



Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencia y Tecnología de los Alimentos

**CARACTERIZACIÓN DE ACEITES DE OLIVA OBTENIDOS
TRAS LA APLICACIÓN DE PULSOS ELÉCTRICOS DE ALTO
VOLTAJE DURANTE EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DEL
ACEITE**

**CHARACTERIZATION OF OLIVE OIL OBTAINED AFTER
PULSED ELECTRIC FIELDS APPLICATION DURING THE
OLIVE OIL EXTRACTION PROCESS**

Autor:

Eduardo Gimeno Viartola

Directores:

Ana Cristina Sánchez-Gimeno

María Abenoza Giménez

Facultad de Veterinaria

Junio 2016

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	1
3. INTRODUCCIÓN	2
3.1. El olivo y la aceituna	2
3.2. Extracción del aceite de oliva	4
3.3. Factores que afectan a la calidad del aceite de oliva	6
3.4. Calidad reglamentada	10
3.5. El uso de PEAV en la extracción de aceite de oliva	11
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1. Materia prima	14
5.2. Determinaciones en el fruto	15
5.2.1. Índice de madurez	15
5.3. Diseño experimental	16
5.4. Aplicación de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV) a la pasta de aceitunas	16
5.5. Extracción de aceite de oliva y cálculo del rendimiento industrial	17
5.6. Determinaciones en la pasta de aceitunas y en los alpeorujos	18
5.6.1. Humedad	18
5.6.2. Cálculo del contenido graso sobre materia seca	18
5.7. Determinaciones en los aceites de oliva obtenidos	19
5.7.1. Caracterización físico-química	19
5.7.1.1. Grado de acidez	19
5.7.1.2. Índice de peróxidos	20
5.7.1.3. Coeficientes de extinción en el ultravioleta (K_{232} , K_{270})	20
5.7.1.4. Ésteres etílicos de los ácidos grasos	21
5.7.2. Caracterización nutricional	21
5.7.2.1. Determinación del contenido en α -tocoferol	21
5.7.2.2. Determinación del contenido en fenoles totales	22
5.7.2.3. Estabilidad oxidativa	23
5.7.2.4. Contenido en pigmentos	23
5.8. Análisis sensorial	24
5.9. Tratamiento estadístico de los datos	24
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
6.1 Determinaciones en el fruto y en la pasta de aceitunas	25
6.2. Determinación del rendimiento industrial y del contenido graso sobre materia seca en los alpeorujos	26
6.3. Caracterización físico-química de los aceites de oliva	27
6.4. Caracterización nutricional	29
6.4.1. Contenido en α -tocoferol	29
6.4.2. Fenoles totales	30
6.4.3. Pigmentos	31
6.4.4. Estabilidad oxidativa	33
6.5. Caracterización sensorial de los aceites de oliva	34
7. CONCLUSIONES	35
8. CONCLUSIONS	36
9. APORTACIONES Y VALORACIÓN DE LA ASIGNATURA	36
10. BIBLIOGRAFÍA	37

1. RESUMEN

La aplicación de un tratamiento de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV) a la pasta de aceitunas podría facilitar la salida del aceite y por lo tanto mejorar el rendimiento de la extracción o incluso disminuir el tiempo y/o temperatura de batido. En estudios previos se ha aplicado esta tecnología con intensidades de campo eléctrico de hasta 2 kV/cm al proceso de extracción del aceite de oliva.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la repercusión de la aplicación de un tratamiento de pulsos eléctricos de alto voltaje con intensidades de campo eléctrico de 3 kV/cm a diferentes temperaturas de batido (15 y 26 °C) en la extracción del aceite de oliva. Se evaluó el rendimiento de extracción y se determinaron en los aceites de oliva los parámetros físico-químicos regulados por la legislación (acidez, índice de peróxidos, coeficientes de extinción en el ultravioleta y ésteres etílicos de los ácidos grasos), nutricionales (fenoles totales, α -tocoferol, pigmentos y estabilidad oxidativa) y sensoriales.

El tratamiento de PEAV mejoró el rendimiento de extracción en torno a un 20 % cuando el batido se realizó a 26 °C. Sin embargo, cuando el batido se realizó a 15 °C esa mejora en el rendimiento fue inferior, pero algunos parámetros nutricionales aumentaron, como el contenido en fenoles totales.

Tras los distintos tratamientos no se modificaron sustancialmente los parámetros físico-químicos y no se detectaron atributos sensoriales negativos en los aceites de oliva, por lo que todos los aceites conservaron la categoría comercial de aceite de oliva virgen extra.

2. ABSTRACT

Pulsed electric fields application (PEF) to the olive paste may facilitate the olive oil output and therefore improve the extraction yield or decrease malaxation time or/and temperature. In previous studies this technology with electric field strengths of up to 2 kV/cm was applied to olive oil extraction process.

The main objective of the present study was to evaluate the impact of pulsed electric fields application with 3 kV/ cm electric field strength at different malaxation temperatures (15 and 26 °C) in olive oil extraction. The extraction yield was evaluated and physico-chemical parameters regulated by legislation (acidity, peroxide index, ultraviolet extinction coefficients and fatty acids ethyl esters), nutritional (total phenols, α -tocopherol, pigments and oxidative stability) and sensory analysis parameters were determined in olive oil.

PEF treatment increased the extraction yield about 20% when the malaxation temperature was 26 °C. However, when the malaxation was 15 °C that improvement yield was lower, but some nutritional parameters increased as total phenols content.

After different treatments physico-chemical parameters were not substantially modified and no negative sensory attributes were detected in olive oils, so all oils preserved the commercial category of extra virgin olive oil.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. El olivo y la aceituna

El olivo (*Olea europaea*) pertenece a la familia de las oleáceas. Las plantas de esta familia son en su mayoría árboles y arbustos, perteneciendo a ella 29 géneros y más de 600 especies. La especie *Olea europaea* es la única de esta familia con fruto comestible y su hábitat está determinado por el clima mediterráneo, que se caracteriza por inviernos suaves y veranos secos y calurosos. Tiene un tamaño mediano, de unos 4 a 8 metros de altura, aunque depende de la variedad. El tronco es grueso y la corteza de color gris a verde grisáceo. La copa es redondeada, aunque más o menos lobulada, siendo bastante densa. El olivo puede permanecer vivo y productivo cientos de años.

Existen tres grandes tipos de plantaciones de olivar que se pueden agrupar atendiendo a su diseño, grado de mecanización y recolección y factores agronómicos en:

- Sistema tradicional de cultivo. Situados en terrenos de pendiente elevada y con amplios marcos de plantación, están constituidos por árboles de gran tamaño.

Presentan una productividad media-baja y unos costes de cultivo elevados y la recolección es manual o con ayuda de vibradores.

- Sistemas intensivos. Constituidos por árboles de tamaño medio que se pueden plantar en todo tipo de terreno. Mediante diversos equipos (vibradores con paraguas) se ha conseguido mecanizar el derribo y la recolección del fruto. Presentan una productividad muy alta y rentable.
- Sistemas de alta densidad o superintensivos. Constan de hileras de árboles de pequeño tamaño con mayor densidad que en los otros sistemas. Es un sistema totalmente mecanizado y además, presenta la mayor rentabilidad y productividad de los tres.

El fruto del olivo, es la aceituna, una drupa de forma elipsoidal o globosa, con una sola semilla en su interior. Está compuesta por tres tejidos principales: endocarpio, mesocarpio y epicarpio (Figura 1). El endocarpio es el hueso que contiene en su interior la almendra o semilla, el mesocarpio es la pulpa o la carne y el epicarpio es la piel o capa exterior.

El aceite de oliva se encuentra en forma de diminutas gotitas contenidas en las vacuolas de las células del mesocarpio de los frutos. Para su extracción será preciso romper la estructura del mesocarpio y así facilitar la salida del aceite.

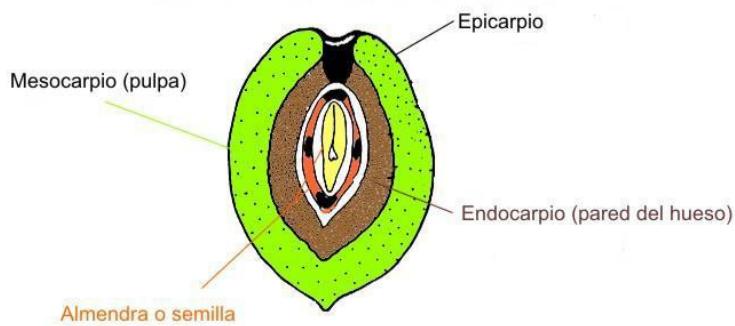


Figura 1. Esquema de los distintos tejidos de la aceituna

Existen más de 200 variedades de aceitunas. Para las plantaciones tradicionales e intensivas se utilizan variedades como Picual, Arbequina, Manzanilla, Hojiblanca, Empeltre, etc. Para las plantaciones de alta densidad o superintensivas, se utilizan variedades como Arbósana, Koroneiki, etc, aunque la más extendida es la variedad Arbequina (*Olea europaea L. Ilerdensis*). El fruto de Arbequina es de pequeño formato, de color verde-amarillento, forma esférica y simétrico.

3.2. Extracción del aceite de oliva

El aceite de oliva virgen es el obtenido a partir de la aceituna exclusivamente por procedimientos mecánicos u otros medios físicos, en condiciones especialmente térmicas que no produzcan la alteración del aceite, que no haya tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado (Aparicio y Harwood, 2003).

La extracción del aceite de oliva se realiza en varias etapas, tal y como se muestra en el siguiente esquema (Figura 2).

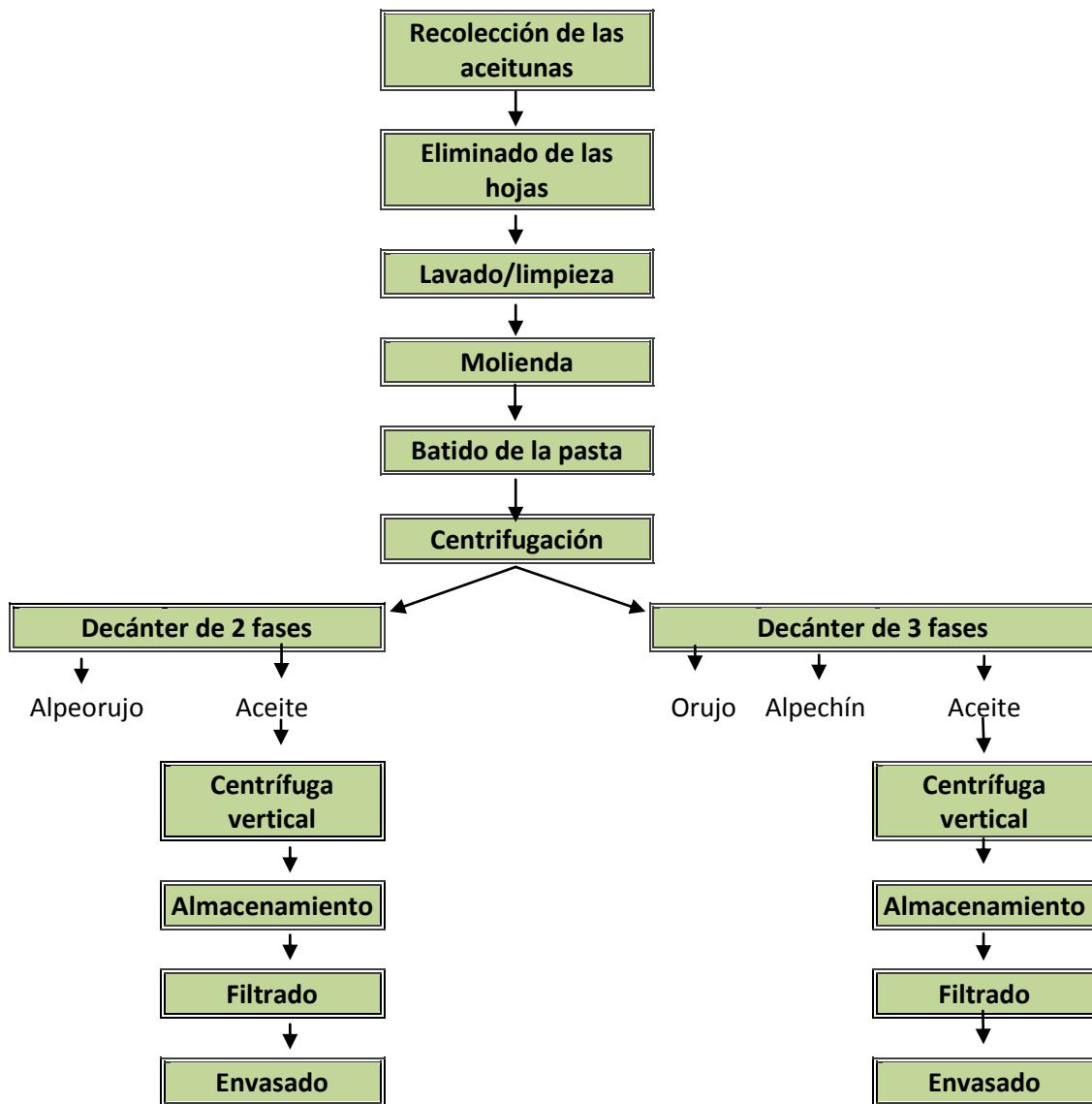


Figura 2. Diagrama de flujo de la extracción del aceite de oliva.

Fuente: Elaboración propia.

La molienda de los frutos se realiza mediante molinos de martillos que ayudan a efectuar mejor la separación del aceite, desgarrando los tejidos del fruto. Durante la molienda, las gotas microscópicas de aceite se unen para formar otras más grandes (coalescencia). El batido posterior a la molienda (realizado en termobatidora), favorece la aglutinación de estas gotas para formar una fase oleosa más grande, hasta que se produce la separación de las fases acuosas (alpechín) y de la fase de orujo (piel, pulpa y huesos rotos).

La temperatura de batido de la pasta debe ser inferior a los 30 °C, ya que si se sobrepasa se provocan alteraciones en la calidad del aceite como pérdida de aromas, aumento del índice de peróxidos y pérdida de estabilidad. Habitualmente se utiliza talco como coadyuvante, ya que su uso está permitido en pastas difíciles (Beltrán y col., 2010).

Para realizar la separación del aceite del resto de componentes de la aceituna, se utiliza un sistema en continuo con centrífugas horizontales o decánter mediante el cual se consigue la separación por diferencia de densidad, del orujo, el alpechín y el aceite. Dependiendo del número de fases existen dos tipos de decánter: de dos fases, en los que se separan, el aceite y el alpeorujo u orujo húmedo (mezcla de orujo y alpechín) y de tres fases, que dan lugar a aceite, orujo y alpechín (Mataix y Martínez, 2001).

3.3. Factores que afectan a la calidad del aceite de oliva

La calidad del aceite de oliva depende de la calidad de la aceituna, así como de la calidad de los procesos de cosecha, postcosecha, extracción, conservación y distribución del producto final hasta ser consumido. Se trata de una cadena de producción donde una pérdida de calidad en un punto intermedio es irrecuperable en etapas posteriores. Estos factores de calidad son:

a) Factores genéticos.

Se refieren a la variedad de aceituna. Existen al menos tantas variedades de aceites de oliva como variedades de olivos y frutos dedicados a la extracción de aceite. Cada variedad de olivo produce frutos característicos con una composición química y características sensoriales distintas. Por ejemplo, la variedad Arbequina está caracterizada por presentar una baja estabilidad frente a la oxidación debido a su composición química, ya que tiene un bajo contenido en fenoles y es rica en ácidos grasos poliinsaturados. El aceite obtenido a partir de estos frutos conservará éstas características, siempre que se haya extraído mediante procedimientos mecánicos o físicos que no alteren el producto.

b) Factores agronómicos.

- **Condiciones climáticas.** El olivo proviene de un clima mediterráneo, que se caracteriza por presentar dos estaciones: una fría y húmeda y otra calurosa y seca. Las heladas, tanto primaverales como tardías afectan negativamente al fruto, provocando la rotura de las células interiores, dando lugar a defectos sensoriales en el aceite. Los frutos de árboles cultivados en climas secos y calurosos dan aceites con mejor flavor pero con menor contenido en ácidos grasos insaturados (Kiritsakis y Markakis, 1987).
- **Tipo de suelo y localización del cultivo.** Además del clima, la altitud donde se encuentra el cultivo es el principal factor responsable de que existan diferencias en la composición química del aceite dentro de una misma variedad (Mousa y col., 1996).
- **Grado de maduración.** Durante el proceso de maduración de la aceituna, va sufriendo cambios fisiológicos y como consecuencia se modifica la textura, el peso, el color y su composición. Las características del aceite varían en función del grado de madurez en el que se recolectan las aceitunas. El porcentaje graso sobre materia seca aumenta durante la maduración generando un incremento en el rendimiento de la extracción (Salvador y col., 2001; Baccouri y col., 2008).
- **Sistemas de cultivo y sistemas de recolección.** (Ver apartado 3.1)
- **Riego.** Es un elemento indispensable en las plantaciones superintensivas. Puede modificar tanto la composición química como las características organolépticas del aceite producido. Los aceites producidos en riego presentan diferencias en la composición química respecto a los de secano. El contenido en fenoles siempre es superior en los aceites procedentes de secano (Salas y col., 1997). Por otra parte el contenido en ácido oleico es inferior en los aceites de secano (Salas y col., 1997; Pastor y col., 2005)
- **Poda.** No tiene efecto directo sobre la calidad del fruto, pero evita la instauración de determinadas enfermedades (aceituna jabonosa, repilo) que afectan al fruto y en consecuencia a la calidad del aceite.

- Fertilización. Una fertilización adecuada del olivar permite obtener una buena respuesta productiva. Un aporte extra de algún mineral, aunque suponga un mayor coste puede repercutir en una mejora en la producción y calidad del aceite. Por ejemplo, la utilización de abonados nitrogenados en olivos de la variedad Picual da lugar a aceites con mayor contenido en α-tocoferol (Féرنandez-Escobar y col., 2006).

c) Factores de procesado.

Son los propios del proceso de elaboración e influyen en la calidad y tipo de aceite, especialmente en sus características sensoriales. Entre estos factores destacan el tipo de molino utilizado, la temperatura y tiempo de batido, el decánter utilizado (dos o tres fases), etc. Además, la clave para obtener aceite de calidad es procesar lo más rápidamente posible tras la recolección para evitar fermentaciones y defectos sensoriales en el aceite.

- La molienda, cuyo objetivo es la rotura de los tejidos vegetales, puede hacerse con diferentes tipos de molinos lo que influye en la composición y en los caracteres sensoriales del aceite obtenido. Estudios realizados por Di Giovacchino (1991; 2003) demostraron que los aceites obtenidos de frutos molturados en molinos metálicos, tienen un color verde más intenso que los obtenidos de molinos de piedra. Esto es debido a que los molinos metálicos rompen las células de la pulpa de la aceituna liberando más pigmentos clorofílicos.
- Si se incrementa la temperatura de batido, generalmente aumentan los compuestos fenólicos (Di Giovacchino, 1991; Taticchi y col., 2013) con el consiguiente aumento de la estabilidad (Jiménez y col., 1995). Sin embargo, el tiempo de batido tiene una influencia menor que la temperatura sobre los compuestos fenólicos. Se ha demostrado que aumentos del tiempo de batido, reducen el contenido de polifenoles (Clovodeo, 2012; Fregapane y Salvador, 2013).
- La separación de fases se realiza por el sistema de centrifugación, tanto de dos como de tres fases. En el proceso de centrifugación es importante

no sólo la cantidad de agua adicionada, sino también la temperatura a la que se incorpora. A mayor cantidad de ambos parámetros se producen aceites con un menor contenido en polifenoles y en compuestos aromáticos (Barranco y col., 2008). Debido a que con los decánter de tres fases se requiere adición de agua, los aceites obtenidos tienen menor concentración de compuestos fenólicos que los de dos fases (Di Giovacchino y col., 2001).

Durante los últimos años se han realizado innovaciones en el procesado del aceite de oliva para conseguir un objetivo claro: mejorar el rendimiento de la extracción y reducir el tiempo y/o temperatura de batido sin comprometer la calidad de los aceites. Algunas de ellas son las siguientes:

- Uso de coadyuvantes. Como la adición de carbonato cálcico (CaCO_3) a la pasta de aceituna durante el batido y el empleo de enzimas pécticas (De Faveri y col., 2008; Najafian y col., 2009), aunque la normativa europea no contempla el uso en aceites de oliva vírgenes (CE, 2001).
- Batido en atmósfera modificada mediante el uso de diversos gases (Clovodeo, 2012). Se ha diseñado un nuevo modelo de batidora cerrada herméticamente que permite la incorporación de algún gas durante el proceso de batido, bien inerte como el nitrógeno o el argón, o el oxígeno pero de forma controlada ya que de lo contrario favorecería el proceso de oxidación.
- Uso de tecnologías emergentes en el proceso de extracción del aceite de oliva, como son:
 - Ultrasonidos. Son una forma de energía generada por ondas con frecuencias por encima de los 16 kHz. Tiene un doble efecto, mecánico y térmico, que pueden resultar útiles en el proceso de extracción. Trabajos como el de Clodoveo (2013) mostraron que con la aplicación de tratamientos de ultrasonidos (35 kHz-150 W) tras la molienda, se consiguen reducciones del tiempo de precalentamiento de la pasta del 60% respecto al calentamiento convencional.
 - Ondas microondas. Son ondas electromagnéticas no ionizantes comprendidas entre 300 MHz y 300 GHz. Al igual que con los ultrasonidos, las ventajas que

presenta esta tecnología son debidas a los efectos térmicos y mecánicos que genera. Los tratamientos con ondas microondas, (800 W, 2450 MHz) previos al batido de la pasta mejoran en un 2,4 % el rendimiento de extracción del aceite sin comprometer su calidad (Clodoveo y Hachicha-Hbaieb, 2013).

- Pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV o PEF, Pulsed Electric Fields) (Ver apartado 3.5).

d) Factores de conservación.

Se recomienda que el consumo del aceite de oliva sea alrededor de los 12-18 meses tras su producción (Mancebo-Campos y col., 2008). Por este motivo, es de gran interés mejorar la conservación para poder preservar la calidad del aceite de oliva durante el mayor tiempo posible. Existen diversos factores que intervienen en la vida útil del aceite durante el almacenamiento. Entre estos factores destacan la exposición a la luz, la temperatura y el contacto con el oxígeno y metales (Kiritsakis y Dugan, 1984). Estos factores pueden provocar la aceleración de la oxidación y decoloración del aceite, incrementar el índice de peróxidos y disminuir la estabilidad.

3.4. Calidad reglamentada

La calidad reglamentada de los aceites de oliva viene definida por el Reglamento (CEE) 2568/1991 (y posteriores modificaciones) y el Reglamento (UE) 1348/2013, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva (Tabla 1). Estos reglamentos establecen la clasificación comercial de los aceites de oliva en función de parámetros físico-químicos y sensoriales.

Parámetros	Aceite de oliva virgen extra	Aceite de oliva virgen	Aceite de oliva lampante
Acidez (%)	$\leq 0,8$	$\leq 2,0$	$> 2,0$
Índice de peróxidos (mEq O₂/kg)	≤ 20	≤ 20	—
K₂₇₀	$\leq 0,22$	$\leq 0,25$	—
K₂₃₂	$\leq 2,50$	$\leq 2,60$	—
Mediana del frutado	> 0	> 0	0
Mediana de defectos	0	$\leq 3,5$	$> 3,5$
Esteres etílicos de los ácidos grasos (mg/ kg)	≤ 30	—	—

Tabla 1. Parámetros físico-químicos y sensoriales de los aceites de oliva para la clasificación comercial.

Fuente: CEE (1991) y UE (2013).

Según estos parámetros los aceites de oliva se clasifican en:

Aceite de oliva virgen extra: Este tipo de aceite es de máxima calidad, se obtiene directamente de aceitunas en buen estado únicamente por procedimientos mecánicos, con un sabor y olor característicos y libre de defectos sensoriales.

Aceite de oliva virgen: aceite de oliva que puede presentar ligeras alteraciones, bien sea en sus índices analíticos o en sus características sensoriales, pero siempre en pequeña escala. Estas alteraciones, sobre todo sensoriales, pueden ser prácticamente imperceptibles, pero deprecian la calidad respecto al virgen extra.

Aceite de oliva lampante: Presenta serias alteraciones en sus índices físico-químicos y/o sensoriales. Este aceite no puede consumirse tal y como se produce y necesariamente ha de someterse a un proceso de refinado para rectificar sus defectos y hacerlo comestible.

3.5. El uso de PEAV en la extracción de aceite de oliva

Este tratamiento consiste en la aplicación de campos eléctricos de alta intensidad (1–50 kV) y de corta duración (microsegundos), a un material colocado entre dos electrodos, sin apenas aumentar la temperatura del producto tratado, en este caso pasta de aceitunas, y por tanto, sin alterar sustancialmente sus propiedades sensoriales y nutricionales (Wouters y col., 2001). Este tratamiento provoca cambios estructurales en

las membranas celulares, formando poros, lo que se traduce en un aumento de su permeabilidad al paso de moléculas e iones, denominándose el proceso electroporación.

Uno de los modelos más aceptados para explicar la electroporación de la membrana plasmática es la “Teoría de la inestabilidad electromagnética” (Zimmermann y col., 1974; Zimmermann, 1986). Según esa teoría, al someter una célula a la acción de un campo eléctrico externo se produce un acúmulo de iones con cargas eléctricas de signo contrario a ambos lados de la membrana. Las fuerzas de atracción electrostáticas que se establecen entre las cargas provocan la compresión de la membrana y la formación de poros cuando éstas superan el límite de elasticidad de la membrana.

Los principales parámetros de procesado que caracterizan la tecnología de los PEAV son la intensidad del campo eléctrico, la forma y anchura del pulso, el tiempo de tratamiento, la energía específica y la frecuencia.

- La intensidad de campo eléctrico es la diferencia de potencial aplicada entre los dos electrodos donde se coloca el alimento, dividido por la distancia que los separa.
- Forma y anchura del pulso: En los tratamientos de pulsos eléctricos se emplean esencialmente dos tipos de pulsos los de caída exponencial y los de onda cuadrada. Es preferible trabajar con estos últimos ya que se determina con más precisión la intensidad del campo eléctrico y el tiempo de tratamiento aplicado.
- El tiempo de tratamiento se define como el tiempo total efectivo durante el cual se aplica el campo eléctrico.
- La energía aplicada por un pulso. Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los electrodos de la cámara de tratamiento, se genera una corriente eléctrica que circula a través del producto.
- La frecuencia se corresponde con el número de pulsos aplicados por unidad de tiempo. Una vez seleccionado el tiempo efectivo del tratamiento, la frecuencia determina el tiempo de permanencia del producto en la cámara de tratamiento donde se encuentra el producto, es decir, el tiempo de procesado.

Existen estudios muy favorables sobre la aplicación de PEAV en la mejora de extracción de aceite de oliva, entre los que destaca la aplicación de intensidades de campo eléctrico de 0,7 kV/cm y 30 pulsos y 1,3 kV/cm y 100 pulsos, obteniéndose un incremento en el porcentaje de extracción de aceite, comparado con la referencia sin pulsos. Dependiendo de la intensidad de los pulsos se consiguió un aumento en el rango de 6,5–7,4 % (expresado en gramos de aceite por 100 g de aceituna) (Guderjan y col., 2005).

En otro estudio (Abenoza y col., 2013), se aplicaron diferentes intensidades de campo eléctrico, en pasta de aceituna de la variedad Arbequina, en el rango de 0 a 2 kV/cm y a diferentes temperaturas de batido (15 y 26 °C). Se demostró que con una intensidad de campo eléctrico de 2 kV/cm y una temperatura de batido de 15 °C, mejoró la extracción en 1,7 kg de aceite por cada 100 kg de aceitunas. Sin embargo una temperatura de batido de 26 °C y una intensidad de campo eléctrico de 2 kV/cm no produjo mejoras en la extracción en comparación con la muestra control sin pulsar. La aplicación de PEAV no afectó negativamente al análisis sensorial del aceite.

A escala industrial, se trató pasta de aceitunas de la variedad Arbequina con una intensidad de campo eléctrico de 2 kV/cm y 13 pulsos. Tras 150 minutos de batido se consiguió el mismo rendimiento en la muestra control que tras 80 minutos de batido en la muestra pulsada (rendimiento de 10,86%), sin afectar negativamente al análisis sensorial (Abenoza, y col., 2012).

En otros estudios realizados a escala industrial, se ha mostrado un aumento significativo del contenido de polifenoles, fitoesteroles y tocoferoles (en un rango de 9,9 a 15%) al aplicar una intensidad de campo eléctrico de 2 kV/cm, respecto a la muestra control sin tratar. La muestra tratada por PEAV consiguió un aumento en el rendimiento de extracción de un 13,3% respecto a la muestra control, sin afectar negativamente al análisis sensorial (Puértolas y Martínez de Marañón, 2015).

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO.

El objetivo de la industria oleícola es la obtención de aceites con el mayor rendimiento y con el menor coste posible. Con el fin de optimizar estos aspectos comienzan a explorarse diversas innovaciones en el procesado del aceite de oliva. Estas

innovaciones persiguen aumentar el rendimiento del proceso de extracción del aceite, reducir el tiempo y/o temperatura de procesado y los costes energéticos y preservar o mejorar la calidad del producto.

Entre estas innovaciones destaca el uso de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEAV), que permite conseguir un aumento en la extracción de compuestos intracelulares, mediante la permeabilización de las células de la pulpa de la aceituna, facilitando la salida del aceite, y por tanto, mejorando el rendimiento de la extracción. Ésta tecnología aún es poco conocida en la industria oleícola, sin embargo, existen estudios en los que se aplican los PEAV en la extracción de aceite de oliva a bajas intensidades de campo eléctrico (no superiores a 2 kV/cm). El **objetivo general** de esta investigación fue comprobar si la aplicación de PEAV durante el proceso de extracción de aceite de oliva a una intensidad de campo eléctrico superior (de 3 kV/cm) mejoraba el rendimiento de extracción y caracterizar los parámetros de calidad de los aceites de oliva obtenidos.

Para alcanzar este objetivo, fue necesario plantear los siguientes **objetivos parciales**:

1. Extracción de aceite de oliva con la aplicación de PEAV a 3 kV/cm, a escala de laboratorio, y determinación del rendimiento de extracción.
2. Caracterización físico-química de los aceites de oliva.
3. Caracterización nutricional de los aceites de oliva.
4. Caracterización sensorial de los aceites de oliva.

Este trabajo de investigación se enmarca dentro del proyecto "FieldFOOD-Integration of PEF in food processing for improving food quality, safety and competitiveness" financiado por el Programa Marco de Investigación e Innovación de la Unión Europea Horizonte 2020 (Grant Agreement N° 635632).

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materia prima

Los estudios se realizaron con aceitunas de la variedad Arbequina de la campaña 2015-2016, recolectadas el 16 de Noviembre, procedentes de cultivos intensivos de la

provincia de Zaragoza. Las aceitunas fueron suministradas por Agrinarsa, almazara situada en Fuentes de Ebro (Zaragoza).

5.2. Determinaciones en el fruto

5.2.1. Índice de madurez

Para su determinación se tomaron 100 frutos según la metodología descrita por la estación de Olivicultura y Elaiotecnia de Jaén (Hermoso y col., 1991). Se evaluó la pigmentación del epicarpio y mesocarpio de las aceitunas mediante una escala basada en 7 niveles de pigmentación (Tabla 2 y Figura 3).

Nivel de pigmentación	Color del epicarpio y mesocarpio
0	Epicarpio verde intenso
1	Epicarpio verde – amarillento
2	Epicarpio con manchas rojizas en menos de la mitad del fruto
3	Epicarpio con manchas rojizas por todo el fruto
4	Epicarpio negro sin color en el mesocarpio
5	Epicarpio negro con color en el mesocarpio sin llegar a la mitad
6	Epicarpio negro con color en el mesocarpio sin llegar al hueso
7	Epicarpio negro y mesocarpio morado hasta el hueso

Tabla 2. Determinación del índice de madurez en función del nivel de pigmentación.



Figura 3. Distintos niveles de pigmentación de las aceitunas.

Fuente: www.miguelbarablog.files.wordpress.com

El índice de madurez se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de madurez} = \frac{Ax_0 + Bx_1 + Cx_2 + Dx_3 + Ex_4 + Fx_5 + Gx_6 + Hx_7}{\text{Número de frutos}}$$

Siendo:

A: número de frutos de nivel de pigmentación 0; B: número de frutos de nivel de pigmentación 1; C: número de frutos de nivel de pigmentación 2; D: número de frutos de nivel de pigmentación 3; E: número de frutos de

nivel de pigmentación 4; F: número de frutos de nivel de pigmentación 5; G: número de frutos de nivel de pigmentación 6; H: número de frutos de nivel de pigmentación 7.

5.3. Diseño experimental

El estudio se realizó siguiendo el diseño experimental descrito en la Figura 4. La tecnología PEAV se aplicó tras la molienda de las aceitunas y antes del batido de la pasta (ver apartado 5.4). Posteriormente, las pastas de aceituna se sometieron a diferentes condiciones de batido (dos temperaturas, 15 y 26 °C) durante el mismo tiempo (15 minutos).

Para cada una de las condiciones de batido se obtuvo un aceite de aceitunas sin tratar mediante PEAV (muestra control). Tras el batido de la pasta en las diferentes condiciones, se procedió a la centrifugación para la obtención del aceite (ver apartado 5.5).

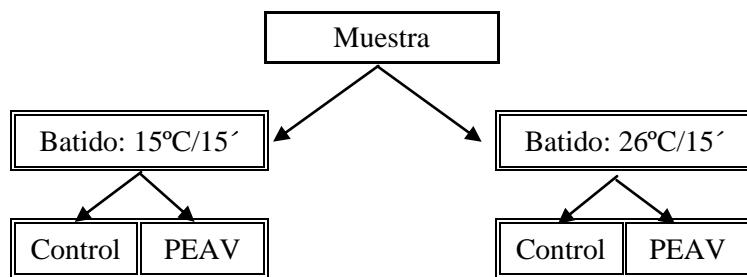


Figura 4. Diseño experimental.

Se realizó la caracterización físico-química, nutricional y sensorial de los aceites obtenidos para comprobar si el tratamiento de PEAV afectaba a su calidad.

5.4. Aplicación de Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV) a la pasta de aceitunas

Para el tratamiento de PEAV se siguió el esquema de la Figura 5.

Las aceitunas se molieron mediante un molino de martillos (accionado por un motor de 2 CV a 3000 rpm). En la pasta obtenida se aplicó un tratamiento total de 100 μ s (2 pulsos de 50 μ s) de duración, a una intensidad de campo eléctrico de 3 kV/cm. El equipo de PEAV utilizado en esta investigación (EPULSUS, Portugal) genera pulsos de onda cuadrada de una anchura variable y una frecuencia de hasta 200 Hz. Se utilizó una cámara de tratamiento colineal de 2 cm de espacio entre electrodos y 2 cm de diámetro interno.



Figura 5. Esquema del procesado del aceite con el tratamiento de PEAV.

Fuente: Propia.

Tras el tratamiento de la pasta se procedió a la extracción del aceite como se indica en el siguiente apartado (5.5).

5.5. Extracción de aceite de oliva y cálculo del rendimiento industrial

La extracción del aceite de cada una de las muestras fue realizado mediante un equipo Abencor (MC2 Ingenierías y Sistemas, Sevilla, España) siguiendo el proceso descrito por Martinez-Suarez y col., (1975). Este método reproduce, a escala de laboratorio, el proceso industrial de obtención de aceite de oliva. El equipo cuenta con un molino de martillos, una termobatidora y una centrífuga.

Para la muestra control las aceitunas se trituraron mediante un molino de martillos. La pasta resultante se distribuyó en pocillos (600 g de pasta/pocillo) y se sometió a batido en la termobatidora en las diferentes condiciones del estudio, 15 y

26 °C durante 15 minutos. Posteriormente, se vertió la pasta dentro de una centrifuga vertical tipo cesta que gira a 3500 rpm y se accionó durante 1 minuto. Se recogió el mosto oleoso por el orificio inferior en una probeta graduada.

Para la muestra tratada por PEAV (ver apartado 5.4) la pasta tras el tratamiento, se batió y centrifugó siguiendo el mismo proceso descrito para la muestra control.

Tanto en los aceites control como en los obtenidos por tratamiento con PEAV, tras dejar decantar se efectuó la lectura del volumen de aceite y se calculó el rendimiento industrial con la siguiente fórmula:

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

Siendo:

R: rendimiento de aceite en peso fresco (%)

V: volumen de aceite obtenido (ml)

d: densidad del aceite considerando una temperatura de 20°C (0,915 g/ml)

p: peso de la pasta (g)

5.6. Determinaciones en la pasta de aceitunas y en los alpeorujos

5.6.1. Humedad

Para determinar el contenido en humedad de las aceitunas, se molieron mediante un molino de martillos y una alícuota de la pasta resultante, se llevó a sequedad en estufa a 60 °C hasta llegar a pesada constante.

5.6.2. Cálculo del contenido graso sobre materia seca

Se tomaron alícuotas de pasta de aceituna (recogidas tras la molienda) y se secaron en estufa a 105 °C durante 24 horas para eliminar la humedad. Posteriormente se trituraron, y se tomó una muestra de 1 gramo. Se realizó la extracción de grasa en un equipo SoxtecTM 2055 (FOSS, Dinamarca) (Figura 6) utilizando como disolvente 70 ml de éter de petróleo para cada muestra a 115 °C. Se utilizaron cartuchos de celulosa de 80 mm de longitud y 33 mm de diámetro interno (CHMLAB Group, Barcelona, España).

En el caso de los alpeorujos recogidos tras la centrifugación, se determinó el contenido graso sobre materia seca siguiendo el mismo procedimiento que en la pasta de aceituna, pero en este caso el peso de la muestra fue de 2 gramos.

Se calculó el contenido graso sobre materia seca como el cociente entre los gramos de grasa obtenidos y los gramos de pasta seca de aceituna utilizada o alpeorupo.



Figura 6. SoxtecTM 2055

5.7 Determinaciones en los aceites de oliva obtenidos

5.7.1. Caracterización físico-química

5.7.1.1. Grado de acidez

Para la determinación de la acidez libre se utilizó el método oficial del Anexo II del Reglamento de la CEE nº 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).

Se pesaron $5 \pm 0,01$ g de aceite en un matraz Erlenmeyer. Se disolvió la muestra en 50 ml de la mezcla de éter etílico y etanol (relación a partes iguales volumen/volumen) previamente neutralizada. Se valoró agitando con la solución de hidróxido potásico 0,1 M hasta viraje del indicador.

La acidez se expresó en porcentaje de ácido oleico y se calculó a partir de la siguiente formula.

$$\% \text{ ácido oleico} = \frac{V \times N \times P_m}{P}$$

Siendo:

V: Volumen en ml de la solución de hidróxido potásico utilizada en la valoración.

N: Normalidad del hidróxido potásico utilizada.

Pm: Peso molecular del ácido oleico (282).

P: Peso en g de la muestra.

5.7.1.2. Índice de peróxidos

Se siguió el procedimiento descrito por el Anexo III del Reglamento de la CEE 2586/91 para la determinación del índice de peróxidos (CEE, 1991).

Se pesaron $1,5 \pm 0,01$ g de aceite en un matraz de 250 ml de cierre esmerilado. Se agregaron 10 ml de cloroformo y 15 ml de ácido acético glacial. Tras ésto, se adicionó 1 ml de la solución saturada de yoduro potásico. Se cerró el matraz y se mantuvo en oscuridad durante 5 minutos. Posteriormente, se añadieron 75 ml de agua destilada y se homogeneizó agitando vigorosamente. Se valoró el yodo liberado con tiosulfato sódico 0,01 N agitando en presencia de almidón. El viraje se produjo al pasar del color violeta al blanco sucio. De la misma forma, se realizó un blanco (sin la muestra de aceite).

Los resultados fueron expresados en miliequivalentes de oxígeno activo por kg de muestra mediante la siguiente fórmula.

$$\text{Índice de peróxidos} = \frac{V \times N \times 1000}{P}$$

Siendo:

V: ml de solución valorada de tiosulfato sódico empleados en el ensayo.

N: Normalidad exacta de la solución de tiosulfato sódico empleada.

P: Peso en gramos de la muestra analizada.

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

Para la determinación de los coeficientes de extinción en el ultravioleta se empleó el método oficial del Anexo IX del Reglamento de la CEE nº 2568/91 (CEE, 1991).

Se pesaron $0,25 \pm 0,01$ g de aceite en un matraz aforado de 25 ml y se enrasó con ciclohexano. Se homogeneizó la muestra agitando vigorosamente. La muestra fue filtrada mediante una jeringa de cristal con un filtro de poliamida de $0,45 \mu\text{m}$ y finalmente, se llenaron las cubetas. Se midieron las extinciones a las longitudes de onda comprendidas entre 232 y 270 nm, utilizando ciclohexano como referencia.

Las extinciones específicas o coeficientes de extinción de ambas longitudes de onda se calcularon de la siguiente fórmula.

$$k\lambda = \frac{E\lambda}{e \times c}$$

Siendo:

$k\lambda$: extinción específica a la longitud de onda lambda.

$E\lambda$: extinción medida a la longitud de onda lambda.

e: espesor de la cubeta en cm.

c: concentración de la disolución en gramos por 100 ml.

5.7.1.4. Ésteres etílicos de los ácidos grasos

El 1 de marzo de 2014 entró en vigor el Reglamento (UE) Nº 1348/2013 de la Comisión, de 16 de diciembre de 2013, que modifica el Reglamento (CEE) Nº 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 que obliga a la determinación de los ésteres etílicos de los ácidos grasos en los aceites de oliva virgen extra.

La metodología para la determinación queda recogida en el anexo XX de dicho reglamento (UE, 2013).

5.7.2. Caracterización nutricional

5.7.2.1. Determinación del contenido en α -tocoferol

Se disolvió $1 \pm 0,01$ g de aceite en un matraz aforado de 10 ml enrasando con hexano. La solución resultante se pasó a través de una jeringa de cristal con un filtro de poliamida de 0,45 μm . Se rellenó un vial ámbar de 2 ml de capacidad provisto de un tapón con septum.

La muestra se inyectó en un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) Hewlett Packard (Agilent–Serie 1100) equipado con los siguientes módulos: un desgasificador (G1313A, Serie 1100), una bomba cuaternaria (G1311A, Serie 1100), un inyector automático (G1313A, Serie 1100) y un detector de matriz de fotodiódos (DAD) (G1315 B, Serie 1100). Se utilizó el software HP ChemStation 3365. Se empleó una

columna Zorbax SB-C₁₈ de fase reversa (dimensiones, 150 x 4,6 mm y tamaño de partícula 3,5 μm) (Agilent Technologies).

El volumen de inyección fue de 20 μl . La fase móvil utilizada fue acetonitrilo/agua Mili-Q en proporción 99/1 (relación volumen/volumen) en condiciones isocráticas y con un flujo de la fase móvil de 1 ml/min. El tiempo de análisis fue de 30 minutos. Los cromatogramas se registraron a 295 nm.

Previamente, se inyectaron concentraciones crecientes (de 0,01 a 0,08 mg/ml) de una solución estándar de α -tocoferol para construir la recta de calibrado, donde interpolar posteriormente, para poder cuantificar los valores obtenidos en las muestras.

Los resultados se expresaron en mg de α -tocoferol por kg de aceite.

5.7.2.2. Determinación del contenido en fenoles totales

Para la preparación de la muestra se siguió el método descrito por Favati y col., (1994) adaptado. En primer lugar se pesó 1 gramo de aceite de oliva en un matraz aforado de 10 ml y se enrascó con hexano. Se homogeneizó bien la muestra.

Los fenoles fueron extraídos mediante extracción en fase sólida (SPE) en una estación de vacío Supelco. Para ello, se utilizaron cartuchos Isolute C₁₈ de 6 ml y 1 g de fase sólida (Biotage, Suecia). El acondicionamiento de la columna se realizó con 10 ml de metanol y 10 ml de hexano. Despues, se cargó la muestra y se lavó la columna con 15 ml de hexano y se eluyó con 10 ml de metanol. El eluato recogido se llevó a sequedad total a 40 °C y 90 rpm en rotavapor, y el residuo seco se redissolvió en 5 ml de metanol.

El extracto obtenido mediante la extracción en fase sólida se utilizó para la determinación colorimétrica de los fenoles totales mediante el reactivo de Folin-Ciocalteau.

Para ello, previamente se realizó una curva patrón de ácido gálico en metanol en un rango de concentraciones de 0,02 mg/ml a 0,16 mg/ml.

Tanto para las disoluciones estándar como para las muestras se siguió el siguiente protocolo: en matraces aforados de 25 ml se depositaron 2,5 ml de la solución estándar o del extracto, 1,25 ml del reactivo de Folin–Ciocalteau, 2,5 ml de carbonato sódico al 7,5 % alcanzando el volumen final con agua Mili–Q. Las disoluciones se dejaron reposar en la oscuridad durante 1 hora. Transcurrido ese tiempo, se realizó el análisis espectrofotométrico a 725 nm.

El contenido en fenoles totales se expresó en mg de ácido gálico por kg de aceite.

5.7.2.3. Estabilidad oxidativa

La medida de la estabilidad de los aceites frente a la oxidación o enranciamiento se determinó mediante el equipo Rancimat 743 (Metrohm, Suiza). Las muestras se analizaron por duplicado, pesando $3 \pm 0,01$ g de aceite para cada una de ellas, sometiéndolas a una oxidación acelerada mediante un flujo de aire de 20 l/h y a una temperatura de 120 °C.

Desde que comienza el proceso de oxidación, se desprenden componentes de degradación volátiles que son retenidos en los vasos de medida en los que se encuentra un electrodo. A través de él, se registra de forma continua la conductividad, consiguiendo unas curvas de oxidación (conductividad frente a tiempo) cuyo punto de inflexión es el tiempo de inducción expresado en horas (Laübli y Brüttel, 1986).

5.7.2.4. Contenido en pigmentos

La valoración global del contenido en pigmentos clorofílicos y carotenoides se realizó siguiendo el método propuesto por Mínguez–Mosquera y col., (1991).

Se disolvieron $3 \pm 0,01$ g de aceite en un matraz de 10 ml enrasando con ciclohexano. Se homogeneizó la muestra. Para la fracción de carotenos y clorofilas se midió la absorbancia máxima a 470 y 670 nm respectivamente en cubetas de vidrio de 1 cm en un espectrofotómetro Avantes AvaSpec–1024. Se aplicaron los correspondientes coeficientes de absorción molar para cada uno. En el caso de los carotenos es de 2.000 (coeficiente de absorción molar de la luteína, que es el principal caroteno) y en las

clorofilas 630 (coeficiente de absorción molar de la feofitina, pigmento clorofílico mayoritario del aceite de oliva). Posteriormente se calculó el contenido de carotenos y clorofilas mediante las siguientes fórmulas:

$$\text{Carotenos} = \frac{A_{470} \times 10^6}{2000 \times 100 \times \text{densidad}}$$

$$\text{Clorofilas} = \frac{A_{670} \times 10^6}{613 \times 100 \times \text{densidad}}$$

Los resultados se expresaron en mg de luteína/ kg de aceite en el caso de los carotenos y en mg de feofitina/ kg de aceite para las clorofilas.

5.8. Análisis sensorial

El análisis sensorial de las muestras de aceite se llevó a cabo siguiendo las normas del Consejo Oleícola Internacional (COI, 1996) y sus posteriores modificaciones y el Reglamento (CEE) 2568/91 (CEE, 1991) y sus posteriores modificaciones (Reglamento (CE) 640/2008) (CE, 2008).

Las muestras fueron enviadas al Panel de Catadores de Aceite de Oliva Virgen del Bajo Aragón, con sede en Alcañiz (Teruel).

Se valoraron atributos positivos (frutado, amargo y picante) y negativos (atrojado, rancio, metálico, avinado/avinagrado, moho, etc.) en una escala no estructurada de 10 cm. El perfil de los aceites se obtuvo calculando la mediana de las intensidades de los distintos atributos otorgados por todos los catadores.

5.9. Tratamiento estadístico de los datos

Todos los análisis de los diferentes parámetros estudiados se llevaron a cabo por triplicado. Los resultados de las distintas determinaciones fueron procesados mediante el programa GraphPad Prism versión 5.0 (GraphPad Software, Inc., EE.UU.) y fueron expresados como valores medios \pm desviación estándar. Las diferencias significativas entre las muestras tratadas por PEAV y control con las mismas condiciones de batido

fueron estudiadas mediante análisis de varianza (ANOVA) utilizando un t-test con un nivel de confianza del 95%.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Determinaciones en el fruto y en la pasta de aceitunas

La Tabla 3 muestra el índice de madurez, humedad y contenido graso sobre materia seca.

I. Madurez	3,5 ± 0,03
Humedad (%)	56,17 ± 0,52
Grasa sobre materia seca (pasta aceitunas) (%)	47,91 ± 0,35

Tabla 3. Determinaciones en el fruto y en la pasta de aceitunas.

El proceso de maduración está vinculado con la valoración de la calidad en frutos. La maduración de las aceitunas tiene lugar al comienzo del verano y dura hasta el inicio del invierno. Durante este periodo, se produce un cambio de pigmentación del epicarpio y mesocarpio, que va desde el verde (debido a las clorofillas), hasta tonalidades moradas (debidas a la formación de antocianinas) al final del proceso de maduración. En la variedad Arbequina, dado que tiene la síntesis de antocianos muy lenta (Tovar de Dios, 2001; Roca y Mínguez-Mosquera, 2003), el epicarpio solo se colorea parcialmente y no se llegan a ver los estados de maduración más altos, por lo que el índice de maduración no superó el valor de 3,5 (epicarpio negro sin color en el mesocarpio).

Tras la molienda de aceitunas se realizaron las determinaciones de grasa y humedad en la pasta. La humedad fue del 56 %. El porcentaje graso sobre materia seca aumenta en la aceituna durante el periodo de maduración generando un incremento del rendimiento de extracción (Baccouri y col., (2008). En la pasta de aceitunas obtenida tras la molienda, se obtuvo un 47,9% de contenido graso sobre materia seca. Estos valores fueron similares a los obtenidos en estudios de maduración de ésta misma variedad (Abenoza y col., 2015).

6.2. Determinación del rendimiento industrial y del contenido graso sobre materia seca en los alpeorujos

La Tabla 4 muestra los resultados de grasa sobre materia seca en los alpeorujos y el rendimiento industrial del aceite de oliva, tanto de los aceites tratados por PEAV como de los controles.

	Batido a 15°C/15'		Batido a 26°C/15'	
	Control	PEAV	Control	PEAV
Rendimiento industrial (%)	7,99 ± 0,78 ^a	8,54 ± 0,58 ^a	9,10 ± 0,26 ^a	10,90 ± 0,28 ^b
Grasa sobre materia seca (alpeorujos) (%)	28,15 ± 0,52 ^a	26,76 ± 0,30 ^a	27,75 ± 1,52 ^a	25,61 ± 2,54 ^a

Tabla 4 Rendimiento industrial y contenido graso sobre materia seca de los alpeorujos. Distintas letras en las mismas condiciones de batido indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

El rendimiento de extracción es considerado el principal parámetro para determinar la eficiencia económica de la extracción del aceite de oliva. Se observó un aumento del rendimiento industrial de extracción del aceite de oliva con el tratamiento PEAV en ambas condiciones de batido respecto a la muestra control. Esta diferencia fue estadísticamente significativa cuando el batido se realizó a 26 °C. En el caso del aceite de oliva tratado por PEAV batido a 15 °C durante 15 minutos, mejoró el rendimiento industrial en un 7% (0,55 Kg de aceite por cada 100 Kg de aceitunas procesadas) respecto a la muestra control. En la muestra obtenida con el tratamiento PEAV con unas condiciones de batido de 26 °C durante 15 minutos, el rendimiento de extracción mejoró en un 19% (1,8 Kg de aceite por cada 100 Kg de aceitunas procesadas) respecto a la muestra control. La mejora en el rendimiento de extracción al aumentar la temperatura corresponde con los resultados obtenidos por Aguilera y col., (2010) e Inarejos-García y col., (2009).

Los valores de mejora del rendimiento a bajas temperaturas de batido (15 °C) en los aceites tratados por PEAV son similares a los obtenidos por Guderjan y col., (2005), que obtuvieron aumentos de la extracción en el rango de 6,5–7,4 % al aplicar PEAV con unas intensidades de campo eléctrico de 0,7 kV/cm y 1,3 kV/cm. Abenoza y col., (2013)

al aplicar PEAV con una intensidad de campo de 2 kV/cm, y una temperatura de batido de 15 °C durante 15 minutos, obtuvieron un incremento estadísticamente significativo respecto a la muestra control mejorando casi un 8 %. Sin embargo, estos autores no obtuvieron una mejora estadísticamente significativa en la extracción al aumentar la temperatura de batido en el aceite tratado por PEAV, en este caso el rendimiento sólo se incrementó en un 4,8 %. A la vista de los resultados, se obtiene mayor incremento en el rendimiento cuando el tratamiento por PEAV se realiza con campos eléctricos de 3 kV/cm y la temperatura de batido es de 26 °C.

En lo que respecta al contenido graso sobre materia seca en los alpeorujos, en ambas condiciones de batido se redujo el contenido en la muestra tratada por PEAV, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Esto se corresponde a una mayor extracción de aceite de oliva en las muestras tratadas.

6.3. Caracterización físico-química de los aceites de oliva

La Tabla 5 muestra los parámetros físico-químicos de los aceites obtenidos tras el tratamiento con PEAV y control.

	Batido a 15°C/15'		Batido a 26°C/15'	
	Control	PEAV	Control	PEAV
Acidez (% ácido oléico)	0,15 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,00 ^a	0,16 ± 0,01 ^a	0,17 ± 0,00 ^a
I. peróxidos (meq de O ₂ activo/kg grasa)	2,87 ± 0,23 ^a	3,06 ± 0,12 ^a	2,64 ± 0,34 ^a	3,63 ± 0,03 ^b
K ₂₃₂	1,23 ± 0,08 ^a	1,24 ± 0,05 ^a	1,32 ± 0,01 ^a	1,30 ± 0,00 ^a
K ₂₇₀	0,07 ± 0,01 ^a	0,06 ± 0,00 ^a	0,07 ± 0,00 ^a	0,09 ± 0,00 ^a
Ésteres etílicos de los ácidos grasos (mg/kg)	< 30	< 30	< 30	< 30

Tabla 5 Parámetros físico-químicos de los aceites control y los aceites tratados con PEAV, en diferentes condiciones de procesado. Distintas letras en las mismas condiciones de batido indican diferencias estadísticamente significativas (p<0,05).

Todos los aceites estudiados, tanto las muestras control como las muestras tratadas por PEAV, mostraron valores inferiores de acidez ($\leq 0,8$), índice de peróxidos (≤ 20 miliequivalentes O₂ activo/Kg), K₂₃₂ ($\leq 2,5$), K₂₇₀ ($\leq 0,22$) y ésteres etílicos de los ácidos grasos (< 30) a los máximos establecidos por la legislación para la categoría de

aceite de oliva virgen extra (ver apartado 3.4). En general el tratamiento por PEAV no afectó de forma significativa a los parámetros físico-químicos.

Los valores de acidez relativamente bajos se correlacionan con la elaboración del aceite de oliva a partir de frutos sanos y procesados inmediatamente después de la recolección. La aplicación de tratamientos de PEAV a la pasta de aceituna a campos eléctricos de 3 kV/cm no produjo diferencias estadísticamente significativas en el parámetro de acidez de los aceites de oliva obtenidos en las diferentes condiciones de tratamiento. Sin embargo, en otros estudios se ha observado un aumento de la acidez (Puértolas y Martínez de Marañón, 2015; Guderjan y col., 2007) al aplicar un tratamiento de PEAV de 2 kV/cm.

El índice de peróxidos valora el estado de la oxidación inicial del aceite, por lo que generalmente el aceite recién extraído no presenta valores altos. Los coeficientes de extinción específica (K_{232} y K_{270}) aumentan conforme la alteración oxidativa es mayor.

Tampoco se observaron diferencias significativas en los resultados de índice de peróxidos y coeficientes de extinción, excepto en el aceite de oliva obtenido a 26 °C durante 15 minutos en el cual se observó un aumento del índice de peróxidos estadísticamente significativo en la muestra tratada por PEAV respecto a la muestra control, aunque desde el punto de vista práctico es irrelevante puesto que está muy por debajo de los límites establecidos por la legislación. Abenoza y col., (2013) tampoco obtuvieron diferencias significativas en estos parámetros al comparar el aceite control con el obtenido tras el tratamiento PEAV (2 kV/cm).

Los ésteres etílicos se producen por la reacción de los ácidos grasos libres y el etanol que, a su vez, proviene de la fermentación etílica de los hidratos de carbono de la aceituna. Es decir, su valor es mayor en los aceites cuanto mayor es el deterioro (fermentaciones indeseables) de la aceituna. En todos los aceites estudiados, los valores obtenidos fueron inferiores a los límites establecidos por la legislación para la categoría de aceite de oliva virgen extra.

6.4. Caracterización nutricional

6.4.1. Contenido en α -tocoferol

La Figura 7 muestra el contenido en α -tocoferol de los aceites de oliva obtenidos, tanto de las muestras tratadas por PEAV como de las muestras control.

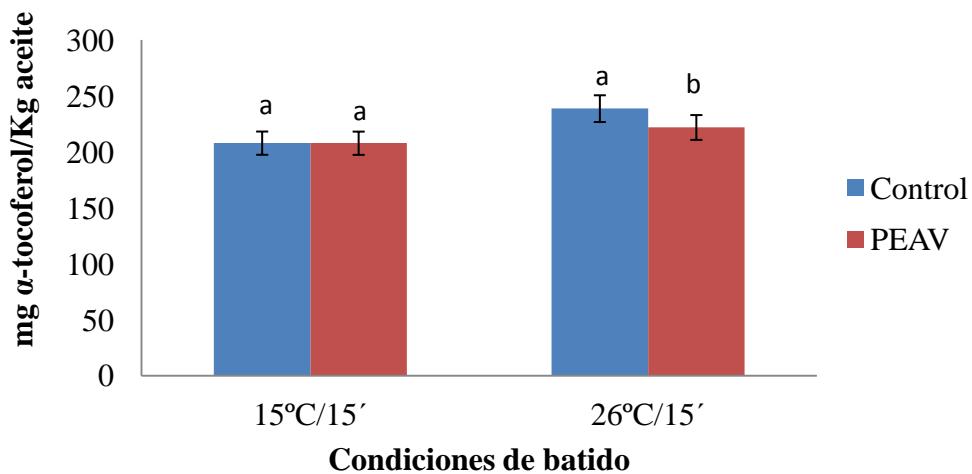


Figura 7 Contenido en α -tocoferol de los aceites control y los aceites tratados por PEAV, en diferentes condiciones de procesado. Distintas letras en las mismas condiciones de batido indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

El contenido en tocoferoles junto con los compuestos fenólicos son los dos compuestos más relacionados con la estabilidad oxidativa del aceite de oliva, y por tanto, con su vida útil.

Los resultados obtenidos mostraron que a condiciones de batido de 15 °C durante 15 minutos, no se observó diferencias significativas en el contenido de α -tocoferol entre la muestra control y las muestra tratada por PEAV. Sin embargo, al realizar el batido a 26 °C durante 15 minutos, el aceite de oliva control presentó un contenido en α -tocoferol de 238 mg/Kg frente a los 221 mg/Kg en el aceite tratado con PEAV (redujo la concentración de α -tocoferol en un 7%), lo que supone una reducción estadísticamente significativa. Estas diferencias en la extracción de α -tocoferol podrían deberse a las diferentes condiciones de batido como indica Ranalli y col., (2005) y además, podrían atribuirse a la variabilidad de la materia prima. Estos resultados

obtenidos a una intensidad de campo eléctrico de 3 kV/cm contrastan con los estudios obtenidos por Abenoza y col., (2013) y Puértolas y Martínez de Marañon (2015), que observaron un aumento del contenido de α -tocoferol de 1,67% y 25% respectivamente, al tratar aceite de oliva mediante PEAV con intensidades de campo eléctrico de 2 kV/cm.

6.4.2. Fenoles totales

La Figura 8 muestra el contenido en fenoles totales de los aceites de oliva obtenidos, tanto de las muestras tratadas por PEAV como de las muestras control.

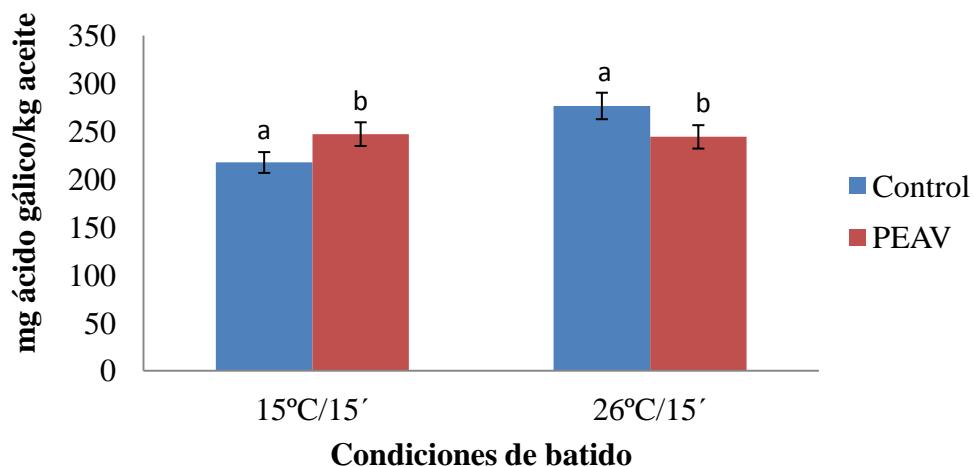


Figura 8 Contenido en fenoles totales del aceite control y el aceite tratado por PEAV, en diferentes condiciones de procesado. Distintas letras en las mismas condiciones de batido indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

El contenido de compuestos fenólicos es importante para la evaluación de la calidad de un aceite, dado que los fenoles naturales, presentes en la aceituna están relacionados con la estabilidad oxidativa del aceite durante el almacenamiento (Lozano-Sánchez y col., 2010), y además son responsables del característico sabor amargo de los aceites.

Se ha demostrado por diversos autores que el contenido de fenoles totales en el aceite de oliva normalmente oscila entre 50 y 1000 mg/Kg, dependiendo de varios factores, tales como la variedad de oliva, condiciones climáticas, o procedimiento de

extracción del aceite de oliva (Vierhuis y col., 2001; Gimeno y col., 2002; Pardo y col., 2007; Cicerale y col., 2009). Numerosos estudios demuestran que incrementos de la temperatura de batido favorecen la extracción de los compuestos fenólicos (Di Giovacchino, 1991; Ranalli y col., 2001; Inarejos-García y col., 2009; Taticchi y col., 2013).

Los resultados obtenidos mostraron que en las muestras tratadas por PEAV a temperaturas más bajas de batido, se obtuvo un aumento estadísticamente significativo de la cantidad de fenoles totales extraídos en comparación con la muestra control. Sin embargo, a temperaturas más altas de batido, el tratamiento por PEAV reduce significativamente el contenido de fenoles totales. A temperaturas más bajas se consigue un aumento de 13% en la cantidad de fenoles totales, resultados que coincidirían con los obtenidos por Puértolas y Martínez de Marañón (2015), al aplicar un tratamiento de PEAV de 2 kV/cm, con el que obtuvieron un aumento en la extracción de fenoles totales de un 11,5%.

Se ha demostrado que los tratamientos de PEAV mejoran la extracción de los compuestos fenólicos, sobre todo, de la piel de la uva en el proceso de fermentación/maceración en la elaboración del vino tinto (Puértolas y col., 2010). Probablemente es debido a que la extracción de compuestos fenólicos se produce durante varios días, mientras que en el aceite de oliva la extracción sólo se produce durante el tiempo (breve) que dura el procesado. En el caso de la extracción de los compuestos fenólicos de la aceituna parece ser más eficaz una mayor temperatura de batido que la aplicación de un tratamiento de PEAV. Los incrementos de temperatura en el batido facilitan su extracción, por lo que el efecto que producen tecnológicamente los PEAV es menor.

6.4.3. Pigmentos

La Figura 9 muestra el contenido en pigmentos carotenoides de los aceites de oliva obtenidos, tanto de las muestra tratadas por PEAV como de las muestras control.

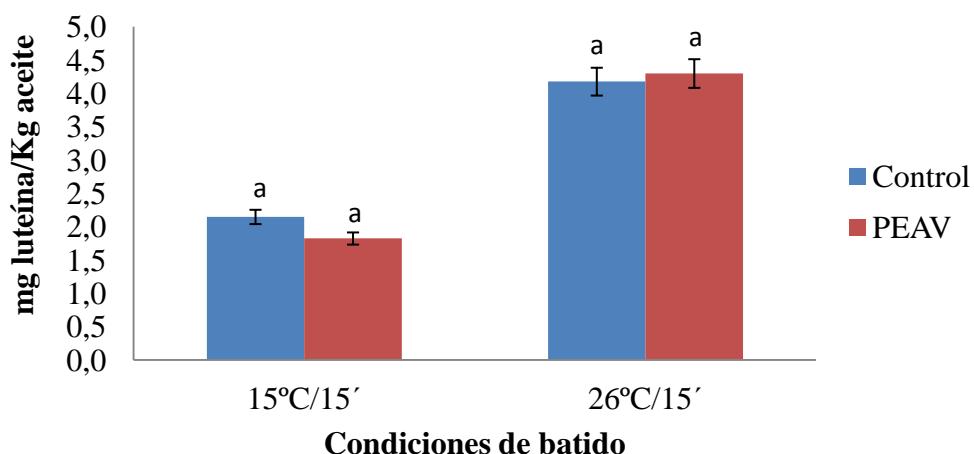


Figura 9. Pigmentos (carotenoides) de los aceites control y los aceites tratados por PEAV, en diferentes condiciones de procesado. Distintas letras en las mismas condiciones de batido indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

La Figura 10 muestra el contenido en pigmentos clorofílicos de los aceites de oliva obtenidos, tanto de las muestras tratadas por PEAV como de las muestras control.

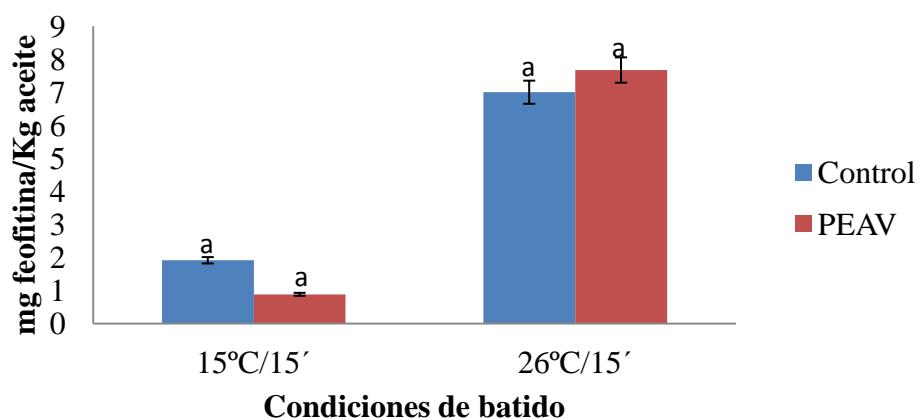


Figura 10. Pigmentos (clorofillas) de los aceites control y los aceites tratados por PEAV, en diferentes condiciones de procesado. Distintas letras en las mismas condiciones de batido indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

Las clorofillas y carotenoides son los principales pigmentos del aceite de oliva (Mínguez-Mosquera y col., 1991; Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera, 1996).

Los resultados obtenidos muestran que no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de pigmentos en los aceites de oliva al obtenerlos por tratamiento con PEAV. Las temperaturas más altas de batido facilitan la extracción de pigmentos (Luaces y col., 2005; Ranalli y col., 2005), razón por la cual a 26 °C se obtuvieron concentraciones más altas de pigmentos (Figuras 9 y 10) con valores de alrededor de 4 mg/kg de carotenos y de casi 8 mg/kg de clorofillas.

6.4.4. Estabilidad oxidativa

La Figura 11 muestra el tiempo de inducción (en horas) de los aceites de oliva obtenidos, tanto de las muestras tratadas por PEAV como de las muestras control.

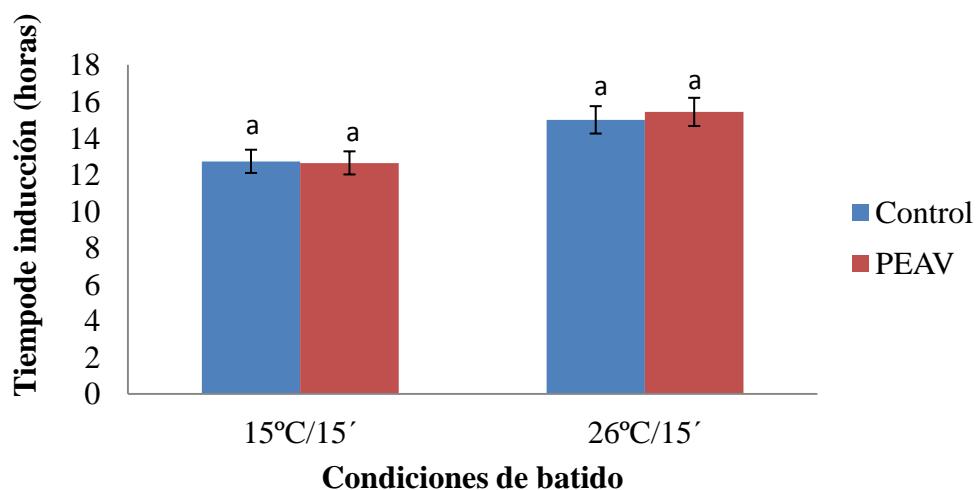


Figura 11. Estabilidad oxidativa de los aceites control y los aceites tratados por PEAV, en diferentes condiciones de procesado. Distintas letras en las mismas condiciones de batido indican diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$).

La estabilidad oxidativa medida en Rancimat es una medida que proporciona una buena estimación de la susceptibilidad del aceite a la degeneración auto-oxidativa, que en los aceites de oliva conduce fundamentalmente a su enranciamiento, principal causa de alteración.

El grado de deterioro o enranciamiento de un aceite depende mucho de las condiciones de almacenamiento, así como de la variedad de aceituna. La variedad

Arbequina presenta una baja estabilidad, debido a su composición en ácidos grasos (contenido intermedio en ácido oleico y alto en ácido linoleico) (Tovar de Dios, 2001).

El tiempo de inducción en este estudio, aumentó en las condiciones de batido de 26 °C durante 15 minutos respecto al batido realizado a 15 °C durante 15 minutos, probablemente debido a la mayor cantidad de fenoles y de pigmentos extraídos a temperaturas más altas de batido. Sin embargo no se observaron diferencias significativas entre las muestras control y las tratadas por PEAV respecto a cada temperatura de batido.

6.5. Caracterización sensorial de los aceites de oliva

La Figura 12 muestra el perfil sensorial de los aceites de oliva obtenidos, tanto de las muestras tratadas por PEAV como de las muestras control.

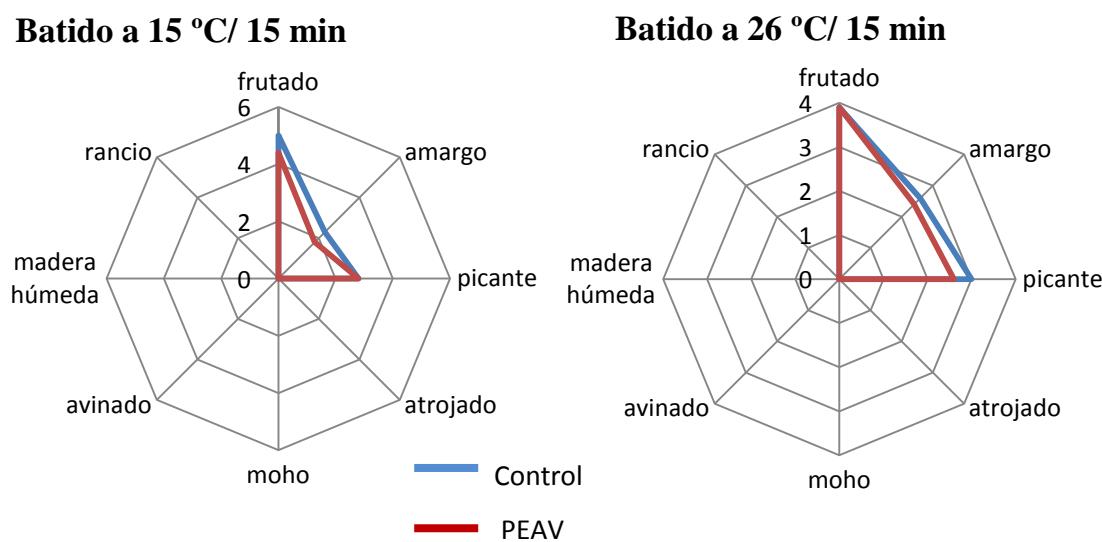


Figura 12. Perfil sensorial del aceite control y el aceite tratado por PEAV, batidos a 15 y 26 °C respectivamente durante 15 minutos.

En ambas condiciones de batido (15 y 26 °C, durante 15 minutos) en la muestra control y en la muestra tratada por PEAV no se detectaron defectos sensoriales, por lo que los aceites mostraron perfiles sensoriales correspondientes a la categoría de aceite de oliva virgen extra. El tratamiento PEAV prácticamente no afectó a los atributos

sensoriales (frutado, amargo y picante). Sólo se apreció en los aceites tratados un frutado, amargo y picante ligeramente inferior. Estudios realizados por Abenoza y col., (2013) y Puértolas y Martínez de Marañón, (2015), tampoco observaron defectos sensoriales derivados del tratamiento con PEAV.

7. CONCLUSIONES

- El tratamiento de PEAV a 3 kV/cm mejoró el rendimiento de extracción del aceite de oliva significativamente, cuando el batido se realizó a 26 °C. Esta mejora fue superior a la obtenida por otros autores a intensidades de campo eléctrico menores.
- En general, en todos los aceites, los parámetros físico-químicos establecidos para la clasificación comercial de los aceites de oliva (acidez, índice de peróxidos, K₂₃₂, K₂₇₀ y ésteres étilicos de los ácidos grasos) permanecieron por debajo de los límites máximos establecidos por la legislación para los aceites de oliva virgen extra.
- Los aceites de oliva obtenidos mediante PEAV y batidos a 15 °C mostraron un incremento significativo de los fenoles totales (13 %) respecto al control, superior a lo descrito por otros autores, no mostrando prácticamente diferencias en los demás parámetros nutricionales (α -tocoferol, pigmentos y estabilidad oxidativa). Sin embargo, los aceites de oliva obtenidos con PEAV y batidos a 26 °C mostraron una reducción significativa de los valores de α -tocoferol y fenoles totales (7 y 12 % respectivamente). En este caso el efecto de la temperatura de batido podría ser superior al que ejercen los PEAV.
- La aplicación del tratamiento de PEAV a intensidades de 3 kV/cm no produjo defectos sensoriales en los aceites de oliva y, por tanto, conservaron su categoría comercial.
- En las condiciones experimentales de este trabajo el tratamiento por PEAV seguido de un batido a 26 °C en la pasta de aceitunas sería una alternativa para aumentar el rendimiento de extracción de aceite de oliva. Si se pretende mejorar el contenido de fenoles totales sería más idóneo realizar un batido a 15 °C.

8. CONCLUSIONS

- 3 kV/ cm PEF treatment at 26°C malaxation temperature increased significantly the olive oil extraction yield. This improvement was greater than that obtained by other authors at lower electric field intensities.

- In general, in all olive oils, physico-chemical parameters established for the commercial classification of olive oils (acidity, peroxide value, K₂₃₂, K₂₇₀ and ethyl esters of fatty acids) remained below the limits established by legislation for extra virgin olive oils.

- PEF obtained olive oils at 15 °C malaxation temperature showed a significant increase in total phenols (13%) compared to control higher than those described by other authors, showing practically no differences in other nutritional parameters (α -tocopherol pigments and oxidative stability). However, olive oils obtained with PEF at 26 °C malaxation temperature showed a significant reduction of the values of α -tocopherol and total phenols (7 and 12% respectively). In this case the effect of malaxation temperature could be higher than that exerted by PEF.

- PEF treatment at intensities of 3 kV/ cm didn't produce sensory defects in olive oil and, therefore, kept their commercial category.

- In the experimental conditions of this study PEF treatment followed by 26 °C malaxation temperature in the olive paste would be an alternative to increase the olive oil extraction yield. If it is intended to increase the content of total phenols it would be more appropriate to make a 15 °C malaxation temperature.

9. APORTACIONES Y VALORACIÓN DE LA ASIGNATURA

Las aportaciones que me ha supuesto realizar en este trabajo en materia de aprendizaje son varias. En primer lugar, he aprendido a manejarme en el laboratorio ya que el trabajo lo realizaba yo solo, aunque con ayuda de profesores y becarios cuando lo necesitaba. El trabajo ha sido más autónomo e individual, cosa que he agradecido porque he aprendido a valerme más por mí (en la carrera todos los trabajos de laboratorio y prácticas son grupales). También he podido profundizar en la tecnología

de los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje, conocer aplicaciones y trabajos realizados con ellos.

En definitiva, este trabajo, opino que nos ayuda muchísimo a los estudiantes, a evaluar y razonar lo aprendido a lo largo de la carrera y poder aplicarlo, en parte, a tu trabajo de investigación. Trabajas más con los profesores y profesionales en la universidad lo que siempre aporta calidad a tu investigación ya que aprendes mucho de ellos: realizar análisis, obtener y analizar los datos, redactar informes, etc.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abenoza, M., Benito, M., Álvarez, I., Sánchez-Gimeno, A.C., Raso, J. (2012). Industrial trial on application of pulsed electric fields for improving olive oil extraction. International Conference Bio & Food Electrotechnologies BFE 2012. ProdAI Scarl. Salerno, Italy. pp 1367-1373.
- Abenoza, M., Benito, M., Saldaña, G., Álvarez, I., Raso, J., Sánchez-Gimeno, A.C. (2013). Effects of pulsed electric field on yield extraction and quality of olive oil. Food and Bioprocess Technology 6, 1376-1373.
- Abenoza, M., Lasa, J.M., Benito, M., Oria, R., Sánchez-Gimeno, A. C. (2015). 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, 83-92.
- Aguilera, M. P., Beltran, G., Sanchez-Villasclaras, S., Uceda, M., Jimenez, A. (2010). Kneading olive paste from unripe 'Picual' fruits: Effect on oil process yield. Journal of Food Engineering 97, 533-538.
- Aparicio, R., Harwood, J. (2003). Manual del aceite de oliva. AMV Ediciones Mundiprensa (Madrid).
- Baccouri, O., Guerfel, M., Baccouri, B., Cerretani, L., Bendini, A., Lercker, G., Zarraouk, M., Ben Miled, D.D. (2008). Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oil with regard to fruit ripening. Food Chemistry 109, 743-754.
- Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. (2008). El cultivo del olivo. Ed. Junta de Andalucía y MundiPrensa. Sevilla, (España).
- Beltrán, G., Jímenez, A., Aguilera, M. P. (2010). Utilización de microtalco natural como coadyuvante tecnológico en la extracción de aceite. Vida Rural 318, 36-38.
- CE, 2001. Reglamento (CE) N° 1513/2001 del Consejo que modifica el Reglamento N° 136/66/CEE y el Reglamento (CE) N° 1638/98, en lo que respecta a la prolongación del régimen de ayuda y la estrategia de la calidad para el aceite de oliva. Diario Oficial de las Comunidades Europeas L201, 4-7.
- CE, 2008. Reglamento (CE) N° 640/2008 de la Comisión de 4 de Julio de 2008 que modifica el Reglamento (CEE) N° 1568/91 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, L178, 11-16.
- CEE, 1991. Reglamento (CEE) 2568/91 relativo a las características del aceite de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre su método de análisis. Diario Oficial de la Unión Europea, L248, 1-83.
 - Cicerale, S., Conlan, X. A., Sinclair, A. J., Keast, R. S. J. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 49, 218–236.
 - Clovodeo, M. L. (2012). Malaxation: influence on virgin olive oil quality. Past, present and future – an overview. *Trends in Food Science and Technology* 25(1), 13-23.
 - Clovodeo, M.L. (2013). An overview of emerging techniques in virgin olive oil extraction process: strategies in the development of innovative plants. *Journal of Agricultural Engineering* 44, 297-305.
 - Clovodeo, M.L., Hachicha-Hbaieb, R. (2013). Beyond the traditional virgin olive oil extraction systems: Searching innovate and sustainable plant engineering solutions. *Food Research International* 54(2), 1926-1933.
 - COI (1996). Consejo Oleícola Internacional. COI/T.20/Doc. Nº 15/Rev. 1,20 Noviembre 1996. Método revisado para la valoración organoléptica del aceite de oliva virgen.
 - De Faveri, D., Aliakbarian, B., Avogardo, M., Perego, P., Converti, A. (2008). Improvement of olive oil phenolics content by means of enzyme formulation: effect of different enzyme activities and levels. *Biochemical Engineering Journal* 41, 149-156.
 - Di Giovacchino, L. (1991). Extracción del aceite de las aceitunas por presión, centrifugación y percolación: efecto de las técnicas sobre los rendimientos en aceite. *Olivae* 36, 42-44.
 - Di Giovacchino, L. (2003). Aspectos tecnológicos. En: *Manual del aceite de oliva*. Aparicio, R., Harwood, J. Ed. AMV Ediciones MundiPrensa. Madrid, (España) pp. 33-37.
 - Di Giovacchino, L., Constantini, N., Serraiocco, A., Surrichio, G., Basti, C. (2001). Natural antioxidants and volatile compounds of virgin olive oil obtained by two or three-phases centrifugal decanters. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103, 279-285.
 - Favati, F., Caporale, G., Bertuccioli, M. (1994). Rapid determination of phenol content in extra virgin olive oil. *Grasas y Aceites* 45(1-2) 68-70.
 - Fernández-Escobar, R., Beltrán, G., Sánchez-Zamora, M.A., García, Novelo, J., Aguilera, M.P., Uceda, M. (2006). Olive oil quality decreases with nitrogen over-fertilization. *HortScience* 41, 215-219.
 - Fregapane, G., Salvador, M. D. (2013). Production of superior extra virgin olive oil modulating the content and profile of its minor components. *Food Research International* 54 (2) 1907-1914.

- Gandul-Rojas, B., Mínguez-Mosquera, M. I. (1996). Chlorophyll and Carotenoid Composition in Virgin Olive Oils from Various Spanish Olive Varieties. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 72, 31-39.
- Gimeno, E., Castellote, R. M., Lamuela-Raventós, M. C., De la Torre, M. C., López-Sabater, M. C. (2002). The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics, α -tocopherol, and β -carotene) in virgin olive oil. *Food Chemistry* 78, 207–211.
- Guderjan, M., Elez-Martínez, P., Knorr, D. (2007). Application of pulsed electric field at oil yield and content of functional food ingredients at the production of rapeseed oil. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 8, 55-62.
- Guderjan, M., Töpfl, S., Angersbach, A., Knorr, D. (2005). Impact of pulsed electric field treatment on the recovery and quality of plants oils. *Journal of Food Engineering* 67, 281-287.
- Hermoso, M., Uceda, M., García, A., Morales, B., Frías, M.L., Fernández, A. (1991). Elaboración del aceite de oliva de calidad. Consejería de Agricultura y Pesca, Serie Apuntes 5/92. Sevilla, España.
- Inarejos-García, A., Gomez-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.
- Jiménez, A., Hermoso, M., Uceda, M. (1995). Elaboración del aceite de oliva virgen mediante sistema continuo de dos fases. Influencia de diferentes variables del proceso en algunos parámetros relacionados con la calidad del aceite. *Grasas y Aceites* 21, 299-303
- Kiritsakis, A. K., Markakis, P. (1987). Olive oil, a review. *Advances in Food Research* 31, 118 – 125.
- Kiritsakis, A.K., Dugan, L.R. (1984). Effects of selected storage conditions and packaging materials on olive oil quality. *Journal of American Oil Chemists' Society* 61(12), 1868-1870.
- Laübli, M.W., Bruttel P.A. (1986). Determination of the oxidative stability of fats and oil. Comparison between the active oxygen method (AOCS cd. 12-57) and the rancimat method. *Journal of American Oil Chemists' Society* 6,792-795.
- Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Composición del aceite de oliva. *El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía*. Ed. Fernández-Gutiérrez & A. Segura Carretero. pp 195–224.
- Luaces, P., Pérez, A.G., García, J.M., Sanz, C. (2005). Effects of heat-treatments of olive fruit on pigment composition of virgin olive oil. *Food Chemistry* 90, 169-174.
- Mancebo-Campos, V., Fregapane, G., salvador, M.D. (2008). Kinetic study for the development of an accelerated oxidative stability test to estimate virgin olive oil potential shelf life. *European Journal of Lipid Science and Technology* 110, 969-976.
- Martínez-Suárez, J.M., Muñoz, E., Alba, J., Lanzón, A. (1975). Informe sobre la utilización del Analizador de Rendimientos Abencor. *Grasas y Aceites* 26 (6), 379-385.
- Mataix, J., Martínez, E. (2001). *Bases para el futuro, El aceite de oliva*. Editorial Conserjería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla.

- Mínguez-Mosquera, M. I., Rejano-Navarro, L., Gandul-Rojas, B., Sánchez-Gómez, A.H., Garrido-Fernández, J. (1991). Color pigment in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 68(5), 332-336.
- Mousa, Y.M., Gerasopoulos, D., Metzidakis, I. Kirtsakis, A. (1996). Effect of altitude on fruit and oil quality characteristics of "Mastoides" olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 71, 345-350.
- Najafian, L., Ghodsvali, A., Haddad Khodaparst, M.H., Diosady, L.L. (2009). Aqueous extraction of virgin olive oil using industrial enzymes. *Food Research International* 42, 171-175.
- Pardo, J. E., Cuesta, M. A., Alvarruiz, A. (2007). Evaluation of potential and real quality of virgin olive oil from the designation of origin "Aceite Campo de Montiel" (Ciudad Real, Spain). *Food Chemistry* 100, 977-984.
- Pastor, M., Vega, V., Hidalgo, J., Girona , J. (2005). Influencia del riego sobre la calidad del aceite y sobre el comportamiento de la aceituna en el proceso industrial de extracción. En: *El cultivo del olivo localizado*. Pastor, M. Ed. MundiPrensa. Madrid, (España) pp. 165-184.
- Puértolas, E., Hernández-Orte, P., Sladaña G., Álvarez, I., Raso, J. (2010). Improvement of winemaking process using pulsed electric fields at pilot-plant scale. Evolution of chromatic parameters and phenolic content of Cabernet Sauvignon red wines. *Food Research International* 43, 761-766.
- Puértolas, E., Martínez de Marañón, I. (2015). Olive oil pilot-production assisted by pulsed electric field: Impact on extraction yield, chemical parameters and sensory properties. *Food Chemistry* 167, 497-502.
- Ranalli, A., Contento, S., Schiavone, C., Simone, N. (2001). Malaxing temperature affects volatile and phenol composition as well as other analytical features of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology* 103, 228-238.
- Ranalli, A., Malfatti, A., Lucera, L., Contento, S., Sotiriou, E. (2005). Effects of processing techniques on the natural colouring and the other functional constituents in virgin olive oil. *Food Research International* 38, 873-878.
- Roca, M., Mínguez-Mosquera, M.I. (2003). Carotenoid levels during the period of growth and ripening in fruits of different olive varieties (Hojiblanca, Picual and Arbequina). *Journal of Plant Physiology* 160, 451-459.
- Salas, J. J., Pastor, M. Castro, J. Vega, V. (1997). Influencia del riego sobre la composición y características organolépticas del aceite de oliva. *Grasas y Aceites* 48 (2), 74-82.
- Salvador, M.D., Aranda F., Gómez-Alonso, S. Fregapane, G. (2001). Influence of fruit ripening on Cornicabra virgin olive oil quality. A study of crop seasons. *Food Chemistry* 73, 45-53.
- 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, 975-983.

- Tovar de Dios, M.J. (2001). Estudio del efecto de la aplicación de diferentes estrategias de riego al olivo (*Olea europaea L.*) de la variedad Arbequina sobre la composición del aceite. Tesis Doctoral. Universidad de Lleida.
- UE, 2013. Reglamento de ejecución (UE) Nº 1348/2013 de la Comisión de 16 de Diciembre de 2013 que modifica el Reglamento (CEE) Nº 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 L338, 31-67.
- Vierhuis, E., Servili, E., Baldioli, M., Schols, H.A. Voragen, A.G.J., Montedoro, G.F. (2001). Effect of enzyme treatment during mechanical extraction of olive oil on phenolic compounds and polysaccharides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 1218-1223.
- Wouters, P. C., Álvarez, I., Raso, J. (2001). Critical factors determining inactivation kinetics by pulsed electric field food processing. *Trends in Food Science & Technology* 12, 112-121.
- Zimmermann, U. (1986). Electric breakdown, electroporation and electrofusion. *Review Physical Biochemistry Pharmacology* 105, 196-256.
- Zimmermann, U., Pilwat, G., Riemann, F. (1974). Dielectric breakdown of cell membranes. *Biophysical Journal* 14, 881-899.