE REFERIDA A LOS POLIFENOLES EN LOS ACEITES DE OLIVA VIRGEN EXTRA DE VARIEDADES AUTÓCTONAS DE ARAGÓN.

La legislación europea ha reconocido la calidad nutricional de los aceites de oliva virgen, que fue respaldada en primer lugar por la opinión científica de Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). En consecuencia, se permite incluir la declaración de propiedad saludable «los polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre contra el daño oxidativo» en el etiquetado de los aceites de oliva. Su regulación se encuentra establecida en el Reglamento (UE) 432/2012, el cual especifica que el contenido de fenoles debe de ser al menos 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados (por ejemplo, complejo de oleuropeína o tirosol) por cada 20 g de aceite de oliva.

Hasta la publicación de una nueva revisión del método T.20/Doc. No 29 por parte del COI en 2022 (COI, 2022b), no se dispuso de un método oficial o normativo adecuado al propósito de la declaración de propiedad saludable referida al contenido fenólico de los aceites de oliva. Durante este tiempo, diversas líneas de investigación se dedicaron a abordar los desafíos planteados por las metodologías existentes (Mulinacci *et al.*, 2006; Mastralexi *et al.*, 2014a, 2014b; Purcaro *et al.*, 2014; Romero y Brenes, 2012, 2014; Reboredo-Rodríguez *et al.*, 2016; Tsimidou *et al.*, 2018). Un ejemplo notable es el método publicado y ampliamente aceptado por la comunidad científica, desarrollado por Tsimidou y colaboradores (2019a, 2019b). Este método permite la determinación conjunta de hidroxitirosol (Htir) y tirosol (Tir), mediante la hidrólisis ácida de las formas ligadas, lo cual genera las formas libres correspondientes. El contenido total de fenoles se expresa en miligramos del contenido total en Htir+Tir/20 g de aceite y se determina mediante UHPLC-DAD. Mientras, el ensayo colorimétrico Folin-Ciocalteu ha sido uno

de los métodos analíticos tradicionalmente empleados para el análisis del contenido total de fenoles.

En el marco de esta Tesis Doctoral, la cual aborda distintos objetivos relacionados con el análisis del contenido fenólico, se optó por utilizar inicialmente el ensayo colorimétrico como medida provisional hasta la publicación de un método oficial o normativo adecuado para el propósito de la declaración de propiedad saludable. Para tal fin, y para la consecución del presente objetivo, los aceites de oliva virgen obtenidos a partir de los dos ensayos de la Finca Experimental, fueron sometidos a un análisis posterior utilizando el método validado por Tsimidou *et al.* (2019a, 2019b), pero con una modificación en cuanto al gradiente cromatográfico para su adaptación a HPLC-DAD. Este método analítico fue reconocido como el más adecuado y aceptado por la comunidad científica para la evaluación del cumplimiento de la declaración de propiedad saludable durante el periodo anterior a la publicación del método normativo COI (Tsimidou, 2022).

La gran mayoría de los aceites de la selección clonal de Empeltre que fueron analizados presentaron contenidos fenólicos superiores a 5 mg de total Htir+Tir/20 g de aceite, cumpliendo con los requisitos establecidos en la declaración de propiedad saludable referida al contenido fenólico según el Reglamento (UE) 432/2012. Es importante destacar que los aceites de la campaña 2017/18 ($n = 24$), como se discutió previamente en los objetivos 2 y 3, mostraron los mayores contenidos fenólicos en comparación con las demás campañas, superando ampliamente el contenido mínimo exigido. Sin embargo, hubo dos muestras de aceite que procedían de aceitunas recolectadas en la misma fecha de muestreo, el 13 de diciembre de 2017, que no alcanzaron el contenido mínimo exigido. Estas muestras se recolectaron después de un período de heladas en la zona de cultivo, lo cual pudo haber influido en los resultados. En cuanto a los aceites de la campaña 2018/19 ($n = 24$), aunque su contenido fenólico fue más moderado, superaron el valor mínimo de 5 mg de total Htir+Tir/20 g de aceite la mayoría de los aceites. Así fue en todos los muestreos de los clones 2, 6 y Std, excepto en el último realizado el 11 de diciembre de 2018. Aunque, los aceites del clon 3, no

alcanzaron el mínimo requerido a partir de mediados de noviembre ya que el contenido fenólico disminuyó más rápidamente durante la maduración. Por otro lado, los aceites de la campaña 2019/20, con excepción del clon Std cuyos aceites cumplieron con el mínimo contenido requerido durante todo el muestreo, presentaron niveles bajos de compuestos fenólicos, alcanzando el contenido mínimo solo durante la primera quincena del mes de octubre.

A diferencia del cumplimiento del contenido mínimo en fenoles para la declaración de propiedad saludable por parte de la mayoría de los aceites de la selección clonal de Empeltre, la gran mayoría de los aceites del ensayo de variedades no lograron alcanzar dicho contenido. Específicamente, ninguno de los doce aceites de oliva virgen extra de la variedad Arbequina analizados, y obtenidos de aceitunas muestreadas en las mismas fechas que las aceitunas de Empeltre durante los años 2017 y 2019, cumplieron con el contenido fenólico mínimo requerido debido a su bajo contenido. Sin embargo, los aceites de la variedad Royal de Calatayud correspondientes a la primera quincena de octubre de 2017 sí alcanzaron el contenido fenólico mínimo de 5 mg de total Htir+Tir/20 g de aceite. No obstante, se requiere un mayor número de muestreos para llegar a una conclusión sólida en el caso de 2019. Lo mismo ocurre con la variedad Negral de Sabiñán. Ambas variedades presentan mayores contenidos fenólicos, basados en el total de Htir y Tir, en comparación con la variedad Arbequina, pero se necesita un estudio más exhaustivo para poder corroborarlo con fiabilidad.

En relación a la metodología utilizada, a pesar de que en el momento de redacción de esta Tesis Doctoral ya existe un método normativo adecuado para el propósito de la declaración de propiedad saludable referida al contenido fenólico en los aceites de oliva virgen (COI, 2022b), los dos métodos empleados en este estudio se consideran válidos para el análisis de los aceites de oliva virgen extra. Se han encontrado diferencias significativas entre ambos métodos cuando los aceites presentaron contenidos fenólicos superiores al mínimo requerido por la declaración, es decir, 5 mg/20 g de aceite. En estos casos, los resultados obtenidos mediante el ensayo Folin-Ciocalteu tendieron a subestimar los niveles fenólicos en los aceites con altos

contenidos. Por otro lado, ambos métodos arrojaron resultados comparables para el análisis de los aceites con contenidos fenólicos inferiores a 5 mg/20 g de aceite. Este hallazgo sugiere la posible utilidad del método colorimétrico Folin-Ciocalteu como una técnica de cribado inicial debido a su rapidez y menor coste en comparación con el método de hidrólisis-UHPLC-DAD.

6. CONCLUSIONES

- I. Con el fin de establecer un periodo de cosecha óptima para obtener aceites de oliva virgen extra de alta calidad, sin pérdida significativa en el rendimiento graso, se sugiere realizar un seguimiento de la evolución del rendimiento graso sobre seco (GSS). En las variedades de aceitunas estudiadas, se recomienda realizar la cosecha al inicio de la ventana temporal, que suele ser a mediados del mes de noviembre.
- II. La clasificación en la categoría «extra» de los aceites de oliva virgen, según sus características fisicoquímicas, es independiente de los factores agronómicos (influencia del ambiente, genética o maduración) en las condiciones de este estudio, siempre que se lleven a cabo buenas prácticas en el cultivo y recolección de la aceituna y en la elaboración y conservación del aceite de oliva virgen.
- III. La maduración de las aceitunas de las variedades Empeltre, Arbequina y Royal de Calatayud influye en el perfil lipídico de los aceites de oliva virgen extra. En general, se observa una disminución de los ácidos grasos palmítico, esteárico y linolénico, y un aumento en el linoleico. Respecto a la composición de esteroides, β -sitosterol y estigmasterol aumentan mientras que Δ^5 -avenasterol y campesterol disminuyen. El contenido de fenoles y la estabilidad oxidativa de los aceites también disminuye con la maduración.
- IV. El efecto ambiental (conjunto de factores abióticos del entorno de cultivo) ejerce una influencia significativamente mayor en las aceitunas de las variedades Empeltre, Arbequina y Royal de Calatayud, así como en los ácidos grasos oleico y linoleico, y en el contenido fenólico de sus aceites en comparación con la variedad o clon específico y la fecha de cosecha.
- V. Los aceites de oliva virgen extra de la variedad Empeltre obtenidos en años con temperaturas elevadas presentan menor contenido en ácido oleico pero mayor en ácidos grasos poliinsaturados. Si ha habido sequía extrema durante el otoño, se observa mayor contenido de fenoles, ácido linoleico, esteroides totales y

Δ^7 -estigmastenol y menor relación entre ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados. El estigmasterol aumenta y disminuyen los esteroides Δ^5 -avenasterol y β -sitosterol en otoños lluviosos. Los aceites de oliva virgen extra de la variedad Arbequina presentan mayor cantidad de ácido linoleico en otoños lluviosos, mientras que en otoños secos aumenta el campesterol y de esteroides totales.

- VI.** El efecto varietal presenta la mayor influencia sobre la composición esteroidea de los aceites de oliva virgen extra de las variedades Arbequina y Empeltre. La variabilidad genética que podría aportar el clon en la selección clonal de Empeltre solo influye en los esteroides campesterol y Δ^7 -estigmastenol. El factor del año predomina sobre el resto de esteroides en la selección clonal de Empeltre.
- VII.** Entre las variedades de aceitunas autóctonas de Aragón estudiadas, los aceites de Royal de Calatayud, Alquezrana y Royeta de Asqué presentan la mayor relación entre los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados. Los aceites de la variedad Negral de Sabiñán tienen el perfil de ácidos grasos menos favorable, con bajo contenido de ácido oleico y alto de ácido linoleico, poca estabilidad a la oxidación, pero alto rendimiento graso. Los aceites de la variedad Empeltre destacan en rendimiento graso y contenido fenólico, y, por tanto, en estabilidad.
- VIII.** Los aceites de oliva de la variedad Empeltre presentan altos contenidos de Δ^7 -estigmastenol, lo que implican incumplimientos o desviaciones en las características de pureza reglamentadas o normativas. Esta problemática también se observa en los aceites tempranos de la variedad Arbequina debido a su contenido elevado en campesterol. La influencia del factor genético en ambos esteroides es más importante que el factor año de cosecha, por lo que sus contenidos elevados son una característica varietal que no debería afectar a la verificación de la pureza de estos aceites de oliva.

- IX.** La composición de ácidos grasos y de esteroides tiene capacidad discriminadora para identificar y clasificar, según su origen, los aceites de oliva virgen extra de las tres principales zonas productoras de Aragón. Los aceites del sureste tienen menor contenido en ácido oleico y mayor en ácidos grasos poliinsaturados, esteroides totales y Δ^7 -estigmastenol. Los aceites del noreste presentan menor contenido en esteroides totales y Δ^7 -estigmastenol, pero mayor en campesterol, estigmasterol y Δ^5 -avenasterol. Estos aceites, junto con los producidos en la zona oeste, poseen la mejor relación de ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados.
- X.** En general, y en las condiciones de este trabajo, los aceites de oliva virgen extra de la variedad Empeltre y los de la variedad Royal de Calatayud de cosecha temprana, por su contenido fenólico, podrían incluir en su etiquetado la declaración de propiedad saludable «los polifenoles del aceite de oliva contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre frente al daño oxidativo».

7. ANEXO

Tabla 7.1. Características de la aceituna de la selección clonal de Empeltre.

Clon	Año	Fecha muestreo	IM	Peso fruto (g)	GSM (%)	HUM (%)	GSS (%)	Extractabilidad (%)
Clon 2 (C-2)	2017	04-oct	2,4	2,5	22,3 ± 0,0	51,7 ± 0,2	46,3 ± 0,2	68
		18-oct	3,2	2,7	23,4 ± 0,1	49,3 ± 0,3	46,1 ± 0,4	67
		07-nov	4,0	2,3	29,4 ± 0,2	40,8 ± 0,1	49,7 ± 0,4	70
		22-nov	5,1	2,7	29,9 ± 0,7	38,9 ± 0,1	48,9 ± 1,1	74
		29-nov	5,5	2,7	29,9 ± 0,4	38,1 ± 0,1	48,3 ± 0,7	77
		13-dic	6,1	2,5	33,2 ± 0,2	38,5 ± 0,1	54,0 ± 0,4	66
	2018	01-oct	1,1	1,5	12,4 ± 0,1	56,5 ± 1,1	28,6 ± 0,8	56
		15-oct	1,7	1,8	15,8 ± 0,4	58,3 ± 0,6	37,9 ± 0,8	37
		28-oct	2,7	2,1	16,1 ± 0,0	61,2 ± 1,8	41,4 ± 1,8	38
		11-nov	2,9	2,0	17,6 ± 0,3	59,5 ± 0,4	43,5 ± 0,6	36
		25-nov	3,6	2,0	18,6 ± 0,1	56,6 ± 0,2	42,9 ± 0,4	41
		11-dic	4,2	1,8	21,8 ± 0,3	50,3 ± 0,3	43,7 ± 0,6	55
	2019	04-oct	1,7	1,9	19,4 ± 0,3	52,2 ± 0,5	40,6 ± 0,9	59
		18-oct	2,0	1,9	19,2 ± 0,2	52,3 ± 0,5	40,4 ± 0,2	50
		07-nov	3,5	2,8	23,6 ± 0,3	41,8 ± 0,3	40,6 ± 0,3	69
		22-nov	4,9	2,6	25,5 ± 0,4	43,5 ± 0,2	45,2 ± 0,4	65
		29-nov	4,9	2,1	26,3 ± 0,2	43,7 ± 0,2	46,8 ± 0,2	60
		13-dic	5,3	1,9	26,9 ± 0,4	39,4 ± 0,3	44,4 ± 0,4	72
		01-oct	1,5	2,0	15,1 ± 0,1	56,7 ± 0,4	34,8 ± 0,1	48
		15-oct	2,7	2,2	18,1 ± 0,2	57,9 ± 0,3	43,1 ± 0,2	46
		28-oct	3,3	2,6	17,6 ± 0,2	59,8 ± 0,3	43,8 ± 0,2	29
		11-nov	3,9	2,6	19,2 ± 0,1	58,4 ± 0,3	46,2 ± 0,1	40
		25-nov	4,4	2,5	19,4 ± 0,2	57,3 ± 0,2	45,5 ± 0,2	42
		11-dic	4,8	2,1	23,1 ± 0,3	53,6 ± 0,5	49,9 ± 0,3	43

Tabla 4.3. Continuación.

Clon	Año	Fecha muestreo	IM	P fruto (g)	GSM (%)	HUM (%)	GSS (%)	Extractabilidad (%)
Clon 6 (C-6)	2017	04-oct	0,6	1,3	16,7 ± 0,1	53,3 ± 0,4	35,6 ± 0,2	57
		18-oct	1,2	1,6	17,5 ± 0,3	53,9 ± 0,2	38,1 ± 0,6	40
		07-nov	3,7	1,3	24,1 ± 0,2	41,2 ± 0,4	41,0 ± 0,6	61
		22-nov	3,9	1,5	20,5 ± 0,1	49,2 ± 0,0	45,6 ± 0,7	42
		29-nov	4,4	1,4	20,7 ± 0,3	48,2 ± 0,4	40,0 ± 0,8	40
		13-dic	5,3	1,2	23,8 ± 0,2	43,3 ± 0,6	41,9 ± 0,7	48
	2018	01-oct	0,8	1,7	14,2 ± 0,3	58,2 ± 0,1	34,0 ± 0,6	45
		15-oct	1,8	1,8	15,8 ± 0,2	59,0 ± 1,7	38,6 ± 2,1	42
		28-oct	2,7	2,0	16,2 ± 0,2	61,5 ± 0,7	42,2 ± 1,2	32
		11-nov	2,9	2,0	15,9 ± 0,1	60,5 ± 0,6	40,3 ± 0,9	29
		25-nov	3,7	2,0	16,7 ± 0,4	56,2 ± 0,8	38,2 ± 0,5	36
		11-dic	3,9	1,8	22,1 ± 0,0	53,2 ± 0,5	47,2 ± 0,6	42
	2019	01-oct	2,0	3,1	13,9 ± 0,3	61,6 ± 0,7	36,3 ± 0,6	45
		15-oct	2,8	3,3	15,7 ± 0,1	60,9 ± 1,3	40,1 ± 1,7	28
		28-oct	3,4	3,5	15,6 ± 0,4	62,3 ± 0,7	41,5 ± 0,3	31
		11-nov	3,9	3,6	16,5 ± 0,3	62,2 ± 0,6	43,5 ± 0,6	25
		25-nov	4,4	3,6	16,0 ± 0,2	61,8 ± 0,6	41,8 ± 1,1	-
		09-dic	5,0	3,3	19,1 ± 0,1	56,1 ± 0,4	43,6 ± 0,3	37
Clon Std (C-Std)	2017	04-oct	1,6	2,0	18,0 ± 0,3	55,2 ± 0,6	40,2 ± 1,2	62
		18-oct	3,4	2,9	20,3 ± 0,2	53,5 ± 0,5	43,6 ± 0,8	48
		07-nov	4,0	1,6	25,3 ± 0,2	43,3 ± 0,5	44,6 ± 0,7	67
		22-nov	4,1	2,4	24,7 ± 0,3	45,9 ± 0,3	45,6 ± 0,7	55
		29-nov	4,5	2,3	26,0 ± 0,1	43,8 ± 0,3	46,3 ± 0,3	61
		13-dic	5,4	2,2	28,2 ± 0,1	39,2 ± 0,2	46,3 ± 0,2	67
	2018	01-oct	1,1	1,9	12,8 ± 0,2	58,5 ± 0,5	30,8 ± 0,7	53
		15-oct	2,0	2,2	16,2 ± 0,1	59,5 ± 0,5	40,0 ± 0,5	43
		28-oct	2,8	2,1	16,1 ± 0,2	61,3 ± 0,2	41,5 ± 0,8	39
		11-nov	3,3	2,4	17,8 ± 0,2	59,1 ± 0,5	43,5 ± 0,8	38
		25-nov	3,3	2,1	17,5 ± 0,2	58,8 ± 0,7	42,5 ± 1,1	47
		11-dic	4,0	1,9	20,2 ± 0,2	53,4 ± 0,3	43,4 ± 0,7	45
	2019	01-oct	2,0	3,4	14,7 ± 0,1	58,4 ± 0,5	35,4 ± 0,5	62
		15-oct	3,0	3,4	16,9 ± 0,2	57,0 ± 0,9	39,3 ± 1,2	54
		28-oct	3,6	3,7	18,5 ± 0,2	57,8 ± 0,6	43,8 ± 1,0	48
		11-nov	4,4	4,1	19,6 ± 0,1	56,6 ± 0,6	45,1 ± 0,7	44
		25-nov	4,7	3,8	19,2 ± 0,3	54,9 ± 0,4	42,5 ± 0,8	46
		09-dic	5,9	4,0	21,6 ± 0,3	51,4 ± 0,2	44,4 ± 0,6	57

Tabla 7.2. Parámetros fisicoquímicos de calidad de los AOVE de la selección clonal de Empeltre.

Clon	Año	Fecha muestreo	Acidez (% ác. oleico)	Índ. peróxidos (meqO ₂ /kg)	K ₂₇₀	K ₂₃₂
Clon 2 (C-2)	2017	04-oct	0,18 ± 0,01	8,11 ± 0,28	0,171 ± 0,001	2,05 ± 0,01
		18-oct	0,17 ± 0,00	6,35 ± 0,07	0,152 ± 0,000	1,95 ± 0,05
		07-nov	0,16 ± 0,00	4,58 ± 0,10	0,117 ± 0,001	1,77 ± 0,03
		22-nov	0,15 ± 0,00	4,95 ± 0,14	0,117 ± 0,000	1,83 ± 0,01
		29-nov	0,18 ± 0,01	4,33 ± 0,23	0,113 ± 0,000	1,71 ± 0,02
		13-dic	0,15 ± 0,00	5,45 ± 0,02	0,079 ± 0,000	1,69 ± 0,04
	2018	01-oct	0,20 ± 0,01	5,21 ± 0,02	0,159 ± 0,003	1,82 ± 0,03
		15-oct	0,20 ± 0,01	4,54 ± 0,02	0,135 ± 0,000	1,77 ± 0,03
		28-oct	0,16 ± 0,00	3,62 ± 0,29	0,121 ± 0,000	1,65 ± 0,02
		11-nov	0,19 ± 0,01	3,64 ± 0,08	0,124 ± 0,001	1,56 ± 0,03
		25-nov	0,20 ± 0,01	3,59 ± 0,01	0,121 ± 0,000	1,49 ± 0,04
		11-dic	0,21 ± 0,01	2,88 ± 0,04	0,099 ± 0,001	1,54 ± 0,01
Clon 3 (C-3)	2017	04-oct	0,14 ± 0,00	9,00 ± 0,02	0,146 ± 0,000	1,98 ± 0,02
		18-oct	0,17 ± 0,00	4,41 ± 0,12	0,156 ± 0,000	2,01 ± 0,02
		07-nov	0,18 ± 0,01	2,72 ± 0,01	0,153 ± 0,001	1,80 ± 0,02
		22-nov	0,13 ± 0,00	6,77 ± 0,17	0,114 ± 0,003	1,70 ± 0,06
		29-nov	0,15 ± 0,00	5,07 ± 0,13	0,115 ± 0,000	1,80 ± 0,01
		13-dic	0,15 ± 0,00	8,99 ± 0,01	0,086 ± 0,000	1,65 ± 0,01
	2018	01-oct	0,20 ± 0,01	8,46 ± 0,08	0,136 ± 0,002	1,80 ± 0,01
		15-oct	0,17 ± 0,00	8,98 ± 0,50	0,113 ± 0,002	1,71 ± 0,05
		28-oct	0,19 ± 0,01	7,07 ± 0,07	0,111 ± 0,000	1,50 ± 0,05
		11-nov	0,26 ± 0,01	7,82 ± 0,10	0,113 ± 0,000	1,56 ± 0,01
		25-nov	0,23 ± 0,01	5,44 ± 0,06	0,089 ± 0,003	1,43 ± 0,02
		11-dic	0,17 ± 0,00	4,34 ± 0,14	0,074 ± 0,003	1,38 ± 0,01
	2019	01-oct	0,10 ± 0,00	8,51 ± 0,09	0,098 ± 0,000	1,64 ± 0,00
		15-oct	0,09 ± 0,00	10,71 ± 0,23	0,089 ± 0,001	1,57 ± 0,04
		28-oct	0,09 ± 0,00	8,05 ± 0,01	0,083 ± 0,001	1,59 ± 0,02
		11-nov	0,11 ± 0,00	8,23 ± 0,05	0,077 ± 0,001	1,48 ± 0,01
		25-nov	0,10 ± 0,00	7,47 ± 0,01	0,069 ± 0,000	1,55 ± 0,02
		09-dic	0,09 ± 0,00	7,49 ± 0,03	0,065 ± 0,000	1,51 ± 0,01

Tabla 4.4. (Continuación).

Clon	Año	Fecha muestreo	Acidez (% ác. oleico)	Índ. peróxidos (meqO ₂ /kg)	K ₂₇₀	K ₂₃₂
Clon 6 (C-6)	2017	04-oct	0,14 ± 0,00	8,84 ± 0,01	0,147 ± 0,000	1,81 ± 0,18
		18-oct	0,13 ± 0,00	7,97 ± 0,02	0,135 ± 0,003	1,69 ± 0,02
		07-nov	0,13 ± 0,00	6,38 ± 0,05	0,122 ± 0,002	1,65 ± 0,03
		22-nov	0,12 ± 0,00	2,66 ± 0,05	0,115 ± 0,000	1,54 ± 0,00
		29-nov	0,11 ± 0,00	2,16 ± 0,00	0,097 ± 0,000	1,43 ± 0,03
		13-dic	0,20 ± 0,01	4,78 ± 0,02	0,073 ± 0,000	1,59 ± 0,04
	2018	01-oct	0,15 ± 0,001	5,87 ± 0,16	0,123 ± 0,000	1,73 ± 0,02
		15-oct	0,12 ± 0,00	5,28 ± 0,17	0,110 ± 0,001	1,64 ± 0,03
		28-oct	0,15 ± 0,00	3,83 ± 0,09	0,105 ± 0,000	1,53 ± 0,03
		11-nov	0,18 ± 0,00	3,57 ± 0,08	0,116 ± 0,001	1,54 ± 0,01
		25-nov	0,22 ± 0,00	3,05 ± 0,04	0,109 ± 0,002	1,48 ± 0,03
		11-dic	0,22 ± 0,00	3,36 ± 0,08	0,097 ± 0,001	1,42 ± 0,01
	2019	01-oct	0,07 ± 0,00	8,57 ± 0,02	0,115 ± 0,000	1,78 ± 0,03
		15-oct	0,11 ± 0,00	7,99 ± 0,10	0,106 ± 0,000	1,77 ± 0,03
		28-oct	0,11 ± 0,00	4,36 ± 0,07	0,083 ± 0,000	1,62 ± 0,01
		11-nov	0,11 ± 0,00	2,68 ± 0,02	0,072 ± 0,000	1,58 ± 0,01
		25-nov	0,17 ± 0,00	5,41 ± 0,02	0,075 ± 0,001	1,87 ± 0,03
		09-dic	0,13 ± 0,00	4,25 ± 0,11	0,068 ± 0,000	1,64 ± 0,01
Clon Std (C-Std)	2017	04-oct	0,15 ± 0,00	10,54 ± 0,05	0,144 ± 0,003	1,92 ± 0,01
		18-oct	0,14 ± 0,00	10,71 ± 0,20	0,132 ± 0,001	1,79 ± 0,02
		07-nov	0,15 ± 0,00	6,59 ± 0,25	0,115 ± 0,001	1,73 ± 0,00
		22-nov	0,15 ± 0,00	5,95 ± 0,17	0,107 ± 0,002	1,56 ± 0,05
		29-nov	0,17 ± 0,00	6,02 ± 0,14	0,101 ± 0,001	1,58 ± 0,05
		13-dic	0,18 ± 0,01	7,14 ± 0,10	0,072 ± 0,000	1,62 ± 0,02
	2018	01-oct	0,15 ± 0,00	5,84 ± 0,23	0,140 ± 0,001	1,72 ± 0,01
		15-oct	0,14 ± 0,00	7,55 ± 0,23	0,128 ± 0,000	1,84 ± 0,04
		28-oct	0,14 ± 0,00	4,64 ± 0,05	0,110 ± 0,001	1,64 ± 0,01
		11-nov	0,14 ± 0,00	5,51 ± 0,14	0,105 ± 0,001	1,45 ± 0,01
		25-nov	0,19 ± 0,01	4,13 ± 0,02	0,107 ± 0,001	1,47 ± 0,02
		11-dic	0,19 ± 0,01	4,41 ± 0,05	0,103 ± 0,001	1,49 ± 0,02
	2019	01-oct	0,16 ± 0,00	9,49 ± 0,12	0,153 ± 0,001	2,08 ± 0,02
		15-oct	0,10 ± 0,00	12,46 ± 0,18	0,119 ± 0,000	1,98 ± 0,01
		28-oct	0,12 ± 0,00	12,56 ± 0,18	0,119 ± 0,001	2,05 ± 0,02
		11-nov	0,18 ± 0,01	11,47 ± 0,11	0,101 ± 0,001	1,80 ± 0,01
		25-nov	0,17 ± 0,00	11,13 ± 0,25	0,103 ± 0,001	1,87 ± 0,03
		09-dic	0,11 ± 0,00	14,50 ± 0,03	0,093 ± 0,001	1,94 ± 0,05

Tabla 7.3. Principales ácidos grasos en los AOVE de la selección clonal de Empeltre.

Clon	Año	Fecha muestreo	C16:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)	C18:3 (%)	M/P
Clon 2 (C-2)	2017	04-oct	14,89 ± 0,06	68,83 ± 0,01	11,12 ± 0,04	0,85 ± 0,00	5,91 ± 0,02
		18-oct	14,84 ± 0,06	67,44 ± 0,01	12,56 ± 0,06	0,83 ± 0,01	5,18 ± 0,03
		07-nov	14,33 ± 0,06	65,79 ± 0,02	14,89 ± 0,03	0,81 ± 0,01	4,31 ± 0,01
		22-nov	13,98 ± 0,03	65,42 ± 0,03	15,65 ± 0,04	0,79 ± 0,00	4,09 ± 0,01
		29-nov	13,66 ± 0,06	66,44 ± 0,06	14,99 ± 0,00	0,73 ± 0,00	4,33 ± 0,01
		13-dic	13,62 ± 0,10	66,48 ± 0,08	14,98 ± 0,01	0,73 ± 0,00	4,35 ± 0,00
	2018	01-oct	14,81 ± 0,02	72,03 ± 0,03	7,78 ± 0,01	0,97 ± 0,00	8,45 ± 0,01
		15-oct	14,58 ± 0,14	72,11 ± 0,06	8,05 ± 0,05	0,85 ± 0,01	8,32 ± 0,04
		28-oct	14,27 ± 0,21	72,81 ± 0,15	7,78 ± 0,02	0,78 ± 0,00	8,74 ± 0,01
		11-nov	13,34 ± 0,04	73,97 ± 0,07	7,61 ± 0,02	0,76 ± 0,01	9,07 ± 0,04
		25-nov	13,01 ± 0,02	74,50 ± 0,01	7,54 ± 0,00	0,72 ± 0,00	9,25 ± 0,01
		11-dic	11,75 ± 0,09	75,12 ± 0,08	8,15 ± 0,01	0,74 ± 0,00	8,68 ± 0,01
	2019	04-oct	14,30 ± 0,01	70,51 ± 0,04	9,95 ± 0,05	0,93 ± 0,00	6,65 ± 0,03
		18-oct	13,47 ± 0,06	71,60 ± 0,05	9,73 ± 0,01	0,87 ± 0,00	6,91 ± 0,00
		07-nov	12,97 ± 0,02	71,46 ± 0,02	10,48 ± 0,02	0,80 ± 0,00	6,47 ± 0,01
		22-nov	13,77 ± 0,04	68,58 ± 0,03	12,69 ± 0,01	0,79 ± 0,00	5,23 ± 0,00
		29-nov	13,43 ± 0,11	69,31 ± 0,07	12,29 ± 0,02	0,77 ± 0,01	5,44 ± 0,01
		13-dic	13,27 ± 0,03	69,04 ± 0,01	12,83 ± 0,01	0,76 ± 0,00	5,21 ± 0,00
		01-oct	15,81 ± 0,01	70,48 ± 0,01	8,50 ± 0,02	0,95 ± 0,00	7,67 ± 0,01
		15-oct	15,54 ± 0,00	70,30 ± 0,00	9,01 ± 0,01	0,84 ± 0,00	7,35 ± 0,02
		28-oct	15,10 ± 0,01	70,75 ± 0,00	9,02 ± 0,01	0,80 ± 0,00	7,42 ± 0,01
		11-nov	14,67 ± 0,01	70,66 ± 0,01	9,59 ± 0,01	0,81 ± 0,00	7,00 ± 0,01
		25-nov	16,39 ± 0,64	70,24 ± 0,54	8,58 ± 0,08	0,73 ± 0,00	7,76 ± 0,01
		11-dic	16,99 ± 0,06	70,57 ± 0,05	7,80 ± 0,01	0,67 ± 0,00	8,56 ± 0,00
Clon 3 (C-3)	2018	01-oct	15,94 ± 0,06	70,53 ± 0,01	8,29 ± 0,06	0,93 ± 0,00	7,88 ± 0,05
		15-oct	15,65 ± 0,00	68,81 ± 0,00	10,23 ± 0,00	0,88 ± 0,00	6,40 ± 0,00
		28-oct	15,39 ± 0,01	68,82 ± 0,01	10,64 ± 0,00	0,83 ± 0,00	6,20 ± 0,00
		11-nov	15,21 ± 0,01	68,51 ± 0,04	11,14 ± 0,01	0,82 ± 0,00	5,92 ± 0,01
		25-nov	14,58 ± 0,10	69,72 ± 0,11	10,78 ± 0,00	0,77 ± 0,00	6,22 ± 0,01
		09-dic	14,17 ± 0,06	69,91 ± 0,05	11,08 ± 0,00	0,76 ± 0,00	6,08 ± 0,00

Tabla 4.5. Continuación.

Clon	Año	Fecha muestreo	C16:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)	C18:3 (%)	M/P
Clon 6 (C-6)	2017	04-oct	12,99 ± 0,06	71,84 ± 0,21	9,54 ± 0,00	0,97 ± 0,01	6,98 ± 0,01
		18-oct	12,95 ± 0,06	71,33 ± 0,08	10,36 ± 0,04	0,90 ± 0,01	6,48 ± 0,01
		07-nov	12,62 ± 0,06	70,65 ± 0,03	11,50 ± 0,01	0,83 ± 0,00	5,86 ± 0,00
		22-nov	12,70 ± 0,06	69,51 ± 0,04	12,56 ± 0,05	0,84 ± 0,00	5,30 ± 0,02
		29-nov	12,28 ± 0,06	70,13 ± 0,11	12,50 ± 0,04	0,83 ± 0,02	5,38 ± 0,02
		13-dic	11,91 ± 0,06	71,11 ± 0,07	12,07 ± 0,00	0,76 ± 0,01	5,66 ± 0,01
	2018	01-oct	14,98 ± 0,06	71,50 ± 0,04	8,23 ± 0,00	0,95 ± 0,00	8,00 ± 0,00
		15-oct	14,49 ± 0,06	72,27 ± 0,03	8,08 ± 0,01	0,83 ± 0,00	8,32 ± 0,00
		28-oct	14,17 ± 0,06	72,64 ± 0,06	8,10 ± 0,01	0,78 ± 0,00	8,40 ± 0,00
		11-nov	13,26 ± 0,06	74,04 ± 0,01	7,65 ± 0,01	0,79 ± 0,00	8,99 ± 0,00
		25-nov	11,57 ± 0,06	75,74 ± 0,02	7,70 ± 0,00	0,76 ± 0,00	9,17 ± 0,00
		11-dic	11,70 ± 0,06	75,43 ± 0,03	7,95 ± 0,00	0,77 ± 0,03	8,85 ± 0,04
	2019	01-oct	16,57 ± 0,06	67,87 ± 0,01	9,95 ± 0,01	1,01 ± 0,00	6,43 ± 0,00
		15-oct	15,76 ± 0,06	67,13 ± 0,04	11,40 ± 0,02	0,96 ± 0,00	5,65 ± 0,01
		28-oct	14,44 ± 0,06	68,59 ± 0,19	11,27 ± 0,06	0,93 ± 0,01	5,85 ± 0,01
		11-nov	15,14 ± 0,06	68,99 ± 0,00	10,38 ± 0,01	0,84 ± 0,00	6,39 ± 0,00
		25-nov	15,49 ± 0,06	67,86 ± 0,06	11,17 ± 0,02	0,86 ± 0,00	5,86 ± 0,01
		09-dic	14,77 ± 0,06	67,29 ± 0,10	12,45 ± 0,02	0,91 ± 0,00	5,24 ± 0,00
Clon Std (C-Std)	2017	04-oct	14,19 ± 0,06	71,38 ± 0,06	9,23 ± 0,05	0,84 ± 0,01	7,27 ± 0,05
		18-oct	14,70 ± 0,06	69,29 ± 0,01	10,90 ± 0,01	0,82 ± 0,00	6,07 ± 0,01
		07-nov	13,74 ± 0,06	70,15 ± 0,27	11,06 ± 0,19	0,77 ± 0,01	6,08 ± 0,12
		22-nov	13,54 ± 0,06	69,76 ± 0,01	11,68 ± 0,02	0,76 ± 0,01	5,75 ± 0,01
		29-nov	13,46 ± 0,06	69,49 ± 0,01	12,03 ± 0,02	0,74 ± 0,00	5,58 ± 0,01
		13-dic	13,16 ± 0,06	70,53 ± 0,02	11,39 ± 0,00	0,70 ± 0,00	5,97 ± 0,00
	2018	01-oct	15,06 ± 0,06	71,97 ± 0,23	7,99 ± 0,06	0,90 ± 0,03	8,30 ± 0,00
		15-oct	14,94 ± 0,06	71,60 ± 0,04	8,52 ± 0,03	0,80 ± 0,01	7,89 ± 0,01
		28-oct	14,22 ± 0,06	72,66 ± 0,08	8,19 ± 0,00	0,78 ± 0,03	8,31 ± 0,01
		11-nov	13,76 ± 0,06	73,44 ± 0,06	7,96 ± 0,01	0,74 ± 0,00	8,66 ± 0,03
		25-nov	13,05 ± 0,06	75,05 ± 0,01	7,20 ± 0,02	0,71 ± 0,00	9,73 ± 0,00
		11-dic	12,49 ± 0,06	75,39 ± 0,06	7,46 ± 0,01	0,70 ± 0,01	9,45 ± 0,00
	2019	01-oct	15,61 ± 0,06	71,46 ± 0,02	7,82 ± 0,01	0,89 ± 0,01	8,46 ± 0,01
		15-oct	15,75 ± 0,06	69,78 ± 0,13	9,25 ± 0,01	0,82 ± 0,00	7,17 ± 0,01
		28-oct	15,38 ± 0,06	68,88 ± 0,04	10,61 ± 0,01	0,80 ± 0,00	6,25 ± 0,00
		11-nov	14,94 ± 0,06	68,52 ± 0,01	11,53 ± 0,01	0,80 ± 0,01	5,74 ± 0,01
		25-nov	14,80 ± 0,06	68,30 ± 0,19	11,86 ± 0,02	0,82 ± 0,00	5,57 ± 0,00
		09-dic	14,41 ± 0,06	68,18 ± 0,05	12,47 ± 0,00	0,80 ± 0,00	5,30 ± 0,00

8. REFERENCIAS

- Abenoza, M., Benito, M., Oria, R., Sánchez-Gimeno, A.C. (2015a).** Effect of low-temperature storage under optimal conditions on olive oil quality and its nutritional parameters. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 92, 243-251.
- Abenoza, M., Lasa Dolhagaray, J.M., Benito, M., Oria, R., Sánchez-Gimeno, A.C. (2015b).** The evolution of Arbequina olive oil quality during ripening in a commercial super-high-density orchard in north-east Spain. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 92(2), 83-92.
- 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.
- Abu-Alruz, K., Afaneh, I.A., Quasem, J.M., Hmidat, M.A., Abbady, J., Mazahreh, A.S. (2011).** Factors affecting Δ^7 -stigmastenol in Palestinian olive oil. *Journal of Applied Sciences*, 11, 797-805.
- Alessandri, S., Ieri, F., Romani, A. (2014).** Minor polar compounds in extra virgin olive oil: Correlation between HPLC-DAD-MS and the Folin-Ciocalteu spectrophotometric method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(4), 826-835.
- Allouche, Y., Jiménez, A., Uceda, M., Aguilera, M.P., Gaforio, J.J., Beltrán, G. (2009).** Triterpenic content and chemometric analysis of virgin olive oils from forty olive cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(9), 3604-3610.
- Amiot, M.J., Fleuriot, A., Macheix, J.J. (1989).** Accumulation of oleuropein derivatives during maturation. *Phytochemistry*, 28, 67-69.
- Anastasopoulos, E., Kalogeropoulos, N., Kaliora, A.C., Kountouri, A., Andrikopoulos, N.K. (2011).** The influence of ripening and crop year on quality indices, polyphenols, terpenic acids, squalene, fatty acid profile, and sterols in virgin

- olive oil (Koroneiki cv.) produced by organic versus non-organic cultivation method. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 170-178.
- Angerosa, F., Di Giacinto, L., Basti, C., Serraiocco, A. (1996).** Influenza della variabile ambiente sulla composizione degli oli vergini di oliva. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 73(10), 461-467.
- 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.
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., Montedoro, G.F. (2004).** Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, 1054, 17-31.
- Aparicio, R., García-González, D.L. (2013).** Olive oil Characterization and Traceability. En: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*. Aparicio, R., Harwood, J. Ed. Springer. Nueva York, (Estados Unidos) pp. 431-478.
- Aparicio, R., Harwood, J. (2013).** *Handbook of Olive Oil - Analysis and Properties*. Ed. Springer. Nueva York, (Estados Unidos).
- Aparicio, R., Luna, G. (2002).** Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 614-627.
- Aparicio, R., Morales, M.T., Aparicio-Ruiz, R., Tena, N., García-González, D.L. (2013).** Authenticity of olive oil: Mapping and comparing official methods and promising alternatives. *Food Research International*, 54(2), 2025-2038.
- Aparicio, R., Roda, L., Albi, M.A., Gutiérrez, F. (1999).** Effect of various parameters on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4150-4155.
- Ardid, G. (1646).** *Restauo de la Agricultura y destierro del ocio*. Zaragoza, sin año de edición, en folio 46 páginas.

- Arnqvist, L., Persson, M., Jonsson, L. Dutta, P.C., Sitbon, F. (2008).** Overexpression of CYP710A1 and CYP710A4 in transgenic Arabidopsis plants increases the level of stigmasterol at the expense of sitosterol. *Planta*, 227, 309-317.
- Artajo, L.S., Romero, M.P., Motilva, M.J. (2006).** Transfer of phenolic compounds during olive oil extraction in relation to ripening stage of the fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 518-527.
- Artajo, L.S., Romero, M.P., Suárez, M., Motilva, M.J. (2007).** Partition of phenolic compounds during the virgin olive oil industrial extraction process. *European Food Research and Technology A*, 225, 617-625.
- AS (2011).** Norma australiana para el aceite de oliva y aceite de orujo de oliva. AS 5264-2011.
- Atlas Climático Digital de Aragón.** Departamento de Medio Ambiente. Gobierno de Aragón. Disponible online: <https://opengis.grumets.cat/wms/aragon/index.htm> (acceso: 17 de mayo de 2023).
- Baccouri, O., Guerfel, M., Baccouri, B., Cerretani, L., Bendini, A., Lercker, G., Zarrouk, M., Daoud, D. (2008).** Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chemistry*, 109, 743-754.
- Badía, D. (2021).** iARASOL, programa interactivo para el estudio y clasificación de suelos de Aragón. Disponible online: <http://www.suelosdearagon.com/> (acceso: 8 de mayo de 2023).
- Bajoub, A., Hurtado-Fernández, E., Ajal, E.A, Fernández-Gutiérrez, A., Carrasco-Pancorbo, A., Ouazzani, N. (2015).** Quality and chemical profiles of monovarietal north Moroccan olive oils from “picholine Marocaine” cultivar: Registration database development and geographical discrimination. *Food Chemistry*, 179, 127-136.

- Banilas, G., Karampelias, M., Makariti, I., Kourti, A., Hatzopoulos, P. (2011).** The olive DGAT2 gene is developmentally regulated and shares overlapping but distinct expression patterns with DGAT1. *Journal of Experimental Botany*, 62, 521-532.
- Banilas, G., Moressis, A., Nikoloudakis, N., Hatzopoulos, P. (2005).** Spatial and temporal expressions of two distinct oleate desaturases from olive (*Olea europaea* L.). *Plant Science*, 168(2), 547-555.
- Banilas, G., Nikiforiadis, A., Makariti, I., Moressis, A., Hatzopoulos, P. (2007).** Discrete roles of a microsomal linoleate desaturase gene in olive identified by spatiotemporal transcriptional analysis. *Tree Physiology*, 27, 481-490.
- Barranco, D. (2008).** Variedades y patrones. En: *El cultivo del olivo*. Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. Ed. Junta de Andalucía y MundiPrensa. Sevilla, (España) pp.63-92.
- Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. (2008).** *El cultivo del olivo*. Ed. Junta de Andalucía y MundiPrensa. Sevilla, (España).
- Barranco, D., Trujillo, I., Rallo, L. (2005).** Elaiografía Hispánica. En: *Variedades de olivo en España*. Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J.M., del Río, M.C., Martín, A., Tous, J., Trujillo, I. Ed. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones MundiPrensa. Madrid, (España) pp. 17-40.
- Bartolini, G. (2008).** Olive Germplasm (*Olea europaea* L.): Cultivars, Synonyms, Cultivation Area, Collections, Descriptors. Sesto Fiorentino: Istituto per la Valorizzazione del Legno e delle Specie Arboree (IVALSA), Trees and Timber Institute. Disponible online: <http://www.oleadb.it> (acceso: 29 de enero de 2023).
- Belaj, A., Díez, C.M., Baldoni, L., Satovic, Z., Barranco, D. (2010).** Genetic diversity and relationships of wild and cultivated olives at regional level in Spain. *Scientia Horticulturae*, 124(3), 323-330.
- Belaj, A., Ninot, A., Gómez-Gálvez, F.J., El Riachy, M., Gurbuz-Veral, M., Torres, M., Lazaj, A., Klepo, T., Paz, S., Ugarte, J., Baldoni, L., Lorite, I.J., Šatović, Z., de la Rosa, R. (2022).** Utility of EST-SNP Markers for Improving Management and Use

- of Olive Genetic Resources: A Case Study at the Worldwide Olive Germplasm Bank of Córdoba. *Plants*, 11(7), 921.
- Beltrán, G., Aguilera, M.P., Allouche, Y., Jiménez, A. (2010).** Efectos de la molienda del fruto sobre el rendimiento industrial del proceso y la calidad del aceite. *Vida rural*, 318, 28-31.
- Beltrán, G., del Río, C., Sánchez, S., Martínez, L. (2004a).** Seasonal changes in olive fruit characteristics and oil accumulation during ripening process. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84(13), 1783-1790.
- Beltrán, G., del Río, C., Sánchez, S., Martínez, L. (2004b).** Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from cv picual. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3434-3440.
- Beltrán, G., Hueso, A., Bejaoui, M.A., Gila, A.M., Costales, R., Sánchez-Ortiz, A., Aguilera, M.P., Jimenez, A. (2021).** How olive washing and storage affect fruit ethanol and virgin olive oil ethanol, ethyl esters and composition. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(9), 3714-3722.
- Beltrán, G., Ruano, M.T., Jiménez, A., Uceda, M., Aguilera, M.P. (2007).** Evaluation of virgin olive oil bitterness by total phenol content analysis. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(3), 193-197.
- Beltrán, G., Uceda, M., Hermoso, M., Frías, L. (2008).** Maduración. En: *El cultivo del olivo*. Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. Ed. Junta de Andalucía y MundiPrensa. Sevilla, (España) pp. 163-188.
- Benito, M., Abenoza, M., Oria, R., Sánchez-Gimeno, A.C. (2012a).** Physico-chemical, nutritional and sensory characterization of Verdeña, Verdilla and Royal varieties olive oil. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 89, 319-325.
- Benito, M., Lasa, J.M., Gracia, P., Oria, R., Abenoza, M., Sánchez-Gimeno, A.C. (2012b).** Evolution of phenols and pigments in extra virgin olive oil from irrigated super-intensive orchard. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114(5), 558-567.

- 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. *HortScience*, 41, 427-432.
- Besnard, G., Rubio de Casas, R. (2016).** Single vs multiple independent olive domestications: the jury is (still) out. *New Phytologist*, 209, 466-470.
- Besnard, G., Terral, J.F., Cornille, A. (2018).** On the origins and domestication of the olive: a review and perspectives. *Annals of Botany*, 121(3), 385-403.
- BOA (2009).** Boletín Oficial de Aragón. Orden de 17 de marzo de 2009, del Consejero de Agricultura y Alimentación, por la que se aprueba la normativa específica de la denominación de origen protegida «Aceite del Bajo Aragón». *Boletín Oficial de Aragón*, 70, 8445-8469.
- BOA (2010).** Boletín Oficial de Aragón. Orden de 19 de julio de 2010, del Consejero de Agricultura y Alimentación, por la que se aprueba la normativa específica de la denominación de origen protegida «Aceite Sierra del Moncayo», y se concede la protección transitoria. *Boletín Oficial de Aragón*, 173, 20804-20830.
- BOA (2023).** Resolución de 23 de diciembre de 2022, de la Dirección General de Innovación y Promoción Agroalimentaria, por la que se da publicidad a la solicitud de registro de la denominación de origen protegida «Aceite del Somontano». *Boletín Oficial de Aragón*, 3, 939.
- BOE (2015).** Boletín Oficial del Estado. 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. *Boletín Oficial de España*, 179, 64243-64249.

- 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., Blekas, G., Tsimidou, M. (2015a).** Olive oil composition. En: *Olive Oil: Chemistry and Technology*. Boskou, D. Ed. AOCS Press. Champaign, (Illinois) pp. 41-72.
- Boskou, D., Tsimidou, M., Blekas, G. (2015b).** Polar Phenolic Compounds. En: *Olive Oil: Chemistry and Technology*. Boskou, D. Ed. AOCS Press. Champaign, (Illinois) pp. 73-92.
- Bouvier-Nave, P., Husselstein, T., Desprez, T., Benveniste, P. (1997).** Identification of cDNAs encoding sterol methyl-transferases involved in the second methylation step of plant sterol biosynthesis. *European Journal of Biochemistry*, 246, 518-529.
- Brenes, M., García, A., García, P., Garrido, A. (2001).** Acid hydrolysis of secoiridoid aglycons during storage of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5609-5614.
- Buxó, R. (2005).** L'agricultura d'època Romana: Estudis Arqueobotànics i Evolució dels Cultius a Catalunya. *Cota Zero*, 20, 108-120.
- Caponio, F., Gomes, T., Summo, C., Pasqualone, A. (2003).** Influence of the type of olive-crusher used on the quality of extra virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 105(5), 201-206.
- Cassagne, C., Lessire, R., Bessoule, J.J., Moreau, P., Creach, A., Schneider, F., Sturbois, B. (1994).** Biosynthesis of very long chain fatty acids in higher plants. *Progress in lipid research*, 33(1-2), 55-69.
- 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 and Technology*, 43(2), 277-235.

- Cecchi, L., Migliorini, M., Mulinacci, N. (2021).** Virgin olive oil volatile compounds: Composition, sensory characteristics, analytical approaches, quality control, and authentication. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(7), 2013-2040.
- Ceci, L.N., Carelli, A.A. (2007).** Characterization of monovarietal Argentinian olive oils from new productive zones. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 84(12), 1125-1136.
- CEE (1991).** Comunidad Económica Europea. Reglamento n° 2568/91 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. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L 248, 1-83.
- Chennit, B., Pérez-Camino, M.C., Gómez-Coca, R.B., Moreda, W., Boudriche, L., Madani, K. (2021).** Characterization of Kabylia virgin olive oils according to fatty alcohols, waxes, and fatty acid alkyl esters. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 15, 4960-4971.
- Chtourou, F., Jabeur, H., Lazzez, A., Bouaziz, M. (2017).** Characterization and discrimination of Oueslati virgin olive oils from adult and young trees in different ripening stages using sterols, pigments, and alcohols in tandem with chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 3512-3522.
- Civantos, L. (1999).** *Obtención del aceite de oliva virgen*. Ed. Agrícola Española, S.A. Madrid, (España).
- Civantos, L. (2008).** La olivicultura en el mundo y en España. En: *El cultivo del olivo*. Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. Ed. Junta de Andalucía y MundiPrensa. Sevilla, (España) pp.19-35.
- Codex Alimentarius (2021).** Norma para los aceites de oliva y aceites de orujo de oliva, Codex stan 33-1981. Codex Alimentarius Commission: Roma, (Italia). Adoptada en 1981. Revisada en 1989, 2003, 2015, 2017. Corregida en 2009, 2013, 2021.
- COI (2017).** Consejo Oleícola Internacional. Determinación de biofenoles en aceites de oliva por HPLC. T.20/Doc. No 29/Rev. 1.

- COI (2018).** Consejo Oleícola Internacional. Análisis sensorial de los aceites de oliva. Método para la evaluación organoléptica de los aceites de oliva vírgenes. T.20/Doc. No 15/Rev. 10.
- COI (2022a).** Consejo Oleícola Internacional. Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva. T.15/NC No 3/Rev. 19.
- COI (2022b).** Consejo Oleícola Internacional. Documento para declarar el uso de los métodos del COI para la determinación de compuestos fenólicos. T.20/Doc. No 29/Rev. 2.
- COI (2023a).** Consejo Oleícola Internacional. Unidad de asuntos económicos y producción. Estadísticas. Disponible online: <https://www.internationaloliveoil.org/what-we-do/economic-affairs-promotion-unit/> (acceso: 18 de febrero de 2023).
- COI (2023b).** Consejo Oleícola Internacional. Métodos y normas de evaluación organoléptica. Disponible online: <https://www.internationaloliveoil.org/que-hacemos/unidad-de-quimica-y-normalizacion/normas-coi-metodos-y-guias/?lang=es> (acceso: 3 de julio de 2023).
- Connor, D.J., Fereres, E. (2010).** The Physiology of Adaptation and Yield Expression in Olive. *Horticultural Reviews*, 31, 155-229.
- Conte, L. (2020a).** The Chemistry of Olive Oil: An endless story. *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 27(28), 1-15.
- 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. (2020b).** 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 and Technology*, 105, 483-493.
- Contreras, C., Mariotti, R., Mousavi, S., Baldoni, L., Guerrero, C., Roka, L., Cultrera, N., Pierantozzi, P., Maestri, D., Gentili, L., Tivani, M., Torres, M. (2020).** Characterization and validation of olive FAD and SAD gene families: expression

- analysis in different tissues and during fruit development. *Molecular Biology Reports*, 47, 4345-4355.
- Contreras, C., Pierantozzi, P., Maestri, D., Tivani, M., Searles, P., Brizuela, M., Fernández, F., Toro, A., Puertas, C., Trentacoste, E.R., Kiessling, J., Mariotti, R., Baldoni, L., Mousavi, S., Fernandez, P., Moschen, S., Torres, M. (2023).** How Temperatures May Affect the Synthesis of Fatty Acids during Olive Fruit Ripening: Genes at Work in the Field. *Plants*, 12(1), 54.
- 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, 358-366.
- Dag, C., Demirtas, I., Ozdemir, I., Bekiroglu, S., Ertas, E. (2015).** Biochemical Characterization of Turkish Extra Virgin Olive Oils from Six Different Olive Varieties of Identical Growing Conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(9), 1349-1356.
- Dahlqvist, A., Stahl, U., Lenman, M., Banas, A., Lee, M., Sandager, L., Ronne, H., Stymne, S. (2000).** Phospholipid:diacylglycerol acyltransferase: An enzyme that catalyzes the acyl-CoA-independent formation of triacylglycerol in yeast and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6487-6492.
- Damtoft, S., Franzyk, H., Jensen, S.R. (1993).** Biosynthesis of secoiridoid glucosides in Oleaceae. *Phytochemistry*, 34, 1291-1299.
- Daskalaki, D., Kefi, G., Fotsiou, K., Tasioula-Margari, M. (2009).** Evaluation of phenolic compounds degradation in virgin olive oil during storage and heating. *Journal of Food Nutricional Research*, 48, 31-41.
- De Asso, I.J. (1798).** *Historia de la economía política de Aragón*. Ed. Francisco Magallón. Zaragoza, (España).

- De la Rosa, R., Talhaoui, N., Rouis, H., Velasco, L., León, L. (2013).** Fruit characteristics and fatty acid composition in advanced olive breeding selections along the ripening period. *Food Research International*, 54(2), 1890-1896.
- De Megino, A. (1804).** *El aceite*. Ed. MAXTOR. Venecia (Italia). Disponible online: https://www.google.es/books/edition/El_aceite/VoeKcseKrvAC?hl=es&gbpv=1 (acceso: 13 de marzo de 2023).
- Deiana, P., Santona, M., Dettori, S., Culeddu, N., Dore, A., Molinu, M.G. (2019).** Multivariate approach to assess the chemical composition of Italian virgin olive oils as a function of variety and harvest period. *Food Chemistry*, 300, 125243.
- Di Giovacchino, L. (2013).** Technological aspects. En: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*. Harwood, J., Aparicio, R. Ed. Springer, Nueva York, (Estados Unidos) pp. 57-96.
- Di Giovacchino, L., Costantini, N., Ferrante, M.L., Serraiocco, A. (2002a).** Influence of malaxation time of olive paste on oil extraction yields and chemical and organoleptic characteristics of virgin olive oil obtained by a centrifugal decanter at water saving. *Grasas y Aceites*, 53, 179-186.
- Di Giovacchino, L., Sestili, S., Di Vincenzo, D. (2002b).** Influence of olive processing on virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 587-601.
- Dias, M.C., Pinto, D.C.G.A., Figueiredo, C., Santos, C., Silva, A.M.S. (2021).** Phenolic and lipophilic metabolite adjustments in *Olea europaea* (olive) trees during drought stress and recovery. *Phytochemistry*, 185, 112695.
- Díez, C.M., Trujillo, I., Barrio, E., Belaj, A., Barranco, D., Rallo, L. (2011).** Centennial olive trees as a reservoir of genetic diversity. *Annals of Botany*, 108(5), 797-807.
- Diez, C.M., Trujillo, I., Martinez-Urdiroz, N., Barranco, D., Rallo, L., Marfil, P., Gaut, B.S. (2015).** Olive domestication and diversification in the Mediterranean Basin. *New Phytologist*, 206(1), 436-447.

- Du, Y., Fu, X., Chu, Y., Wu, P., Liu, Y., Ma, L., Tian, H., Zhu, B. (2022).** Biosynthesis and the Roles of Plant Sterols in Development and Stress Responses. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2332.
- EFSA (2011a).** Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1639), maintenance of normal blood pressure (ID 3781), “anti-inflammatory properties” (ID 1882), “contributes to the upper respiratory tract health” (ID 3468), “can help to maintain a normal function of gastrointestinal tract” (3779), and “contributes to body defences against external agents” (ID 3467) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9(4), 2033.
- EFSA (2011b).** Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to oleic acid intended to replace saturated fatty acids (SFAs) in foods or diets and maintenance of normal blood LDL-cholesterol concentrations (ID 673, 728, 729, 1302, 4334) and maintenance of normal (fasting) blood concentrations of triglycerides (ID 673, 4334) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal*, 9(4), 2043.
- El Bakkali, A., Essalouh, L., Tollon, C., Rivallan, R., Mournet, P., Moukhli, A., Zaher, H., Mekkaoui, A., Hadidou, A., Sikaoui, L., Khadari, B. (2019).** Characterization of Worldwide Olive Germplasm Banks of Marrakech (Morocco) and Córdoba (Spain): Towards management and use of olive germplasm in breeding programs. *PLoS One*, 14(10), e0223716.
- El Riachy, M., Priego-Capote, F., León, L., Rallo, L., Luque de Castro, M.D. (2011a).** Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 1: Hydrophilic phenols: A key factor for virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(6), 678-691.

- El Riachy, M., Priego-Capote, F., León, L., Rallo, L., Luque de Castro, M.D. (2011b).** Hydrophilic antioxidants of virgin olive oil. Part 2: Biosynthesis and biotransformation of phenolic compounds in virgin olive oil as affected by agronomic and processing factors. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 113(6), 692-707.
- Espada, J.L., Abós, F., Gracia, M.S. (2009).** *Variedades de olivo cultivadas en el Somontano de Barbastro y características de sus aceites*. Informaciones Técnicas. Centro Transferencia Agroalimentaria. Gobierno de Aragón, 212.
- Faci, M., Hedjal, M., Douzane, M., Sevim, D., Köseoğlu, O., Tamendjari, A. (2021).** Locations Effects on the Quality of Chemlal and Azeradj Olives Grown in Algeria. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 98(5), 551-566.
- FAO (2010).** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. *The Second Report on the State of the World's Plant Genetic Resources For Food and Agriculture (SoWPGR-2)*. Ed. FAO. Roma, (Italia).
- FAO (2020).** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAOSTAT. Datos sobre alimentación y agricultura. Disponible online: <https://www.fao.org/faostat/es/#data> (acceso: 28 de enero de 2023).
- FAO (2021).** Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. FAOSTAT. Datos sobre alimentación y agricultura. Disponible online: <https://www.fao.org/faostat/es/#data> (acceso: 28 de enero de 2023).
- Fernandes-Silva, A.A., Gouveia, J.B., Vasconcelos, P., Ferreira, T.C., Villalobos, F.J. (2013).** Effect of different irrigation regimes on the quality attributes of monovarietal virgin olive oil from cv. "cobrançosa". *Grasas y Aceites*, 64, 41-49.
- Fernández Díez, M.J. (1971).** The olive. En: *The Biochemistry of Fruits and their Products*. Vol. 2. Hulme, A.C. Ed. Academic Press. Londres, (Reino Unido) pp. 255-279.
- Fernández i Martí, A., Font i Forcada, C., Socías i Company, R., Rubio-Cabetas, M.J. (2015).** Genetic relationships and population structure of local olive tree

- accessions from Northeastern Spain revealed by SSR markers. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37(1).
- Fernández-Cuesta, A., León, L., Velasco, L., de la Rosa, R. (2013).** Changes in squalene and sterols associated with olive maturation. *Food Research International*, 54(2), 1885-1889.
- Frías, L., Garia-Ortiz, A., Hermoso, M., Jiménez, A., Llavero, M.P., Morales, J., Ruano, T., Uceda, M. (1991).** *Analistas de laboratorio de almazara*. Colección: Apuntes, 6/91. Ed. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. Sevilla, (España).
- 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, 2575-2581.
- Gaforio, J.J., Visioli, F., Alarcón-de-la-Lastra, C., Castañer, O., Delgado-Rodríguez, M., Fitó, M., Hernández, A.F., Huertas, J.R., Martínez-González, M.A.; Menéndez, J.A., et al. (2019).** Virgin Olive Oil and Health: Summary of the III International Conference on Virgin Olive Oil and Health Consensus Report, JAEN (Spain) 2018. *Nutrients*, 11(9), 2039.
- García, J.M., Mancha, M. (1992).** Evolution of the lipids biosynthesis during the maturation of the olive varieties "Picual" and "Gordal." *Grasas y Aceites*, 43(5), 277-280.
- García-González, D.L., Luna, G., Morales, M.T., Aparicio, R. (2009).** Stepwise geographical traceability of virgin olive oils by chemical profiles using artificial neural network models. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111, 1003-1013.
- García-González, D.L., Tena, N., Romero, I., Aparicio-Ruiz, R., Morales, M.T., Aparicio, R. (2017).** A study of the differences between trade standards inside and outside Europe. *Grasas y Aceites*, 68(3), e210.

- García-Inza, G.P., Hall, A.J., Rousseaux, M.C. (2018).** Proportion of oleic acid in olive oil as influenced by the dimensions of the daily temperature oscillation. *Scientia Horticulturae*, 227, 305-312.
- Gila, A., Aguilera, M.P., Sánchez-Ortíz, A., Jiménez, A., Beltrán, G. (2022).** Effect of centrifugal force (G) on stability of natural emulsions (water/oil) present in fresh virgin olive oils. *Journal of Food Engineering*, 334, 111169.
- Gobierno de Aragón (2023a).** Dirección General de Desarrollo Rural. Avances de macromagnitudes del sector agrario en Aragón. Disponible online: <https://www.aragon.es/-/macroeconomia-agraria> (acceso: 23 de febrero de 2023).
- Gobierno de Aragón (2023b).** Grupos de cooperación de agentes del sector agrario. Disponible online: <https://www.aragon.es/-/grupos-de-cooperacion-y-operativos-en-tecnologia-agroalimentaria> (acceso: 13 de marzo de 2023).
- Gobierno de Aragón (2023c).** Estadísticas agrarias de Aragón. Disponible online: <https://www.aragon.es/-/estadisticas-agrarias> (acceso: 13 de marzo de 2023).
- Gobierno de Aragón (2023d).** Denominaciones de Origen Protegidas. Disponible online: <https://www.aragon.es/-/denominaciones-de-origen-protegidas> (acceso: 18 de marzo de 2023).
- Gómez-Alonso, S., Mancebo-Campos, V., Salvador, M.D., Fregapane, G. (2007).** Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature. *Food Chemistry*, 100, 36-42.
- Gómez-Coca, R., Fernandes, G.D., Pérez-Camino, M. del C., Moreda, W. (2016).** Fatty acid ethyl esters (FAEE) in extra virgin olive oil: A case study of a quality parameter. *LWT-Food Science and Technology*, 66, 378-383.
- Gómez-Coca, R., Pérez-Camino, M.C., Martínez-Rivas, J.M., Bendini, A., Gallina Toschi, T., Moreda, W. (2020).** Olive oil mixtures. Part one: Decisional trees or how to verify the olive oil percentage in declared blends. *Food Chemistry*, 315, 126235.

- Goren-Inbar, N., Feibel, C.S, Verosub, K.L., Melamed, Y., Kislev, M.E., Tchernov, E., Saragusti, I. (2000).** Pleistocene milestones on the out-of-Africa corridor at Gesher Benot Ya'akov, Israel. *Science*, 289, 944-947.
- Gracia, M.S. (2001).** Composición química de distintas calidades de aceites de oliva virgen de la variedad «Empeltre» en el Bajo Aragón. *Grasas y Aceites*, 52, 52-58.
- Gracia, M.S., Marco, P. (2010).** *Efecto del momento de la recolección en la calidad del aceite de la variedad Empeltre en el Bajo Aragón*. Ed. Diputación General, Departamento de Agricultura y Alimentación, Dirección General de Desarrollo rural, Servicio de Programas Rurales, Zaragoza, (España).
- Gracia, M.S., Royo, A., Guillen, M. (2009).** Composición química de aceites de las variedades Arbequina y Empeltre cultivadas en regadío. *Grasas y Aceites*, 60, 321-329.
- Green, P.S. (2002).** A Revision of *Olea* L. (*Oleaceae*). *Kew Bulletin*, 57(1), 91-140.
- Guillaume, C., Ravetti, L., Ray, D.L., Johnson, J. (2012).** Technological factors affecting sterols in Australian olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(1), 29-39.
- Gutfinger, T. (1981).** Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58, 966-968.
- Gutiérrez, F. (1989).** Determinación de la estabilidad oxidativa de aceites de oliva vírgenes: comparación entre el método del oxígeno activo (A.O.M) y el método Rancimat. *Grasas y Aceites*, 40, 1-5.
- Gutiérrez, F., Arnaud, T., Garrido, A. (2001).** Contribution of polyphenols to the oxidative stability of virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(15), 1463-1470.
- Gutiérrez, F., Jiménez, B., Ruiz, 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, 121-127.

- Gutiérrez, F., Varona, I., Albi, M.A. (2000).** Relation of acidity and sensory quality with sterol content of olive oil from stored fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1106-1110.
- Gutiérrez-García, L., Arró, M., Altabella, T., Ferrer, A., Boronat, A. (2021).** Structural and functional analysis of tomato sterol C22 desaturase. *BMC Plant Biololgy*, 21, 141.
- Gutiérrez-Rosales, F., Ríos, J.J., Gómez-Rey, M.L. (2003).** Main polyphenols in the bitter taste of virgin olive oil. Structural confirmation by on-line high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(20), 6021-6025.
- Hamze, L., Miserere, A., Molina, M.S., Maestri, D., Searles, P.S., Rousseaux, M.C. (2021).** Influence of environmental growth temperature on tocopherol and sterol oil concentrations in olive fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 102(7), 2741-2749.
- Haralampidis, K., Milioni, D., Sánchez, J., Baltrusch, M., Heinz, E., Hatzopoulos, P. (1998).** Temporal and transient expression of stearyl-ACP carrier protein desaturase gene during olive fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 49, 1661-1669.
- Harwood, J.L. (1996).** Recent advances in the biosynthesis of plant fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1301(1-2), 7-56.
- Hermoso, M., Uceda, M., García, A., Morales, B., Frías, M.L., Fernández, A. (1991).** *Elaboración de Aceite de Oliva de Calidad*. Colección: Apuntes, 5/91. Ed. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía. Sevilla, (España).
- Hernández, M.L., Mancha, M., Martínez-Rivas, J.M. (2005).** Molecular cloning and characterization of genes encoding two microsomal oleate desaturases (FAD2) from olive. *Phytochemistry*, 66, 1417-1426.
- Hernández, M.L., Moretti, S., Sicardo, M.D., García, Ú., Pérez, A., Sebastiani, L., Martínez-Rivas, J.M. (2021a).** Distinct physiological roles of three

- phospholipid:diacylglycerol acyltransferase genes in olive fruit with respect to oil accumulation and the response to abiotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 12, 1-16.
- Hernández, M.L., Padilla, M.N., Mancha, M., Martínez-Rivas, J.M. (2009).** Expression analysis identifies FAD2-2 as the olive oleate desaturase gene mainly responsible for the linoleic acid content in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 6199-6206.
- Hernández, M.L., Padilla, M.N., Sicardo, M.D., Mancha, M., Martínez-Rivas, J.M. (2011).** Effect of different environmental stresses on the expression of oleate desaturase genes and fatty acid composition in olive fruit. *Phytochemistry*, 72, 178-187.
- Hernández, M.L., Sicardo, M.D., Martínez-Rivas, J.M. (2016).** Differential contribution of endoplasmic reticulum and chloroplast w-3 fatty acid desaturase genes to the linolenic acid content of olive (*Olea europaea*) fruit. *Plant Cell Physiology*, 57, 138-151.
- Hernández, M.L., Sicardo, M.D., Arjona, P.M., Martínez-Rivas, J.M. (2020).** Specialized functions of olive FAD2 gene family members related to fruit development and the abiotic stress response. *Plant Cell Physiology*, 61, 427-441.
- Hernández, M.L., Sicardo, M.D., Belaj, A., Martínez-Rivas, J.M. (2021b).** The Oleic/Linoleic Acid Ratio in Olive (*Olea europaea* L.) Fruit Mesocarp Is Mainly Controlled by OeFAD2-2 and OeFAD2-5 Genes Together With the Different Specificity of Extraplastidial Acyltransferase Enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 12, 653997.
- 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.
- Holvoet, P., Mertens, A., Verhamme, P., Bogaerts, K., Beyens, G., Verhaeghe, R., ..., Van de Werf, F. (2001).** Circulating oxidized LDL is a useful marker for

- identifying patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 21(5), 844-848.
- Hrnčirik, K., Fritsche, S. (2004).** Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(8), 540-549.
- 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.
- 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, 671-677.
- Inês, C., Corbacho, J., Paredes, M.A., Labrador, J., Cordeiro, A.M., Gomez-Jimenez, M.C. (2019).** Regulation of sterol content and biosynthetic gene expression during flower opening and early fruit development in olive. *Physiologia Plantarum*, 167, 526-539.
- Inglese, P., Famiani, F., Galvano, F., Servili, M., Esposto, S., Urbani, S. (2011).** Factors Affecting Extra-Virgin Olive Oil Composition. *Horticultural Reviews*, 38, 83-147.
- ISO (2016).** International Organization for Standardization. Grasas y aceites animales y vegetales--Determinación de la estabilidad oxidativa (prueba de oxidación acelerada). Norma ISO 6886:2016.
- ISO (2017).** International Organization for Standardization. Requisitos generales para la competencia de los laboratorios de ensayo y calibración. Norma ISO/IEC 17025:2017.
- IUSS Working Group WRB (2015).** Base referencial mundial del recurso suelo 2014. Actualización 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. Informes sobre recursos mundiales de suelos 106. Ed. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Roma, (Italia).

- Jiménez, A., Hermoso, M., Uceda, M. (1995).** Elaboración del aceite de oliva virgen mediante sistema continuo en dos fases. Influencia de diferentes variables del proceso en algunos parámetros relacionados con la calidad del aceite. *Grasas y Aceites*, 46, 299-303.
- Kalua, C.M., Allen, M.S., Bedgood, 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.
- Kaniewski, D., Van Campo, E., Boiy, T., Terral, J.F., Khadari, B., Besnard, G. (2012).** Primary domestication and early uses of the emblematic olive tree: palaeobotanical, historical and molecular evidence from the Middle East. *Biological Reviews*, 87(4), 885-899.
- Kassa, A., Konrad, H., Geburek, T. (2019).** Molecular diversity and gene flow within and among different subspecies of the wild olive (*Olea europaea* L.): A review. *Flora*, 250, 18-26.
- Kiritsakis, A.K. (1998).** Flavor components of olive oil - A review. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75(6), 673-681.
- Koutsaftakis, A., Kotsifaki, F., Stefanoudaki, E. (1999).** Effect of Extraction System, Stage of Ripeness, and Kneading Temperature on the Sterol Composition of Virgin Olive Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 1477-1481.
- Kyçyk, O., Aguilera, M.P., Gaforio, J.J., Jiménez, A., Beltrán, G. (2016).** Sterol composition of virgin olive oil of forty-three olive cultivars from the World Collection Olive Germplasm Bank of Cordoba. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 96, 4143-4150.
- Langgut, D., Cheddadi, R., Carrión, J.S., Cavanagh, M., Colombaroli, D., Eastwood, W.J., Greenberg, R., Litt, T., Mercuri, A.M., Miebach, A., Roberts, C.N., Woldring, H., Woodbridge, J. (2019).** The origin and spread of olive cultivation in the Mediterranean Basin: The fossil pollen evidence. *The Holocene*, 29(5), 902-922.

- Lavee, S. (1977).** The growth potential of olive fruit mesocarp in vitro (*Olea europaea* L.). *Acta Horticulturae*, 78, 115-122.
- Lavee, S., Wodner, M. (1991).** Factors affecting the nature of oil accumulation in fruit of olive (*Olea europaea* L.) cultivars. *Journal of Horticultural Science*, 66, 583-591.
- Lavee, S., Wodner, M. (2004).** The effect of yield, harvest time and fruit size on the oil content in fruits of irrigated olive trees (*Olea europaea*), cvs. Barnea and Manzanillo. *Scientia Horticulturae*, 99(3-4), 267-277.
- Lehninger N.D., Cox M.M. (2009).** *Principios de Bioquímica*. Ed. Omega. Barcelona, (España).
- León-Camacho, M., Morales, M.T., Aparicio, R. (2013).** Chromatographic methodologies: Compounds for olive oil traceability issues. En: *Handbook of olive oil: Analysis and properties*. Aparicio, R., Harwood, J.L. Ed. Springer. Nueva York, (Estados Unidos).
- Leone, A., Tamborrino, A., Esposto, S., Berardi, A., Servili, M. (2022).** Investigation on the Effects of a Pulsed Electric Field (PEF) Continuous System Implemented in an Industrial Olive Oil Plant. *Foods*, 11(18), 2758.
- Li, X., Flynn, J.D., Wang, S.C. (2019).** The effects of variety, growing region, and drought stress on fatty acid and sterol compositions of California olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 96, 215-230.
- Liphschitz, 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.
- López, F., Cabrera, M., Cuadrat, J.M. (2007).** La división climática en Aragón. En: *Atlas Climático de Aragón*. Ed. Gobierno de Aragón. Zaragoza, (España).
- López-Miranda, J., Pérez-Jiménez, F., Ros, E., De Caterina, R., Badimón, L., Covas, M. I., ... Yiannakouris, N. (2010).** Olive oil and health: Summary of the II international conference on olive oil and health consensus report, Jaén and

- Córdoba (Spain), 2008. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20(4), 284-294.
- Lou-Bonafonte, J.M., Martínez-Beamonte, R., Sanclemente, T., Surra, J.C., Herrera-Marcos, L.V., Sanchez-Marco, J., Arnal, C., Osada, J. (2018).** Current insights into the biological action of squalene. *Molecular nutrition and food research*, 62(15), 1800136.
- Lukić, I., Aneti, M.Ž., Špika, M. J., Lukić, M., Koprivnjak, O., Bubola, K.B. (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.
- Lukić, M., Lukić, I. (2021).** Sterols and Triterpene Diols in Virgin Olive Oil: A Comprehensive Review on Their Properties and Significance, with a Special Emphasis on the Influence of Variety and Ripening Degree. *Horticulturae*, 7, 493.
- Lukić, M., Lukić, I., Krapac, M., Sladonja, B., Pilizota, V. (2013).** Sterols and triterpene diols in olive oil as indicators of variety and degree of ripening. *Food Chemistry*, 136, 251-258.
- Lumaret, R., Ouazzani, N., Michaud, H., Vivier, G., Deguilloux, M.F., Di Giusto, F. (2004).** Allozyme variation of oleaster populations (wild olive tree) (*Olea europaea* L.) in the Mediterranean Basin. *Heredity*, 92(4), 343-51.
- Mailer, R.J., Ayton, J., Graham, K. (2010).** The influence of growing region, cultivar and harvest timing on the diversity of Australian olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87, 877-884.
- Manai-Djebali, H., Krichène, D., Ouni, Y., Gallardo, L., Sánchez, J., Osorio, E., Douja, D., Flamini, G., Arrouk, M. (2012).** Chemical profiles of five minor olive oil varieties grown in central Tunisia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27, 109-119.
- MAPA (2021a).** Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Anuarios de Estadística (2003-2021). Disponible online:

- <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/publicaciones/anuario-de-estadistica/default.aspx> (acceso: 16 de enero de 2023).
- MAPA (2021b).** Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos (ESYRCE). Disponible online: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/esyrce/> (acceso: 14 de febrero de 2023).
- MAPA (2023a).** Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Boletines de mercado. Disponible online: https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/aceite-oliva-y-aceituna-mesa/boletines_de_mercado.aspx (acceso: 22 de marzo de 2023).
- MAPA (2023b).** Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Denominaciones de Origen e Indicaciones Geográficas Protegidas. Disponible online: <https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-diferenciada/dop-igp> (acceso: 29 de abril de 2023).
- Martínez Suárez, J.M. (1973).** Recientes estudios de la almazara experimental del instituto de la grasa. *Rivista Italiana Delle Sostanze Grasse*, 50, 325-330.
- Martínez, J.M., Muñoz, E., Alba, J. Lanzón, A. (1975).** Informe sobre la utilización del analizador de rendimientos «Abencor». *Grasas y Aceites*, 26, 379-385.
- Martínez, V. (1785).** *Carta sobre el cultivo de los olivos*. Imprenta de la Real Sociedad Aragonesa. Zaragoza, (España).
- Martínez-Beamonte, R., Ripalda, M., Herrero-Continente, T., Barranquero, C., Dávalos, A., López de Las Hazas, M.C., Álvarez-Lanzarote, I., Sánchez-Gimeno, A.C., Raso, J., Arnal, C., Surra, J.C., Osada, J., Navarro, M.A. (2022).** Pulsed electric field increases the extraction yield of extra virgin olive oil without loss of its biological properties. *Frontiers in nutrition*, 9, 1065543.
- Mastralexi, A., Nenadis, N., Tsimidou, M.Z. (2014a).** Addressing analytical requirements to support health claims on “olive oil polyphenols” (EC regulation 432/2012). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(12), 2459-2461.

- Mastralexi, A., Nenadis, N., Tsimidou, M.Z. (2014b).** Rebuttal to the comment on addressing analytical requirements to support health claims on “olive oil polyphenols” (EC regulation 432/212). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 10212-10213.
- Mateos, R., Cert, A., Perez-Camino, M.C., Garcia, J.M. (2004).** Evaluation of virgin olive oil bitterness by quantification of secoiridoid derivatives. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(1), 71-75.
- Matteuci, M., D'Angeli, S., Errico, S., Lamanna, G., Perrotta, G., Altamura, M.M. (2011).** Cold affects the transcription of fatty acid desaturases and oil quality in the fruit of *Olea europaea* L. genotypes with different cold hardiness. *Journal of Experimental Botany*, 62, 3403-3420.
- Mazzuca, S., Spadafora, A., Innocenti, A.M. (2006).** Cell and tissue localization of β -glucosidase during the ripening of olive fruit (*Olea europaea*) by in situ activity assay. *Plant Science*, 171(6), 726-733.
- McCaskill, D., Croteau, R. (1998).** Some caveats for bioengineering terpenoid metabolism in plants. *Trends Biotechnology*, 16, 349-355.
- Miho, H., Moral, J., Barranco, D., Ledesma-Escobar, C.A., Priego-Capote, F., Díez, C.M. (2021).** Influence of genetic and interannual factors on the phenolic profiles of virgin olive oils. *Food Chemistry*, 342, 128357.
- Miho, H., Moral, J., López-González, M.A., Díez, C.M., Priego-Capote, F. (2020).** The phenolic profile of virgin olive oil is influenced by malaxation conditions and determines the oxidative stability. *Food Chemistry*, 314, 126183.
- Montaño, A., Hernández, M., Garrido, I., Llerena, J.L., Espinosa, F. (2016).** Fatty acid and phenolic compound concentrations in eight different monovarietal virgin olive oils from Extremadura and the relationship with oxidative stability. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(11), 1-20.
- Moreau, R.A., Nyström, L., Whitaker, B.D., Winkler-Moser, J.K., Baer, D.J., Gebauer, S.K., Hicks, K.B. (2018).** Phytosterols and their derivatives: Structural diversity,

- distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses. *Progress in Lipid Research*, 70, 35-61.
- Moreda, W., Gomez-Coca, R.B., Perez-Camino, M. (2012).** Fatty acid alkyl esters presence in olive oil vs. organoleptic assessment. *Food Chemistry*, 135, 1205-1209.
- Morelló, J.R., Motilva, M.J., Tovar, M.J., Romero, M.P. (2004).** Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85(3), 357-364.
- Morikawa, T., Mizutani, M., Aoki, N., Watanabe, B., Saga, H., Saito, S., Oikawa, A., Suzuki, H., Sakurai, N., Shibata, D., Wadano, A., Sakata, K., Ohta, D. (2006).** Cytochrome P450 CYP710A encodes the sterol C-22 desaturase in Arabidopsis and tomato. *Plant Cell*, 18, 1008-1022.
- Morikawa, T., Saga, H., Hashizume, H., Ohta, D. (2009).** CYP710A genes encoding sterol C22-desaturase in *Physcomitrella patens* as molecular evidence for the evolutionary conservation of a sterol biosynthetic pathway in plants. *Planta*, 229, 1311-1322.
- Moss, G.P. (1989).** Nomenclature of steroids, IUPAC, *Pure and Applied Chemistry*, 61(10), 1783-1822.
- 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, 2037-2043.
- Mousavi, S., de la Rosa, R., Moukhli, A., El Riachy, M., Mariotti, R., Torres, M., ... Leon, L. (2019).** Plasticity of fruit and oil traits in olive among different environments. *Scientific Reports*, 9(1), 1-14.
- Mousavi, S., Mariotti, R., Stanzione, V., Pandolfi, S., Mastio, V., Baldoni, L., Cultrera, N.G.M. (2021).** Evolution of Extra Virgin Olive Oil Quality under Different Storage Conditions. *Foods*, 10(8), 1945.

- Mulinacci, N., Giaccherini, C., Ieri, F., Innocenti, M., Romani, A., Vincieri, F.F. (2006).** Evaluation of lignans and free and linked hydroxy-tyrosol and tyrosol in extra virgin olive oil after hydrolysis processes. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 757-764.
- Navas-López, J.F., Cano, J., de la Rosa, R., Velasco, L., León, L. (2020).** Genotype by environment interaction for oil quality components in olive tree. *European Journal of Agronomy*, 119, 126115.
- Navas-López, J.F., León, L., Trentacoste, E.R., de la Rosa, R. (2019).** Multi-environment evaluation of oil accumulation pattern parameters in olive. *Plant Physiology and Biochemistry*, 139, 485-494.
- Nenadis, N., Mastralexi, A., Tsimidou, M.Z., Vichi, S., Quintanilla-Casas, B., Donarski, J., Bailey-Horne, V., Butinar, B., Miklav, M., García González, D-G, Gallina Toschi, T. (2018).** Toward a Harmonized and Standardized Protocol for the Determination of Total Hydroxytyrosol and Tyrosol Content in Virgin Olive Oil (VOO). Extraction Solvent. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(11), 1-10.
- Nissim, Y., Shloberg, M., Biton, I., Many, Y., Doron-Faigenboim, A., Zemach, H., Hovav, R., Kerem, Z., Avidan, B., Ben-Ari, G. (2020).** High temperature environment reduces olive oil yield and quality. *PLoS ONE*, 15(4), 1-24.
- Noorali, M., Barzegar, M., Sahari, M.A. (2014).** Sterol and Fatty Acid Compositions of Olive Oil as an Indicator of Cultivar and Growing Area. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91, 1571-1581.
- Obied, H.K., Prenzler, P.D., Ryan, D., Servili, M., Taticchi, A., Esposto, S., Robards, K. (2008).** Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Natural product reports*, 25(6), 1167-1179.
- Olimerca (2023).** Disponible online: <https://www.olimerca.com/noticiadet/sultana-la-nueva-variedad-que-revolucionara-las-plantaciones-de->

- [olivar/956757e566f29cb118a7ec142a1c8c38](https://doi.org/10.1002/olivar.956757e566f29cb118a7ec142a1c8c38) (acceso: 17 de marzo de 2023). Noticia de 9 de febrero de 2023.
- Olmo-García, L., Fernández-Fernández, C., Hidalgo, A., Vílchez, P., Fernández-Gutiérrez, A., Marchal, R., Carrasco-Pancorbo, A. (2019).** Evaluating the reliability of specific and global methods to assess the phenolic content of virgin olive oil: Do they drive to equivalent results? *Journal of chromatography. A*, 1585, 56-69.
- Parr, A.J., Bolwell, G.P. (2000).** Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(7), 985-1012.
- Parvini, F., Sicardo, M.D., Hosseini-Mazinani, M., Martínez-Rivas, J.M., Hernández, M.L. (2016).** Transcriptional analysis of stearyl-acyl carrier protein desaturase genes from olive (*Olea europaea*) in relation to the oleic acid content of the virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64, 7770-7781.
- Parvini, F., Zeinanloo, A.A., Ebrahimie, E., Tahmasebi-Enferadi, S., Hosseini-Mazinani, M. (2015).** Differential expression of fatty acid desaturases in Mari and Shengeh olive cultivars during fruit development and ripening. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(4), 523-531.
- Pérez-Arcoiza, A., Hernández, M.L., Sicardo, M.D., Hernández-Santana, V., Díaz-Espejo, A., Martínez-Rivas, J.M. (2022).** Carbon supply and water status regulate fatty acid and triacylglycerol biosynthesis at transcriptional level in the olive mesocarp. *Plant Cell and Environment*, 45(8), 2366-2380.
- Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J., Lampi, A.M. (2000).** Plant sterols: Biosynthesis, biological function and their importance to human nutrition. *Journal of the Science of and Food Agriculture*, 80, 939-966.
- Piravi-Vanak, Z., Ghasemi, J.B., Ghavami, M., Ezzatpanah, H., Zolfonoun, E. (2012).** The Influence of Growing Region on Fatty Acids and Sterol Composition of

- Iranian Olive Oils by Unsupervised Clustering Methods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89, 371-378.
- Poghosyan, Z.P., Haralampidis, K., Martsinkowskaya, A.I., Murphy, D.J., Hatzopoulos, P. (1999).** Developmental regulation and spatial expression of a plastidial fatty acid desaturase from *Olea europaea*. *Plant Physiology Biochemistry*, 37, 109-119.
- Polari, J.J., Garc -Aguirre, D., Olmo-García, L., Carrasco-Pancorbo, A., Wang, S.C. (2018).** Interactions Between Hammer Mill Crushing Variables and Malaxation Time During Continuous Olive Oil Extraction. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(8), 1800097.
- Priego Jaramillo, J.M. (1930).** *Las variedades de olivos en Aragón y La Rioja*. Servicio de Publicaciones Agrícolas, Ministerio de Fomento. Madrid, (España).
- Procida, G., Giomo, A., Cichelli, A., Conte, L.S. (2005).** Relationships between volatile compounds and sensory characteristics in virgin olive oil by analytical and chemometric approaches. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 2175-2183.
- Purcaro, G., Codony, R., Pizzale, L., Mariani, C., Conte, L. (2014).** Evaluation of total hydroxytyrosol and tyrosol in extra virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116, 805-811.
- Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J.M., del Río, M.C., Martín, A., Tous, J., Trujillo, I. (2005).** *Variedades de olivo en España*. Ed. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones MundiPrensa. Madrid, (España).
- 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.
- Rallo, L., Barranco, D., de la Rosa, R., León, L. (2008).** Aceituna «Chiquitita». *Hortscience*, 43, 529-531.

- Rallo, P., Rapoport, H. (2001).** Early growth and development of the olive fruit mesocarp. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76(4), 408-412.
- Ranalli, A., Angerosa, F. (1996).** Integral centrifuges for olive oil extraction. the qualitative characteristics of products. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73(4), 417-422.
- Reboredo-Rodríguez, P., Valli, E., Bendini, A., Di Lecce, G., Simal-Gándara, J., Gallina Toschi, T. (2016).** A widely used spectrophotometric assay to quantify olive oil biophenols according to the health claim (EU Reg. 432/2012). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 118(10), 1593-1599.
- Rey, R., Machina, M.D., Pérez, P. (2017).** Contribuciones a la incertidumbre en la determinación de los ácidos grasos en aceites de oliva. Aproximación Nordtest. En: *VIII Congreso Virtual Iberoamericano Sobre Gestión de Calidad En Los Laboratorios*, IBEROLAB, Sevilla, 1-6.
- Ricciutelli, M., Marconi, S., Boarelli, M.C., Caprioli, G., Sagratini, G., Ballini, R., Fiorini, D. (2017).** Olive oil polyphenols: a quantitative method by high-performance liquid-chromatography-diode-array detection for their determination and the assessment of the related health claim. *Journal of Chromatography A*, 1481, 53-63.
- Ripa, V., De Rose, F., Caravita, M.A., Parise, M.R., Perri, E., Rosati, A., Pandolfi, S., Paoletti, A., Pannelli, G., Padula, G., Giordani, E., Bellini, E., Buccoliero, A., Mennone, C. (2008).** Qualitative evaluation of olive oils from new olive selections and effects of genotype and environment on oil quality. *Advances in Horticultural Science*, 22(2), 95-103.
- Rivera del Álamo, R.M., Fregapane, G., Aranda, F., Gómez-Alonso, S., Salvador, M.D. (2004).** Sterol and alcohol composition of Cornicabra virgin olive oil: the campesterol content exceeds the upper limit of 4% established by EU regulations. *Food Chemistry*, 84, 533-537.

- Rodríguez-Ariza, M.O., Montes Moya, E. (2010).** Paisaje y gestión de los recursos vegetales en el yacimiento romano de Gabia (Granada) a través de la Arqueobotánica. *Archivo Español de Arqueología*, 83, 85-107.
- Romero, C., Brenes, M. (2012).** Analysis of total contents of hydroxytyrosol and tyrosol in olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 9017-9022.
- Romero, C., Brenes, M. (2014).** Comment on addressing analytical requirements to support health claims on “olive oil polyphenols” (EC regulation 432/212). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 10210-10211.
- Romero, A., Tous, J. (2009).** II Jornadas Nacionales del grupo de Olivicultura de la SECH. Disponible online: https://www.agronoms.cat/media/upload/editora_24/ArticlesIRTA_editora_241_52.pdf (acceso: 2 enero 2022).
- Romero, A., Tous, J., Gracia, M.S. (2011).** Fatty acids and sterol composition of Empeltre virgin oil in Ebro Valley and Balearic Islands. *Acta Horticulturae*, 924, 385-392.
- Romero, A., Ninot, A., Hermoso, J.F., Tous, J. (2012).** Clonal selection of Empeltre olive cultivar in Spain. En: *VII International Symposium on Olive Growing*, Argentina.
- Rubio de Casas, R., Besnard, G., Schönswetter, P., Balaguer, L., Vargas, P. (2006).** Extensive gene flow blurs phylogeographic but not phylogenetic signal in *Olea europaea* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 113, 575-583.
- Rugini, E., Baldoni, L., Muleo, R., Sebastiani, L. (2016).** *Compendium of plant genomes - The olive tree genome*. Ed. Springer International Publishing.
- Rugini, E., De Pace, C., Gutiérrez-Pesce, P., Muleo, R. (2011).** *Olea*. En: *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources*. Kole, C. Ed. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 79-118.
- Ryan, D., Antolovich, M., Prenzler, P., Robards, K., Lavee, S. (2002).** Biotransformations of phenolic compounds in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 92(2), 147-176.

- Ryan, D., Robards, K., Lavee, S. (1999).** Changes in phenolic content of olive during maturation. *International Journal of Food Science and Technology*, 34, 265-274.
- Sakouhi, F., Absalon, C., Harrabi, S., Vitry, C., Sebei, K., Boukhchina, S., Fouquet, E., Kallel, H. (2009).** Dynamic accumulation of 4-desmethylsterols and phytosterols during ripening of Tunisian Meski olives (*Olea europaea* L.). *Food Chemistry*, 112(4), 897-902.
- Salas, J.J., Harwood, J.L., Martínez-Force, E. Aparicio, R., García-González, D.L. (2013).** Lipid Metabolism in Olive: Biosynthesis of Triacylglycerols and Aroma Components. En: *Handbook of Olive Oil. Analysis and Properties*. Aparicio, R., Harwood, J. Ed. Springer. Nueva York, (Estados Unidos) pp. 97-128.
- 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, 45-53.
- Salvador, M.D., Aranda, F., Gómez-Alonso, S., Fregapane, G. (2003).** Influence of extraction system, production year and area on Cornicabra virgin olive oil: a study of five crop seasons. *Food Chemistry*, 80, 359-366.
- Sánchez Casas, J., Osorio Bueno, E., Montaña García, A.M., Martínez Cano, M. (2004).** Sterol and erythrodiol + uvaol content of virgin olive oils from cultivars of Extremadura (Spain). *Food Chemistry*, 87, 225-230.
- Sánchez de Medina, V., Priego-Capote, F., Luque de Castro, M.D. (2015).** The effect of genotype and ripening index on the phenolic profile and fatty acids composition of virgin olive oils from olive breeding programs. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117, 954-966.
- Sánchez, J., Harwood, J.L. (2002).** Biosynthesis of triacylglycerols and volatiles in olives. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104(9-10), 564-573.
- Sanz-Cortés, F., Martínez-Calvo, J., Badenes, M.L., Bleiholder, H., Hack, H., Llacer, G., Meier, U. (2002).** Phenological growth stages of olive trees (*Olea europaea*). *Annals of Applied Biology*, 140(2), 151-157.

- Schaeffer, A., Bronner, R., Benveniste, P., Schaller, H. (2001).** The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in Arabidopsis is controlled by sterol methyltransferase 2;1. *The Plant Journal*, 25(6), 605-615.
- Schaller, H. (2004).** New aspects of sterol biosynthesis in growth and development of higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42, 465-476.
- Serrano, A., de la Rosa, R., Sánchez-Ortiz, A., Cano, J., Pérez, A.G., Sanz, C., Arias-Calderón, R., Velasco, L., León, L. (2021).** Chemical components influencing oxidative stability and sensorial properties of extra virgin olive oil and effect of genotype and location on their expression. *Lwt*, 136(1), 110257.
- Servili, M., Esposto, S., Fabiani, R., Urbani, S., Taticchi, A., Mariucci, F., Selvaggini, R., Montedoro, G.F. (2009).** Phenolic compounds in olive oil: Antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology*, 17(2), 76-84.
- Servili, M., Sordini, B., Esposto, S., Urbani, S., Veneziani, G., Di Maio, I., Selvaggini, R., Taticchi, A. (2014).** Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *Antioxidants*, 3(1), 1-23.
- Sevim, D., Köseoğlu, O., Özdemir, D., Hakan, M., Büyükgök, E.B., Uslu, H., et al. (2022).** Determination of the quality and purity characteristics of olive oils obtained from different regions of Turkey, depending on climatic changes. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 100(3), 197-213.
- SIAR (2020).** Sistema de Información Agroclimática para el Regadío. Disponible online: <https://eportal.mapa.gob.es/websiar/Inicio.aspx> (acceso: 2 de marzo de 2020).
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965).** Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Srigley, C.T., Oles, C.J., Kia, A.R.F., Mossoba, M.M. (2016).** Authenticity Assessment of Extra Virgin Olive Oil: Evaluation of Desmethylsterols and Triterpene Dialcohols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 93(2), 171-181.

- Stefanoudaki, E., Williams, M., Chartzoulakis, K., Harwood, J. (2009).** Effect of irrigation on quality attributes of olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7048-7055.
- Stobart, K., Mancha, M., Lenman, M., Dahlqvist, A., Stymne, S. (1997).** Triacylglycerols are synthesised and utilized by transacylation reactions in microsomal preparations of developing safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seeds. *Planta*, 203, 58-66.
- Surra, J.C., Navarro, M.A., Martínez, M.V., Osada, J. (2015).** Aceite de oliva virgen, el alimento con propiedades farmacológicas preventivas de la aterosclerosis. *Lucas Mallada*, 17, 225-245.
- Taticchi, A., Esposto, S., Veneziani, G., Minnocci, A., Urbani, S., Selvaggini, R., Sordini, B., Daidone, L., Sebastiani, L., Servili, M. (2021).** High vacuum-assisted extraction affects virgin olive oil quality: Impact on phenolic and volatile compounds. *Food chemistry*, 342, 128369.
- Taticchi, A., Esposto, S., Veneziani, G., Urbani, S., Selvaggini, R., Servili, M. (2013).** The influence of the malaxation temperature on the activity of polyphenoloxidase and peroxidase and on the phenolic composition of virgin olive oil. *Food Chemistry*, 136(2), 975-983.
- Temime, S. Ben, Manai, H., Methenni, K., Baccouri, B., Abaza, L., Daoud, D., Sánchez Casas, J., Osorio Bueno, E., Zarrouk, M. (2007).** Sterolic composition of Chétoui virgin olive oil: Influence of geographical origin. *Food Chemistry*, 110, 368-374.
- Terral, J.F., Alonso, N., Buxó I Capdevila, R., Chatti, N., Fabre, L., Fiorentino, G., ... Alibert, P. (2004).** Historical biogeography of olive domestication (*Olea europaea* L.) as revealed by geometrical morphometry applied to biological and archaeological material. *Journal of Biogeography*, 31(1), 63-77.
- Torres, M., Pierantozzi, P., Contreras, C., Stanzione, V., Tivani, M., Mastio, V., Gentili, L., Searles, P., Brizuela, M., Fernández, F., Toro, A., Puertas, C., Trentacoste, E., Kiessling, J., Mariotti, R., Mousavi, S., Bufacchi, M., Baldoni, L., Maestri, D.**

- (2022). Thermal regime and cultivar effects on squalene and sterol contents in olive fruits: Results from a field network in different Argentinian environments. *Scientia Horticulturae*, 303, 111230.
- Tous, J., Romero, A. (1993).** *Variedades del Olivo*. Ed. Fundación «La Caixa» y AE2. Barcelona, (España).
- Tous, J., Romero, A. (1994).** Cultivar and location effects on olive oil quality in Catalonia, Spain. *Acta Horticulturae*, 356, 323-326.
- Tous, J., Romero, A. (2000a).** «Arbosana IRTA i-43». *Olint*, 2, 13-15.
- Tous, J., Romero, A. (2002).** Ficha varietal de olivo «Koroneiki IRTA i-38». *Olint*, 6, 23-25.
- Tous, J., Romero, A., Díaz, I. (2005).** Composición del aceite (Banco de Germoplasma de Cataluña). En: *Variedades de olivo en España*. Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J.M., del Río, C., Martín, A., Tous, J. et al. Ed. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, (España) pp. 358-372.
- Tous, J., Romero, A., Plana, J. (2000b).** IRTA i-18. El primer clon de la variedad «Arbequina» en el mundo. *Olint*, 1, 15-18.
- Tous, J., Romero, A., Plana, J., Espada, J.L., Gracia, M.S., Lizar, B., Rallo, J., Iñiguez, A., Gracia, J., Martorell, A., Elguea, J.A. (2004).** Ficha varietal del cultivar “Empeltre”. *Olivae*, 102, 31-32.
- Tous, J., Romero, A., Plana, J., Espada, J.L., Gracia, M.S., Lizar, B., Rallo, J., Martorell, A., Iñiguez, A., Gracia, J., Elguea, J.A. (2006).** Selección clonal de la variedad de olivo Empeltre en el Valle del Ebro y Baleares. *Fruticultura Profesional*, 160, 13-18.
- Trentacoste, E.R., Puertas, C.M., Sadras, V.O. (2010).** Effect of fruit load on oil yield components and dynamics of fruit growth and oil accumulation in olive (*Olea europaea* L.). *European Journal of Agronomy*, 32(4), 249-254.
- Tsimidou, M.Z. (2022).** A Critical Appraisal of the Separation Protocols Proposed for the Implementation of the Health Claim on “Olive Oil Polyphenols” (EC Regulation 432/2012). *Separations*, 9(11), 351.

- Tsimidou, M.Z., Boskou, D. (2015).** The health claim on “olive oil polyphenols” and the need for meaningful terminology and effective analytical protocols. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(8), 1091-1094.
- Tsimidou, M.Z., Nenadis, N., Mastralexi, A., Servili, M., Butinar, B., Vichi, S., Winkelmann, O., García-González, D. L., Gallina Toschi, T. (2019a).** Toward a Harmonized and Standardized Protocol for the Determination of Total Hydroxytyrosol and Tyrosol Content in Virgin Olive Oil (VOO). The Pros of a Fit for the Purpose Ultra High Performance Liquid Chromatography (UHPLC) Procedure. *Molecules*, 24, 2429.
- Tsimidou, M.Z., Nenadis, N., Servili, M., García-González, D.L., Gallina Toschi, T. (2018).** Why tyrosol derivatives have to be quantified in the calculation of “olive oil polyphenols” content to support the health claim provisioned in the EC Reg. 432/2012. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120, 1800098.
- Tsimidou, M.Z., Sotiropoulou, M., Mastralexi, A., Nenadis, N., García-González, D.L., Toschi, T. G. (2019b).** In house validated UHPLC protocol for the determination of the total hydroxytyrosol and tyrosol content in virgin olive oil fit for the purpose of the health claim introduced by the EC Regulation 432/2012 for “olive oil polyphenols.” *Molecules*, 24(6), 1-16.
- Uceda, M., Beltrán, G., Jiménez, A. (2005).** Composición del aceite (Banco de Germoplasma Mundial de Córdoba). En: *Variedades de olivo en España*. Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J.M., del Río, C., Martín, A., Tous, J. et al. Ed. Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, (España), pp. 358-372.
- Uceda, M., Beltrán, G., Jiménez, A. (2006).** Olive oil extraction and quality. *Grasas y Aceites*, 57(1), 25-31.
- UE (2012).** Unión Europea. Reglamento n°432/2012 de la comisión 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. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 136, 1-40.

- UE (2013).** Unión Europea. Reglamento de Ejecución (UE) n°1348/2013 de la Comisión 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. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 338, 31_67.
- UE (2015).** Unión Europea. Reglamento de Ejecución (UE) 2015/1833 de la Comisión, de 12 de octubre de 2015, 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. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 266, 29_52.
- UE (2016a).** Unión Europea. Reglamento de Ejecución (UE) 2016/1227 de la Comisión, de 27 de julio de 2016, 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. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 202, 7-13.
- UE (2016b).** Unión Europea. Reglamento de Ejecución (UE) 2016/1784 de la Comisión, de 30 de septiembre de 2016, 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. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 275, 5-9.
- UE (2019).** Unión Europea. Reglamento de Ejecución (UE) 2019/1604 de la Comisión de 27 de septiembre de 2019, 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. *Diario Oficial de la Unión Europea*, L 250, 14-48.
- UE (2022a).** Unión Europea. Reglamento Delegado (UE) 2022/2104 de la Comisión de 29 de julio de 2022 por el que se completa el Reglamento (UE) n°1308/2013 del Parlamento Europeo y el Consejo, en lo que respecta a las normas de comercialización del aceite de oliva, y por el que se derogan el Reglamento (CEE) n°2568/91 de la Comisión y el Reglamento de Ejecución (UE) n°29/2012 de la Comisión. *Diario oficial de la Unión Europea*, L 284, 1-22.
- UE (2022b).** Reglamento de Ejecución (UE) 2022/2105 de la Comisión de 29 de julio de 2022 por el que se establecen las normas relativas a los controles de conformidad

- de las normas de comercialización del aceite de oliva y a los métodos de análisis de las características del aceite de oliva. *Diario oficial de la Unión Europea*, L 284, 23-48.
- Unver, T., Wu, Z., Sterck, L., Turktas, M., Lohaus, R., Li, Z., Yang, M., He, L., Deng, T., Escalante, F.J., Llorens, C., Roig, F.J., Parmaksiz, I., Dundar, E., Xie, F., Zhang, B., Ipek, A., Uranbey, S., Erayman, M., Ilhan, E., ... Van de Peer, Y. (2017).** Genome of wild olive and the evolution of oil biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114, E9413-E9422.
- USDA (2010).** Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. Normas de los Estados Unidos para las categorías de aceite de oliva y aceite de orujo de oliva. Registro Federal.
https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/Olive_Oil_and_Olive-Pomace_Oil_Standard%5B1%5D.pdf (acceso: 12 de junio de 2023).
- Vallone, M., Aiello, G., Bono, F., De Pasquale, C., Presti, G., Catania, P. (2022).** An Innovative Malaxer Equipped with SCADA Platform for Improving Extra Virgin Olive Oil Quality. *Sensors*, 22(6), 2289.
- Van Zeist, W., Bottema, S. (2009).** A palynological study of the Acheulian site of Gesher Benot Ya'akov, Israel. *Vegetation History and Archaeobotany*, 18, 105-121.
- Vázquez Roncero, A., Janer del Valle, C., Janer del Valle, M.L. (1973).** Determinación de los polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas y Aceites*, 24, 350-357.
- Vázquez-Roncero, A., Maestro-Duran, R., Janer del Valle, M.L. (1970).** Colorantes antociánicos de la aceituna. II. Variaciones durante la maduración. *Grasas y Aceites*, 21, 337-341.
- Vekiari, S.A., Oreopoulou, V., Kourkoutas, Y., Kamoun, N., Msallem, M., Psimouli, V., Arapoglou, D. (2010).** Characterization and seasonal variation of the quality of virgin olive oil of the Throumbolia and Koroneiki varieties from Southern Greece. *Grasas y Aceites*, 61(3), 221-231.

- Venkatramesh, M., Karunanandaa, B., Sun, B., Gunter, C.A., Boddupalli, S., Kishore, G.M. (2003).** Expression of a *Streptomyces* 3-hydroxysteroid oxidase gene in oilseeds for converting phytosterols to phytosteranols. *Phytochemistry*, 62(1), 39-46.
- Vichi, S., Boynuegri, P., Caixach, J., Romero, A. (2015).** Quality losses in virgin olive oil due to washing and short-term storage before olive milling. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(12), 2015-2022.
- Vilar, J., Pereira, J.E. (2018).** *La olivicultura internacional. Difusión histórica, análisis estratégico y visión descriptiva*. Ed. Fundación Caja Rural de Jaén, (España).
- Viñuales Andreu, J. (2007).** *Variedades de olivo del Somontano*. Ed. Instituto Estudios altoaragoneses. Huesca, (España).
- Viñuales, J., Casanova, J., González, J.M. (2013).** Variedades de olivo cultivadas en la provincia de Huesca. *Lucas Mallada*, 15, 29-47.
- Vossen, P. (2005).** Olive oil production. En: *Olive Production Manual*. Sibbet, S.G., Ferguson, L. Ed. University of California, Agriculture and Natural Resources, Publication, 3353, (Estados Unidos) pp. 157-173.
- Wodner, M., Lavee, S., Epstein, E. (1988).** Identification and seasonal changes of glucose, fructose and mannitol in relation to oil accumulation during development in *Olea europaea* L. *Scientia Horticulturae*, 36, 47-54.
- Zhang, M., Fan, J., Taylor, D.C., Ohlrogge, J.B. (2009).** DGAT1 and PDAT1 acyltransferases have overlapping functions in *Arabidopsis* triacylglycerol biosynthesis and are essential for normal pollen and seed development. *Plant Cell*, 21, 3885-3901.
- Zohary, D., Spiegel-Roy, P. (1975).** Beginnings of fruit growing in the old world. *Science*, 187, 319-327.