



Facultad de Veterinaria  
**Universidad** Zaragoza



# Trabajo Fin de

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

---

## ÍNDICE

ÍNDICE .....	1
1. RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1 LA ACEITUNA .....	4
2.2 EL ACEITE DE OLIVA .....	4
2.2.1 CALIDAD NUTRITIVA .....	5
2.2.2. CALIDAD SENSORIAL .....	6
2.2.3. CALIDAD COMERCIAL .....	7
2.2.4. CALIDAD REGLAMENTADA.....	8
3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
4.1. MATERIALES .....	14
4.1.1. Aceites de oliva .....	14
4.2 MÉTODOS .....	14
4.2.1. Determinaciones en el aceite.....	14
4.2.2. Tratamiento estadístico. ....	22
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
5.1. Determinaciones en el aceite.....	22
5.1.1. Determinación de la composición lipídica en aceites aragoneses de la variedad Empeltre .....	22
5.2. Análisis estadístico.....	31
5.2.1. Comparación entre las campañas 2017-18 y 2018-19 en muestras del Moncayo. ....	31
5.2.2. Comparación entre la zona del Moncayo y la zona del Bajo Aragón en la campaña 2017-18. ....	34
6. CONCLUSIONES.....	38
CONCLUSIONS .....	39
7. VALORACIÓN PERSONAL .....	40
8. BIBLIOGRAFIA.....	40
ANEXO Legislación .....	41
ANEXO 1 .....	42

## **1. RESUMEN**

Este trabajo ha estudiado la composición lipídica, tanto de esteroides como de alcoholes (alifáticos y triterpénicos) y de ácidos grasos en aceites de oliva aragoneses de la variedad Empeltre, así como la influencia de la campaña y la zona de producción sobre sus perfiles lipídicos. Para ello se utilizaron muestras de aceite de oliva Empeltre de la zona del Bajo Aragón y de la zona del Moncayo. De esta última, se utilizaron muestras de la campaña 2017-18 y de la campaña 2018-19.

Se analizó la composición de esteroides, de alcoholes (alifáticos y triterpénicos) y los ácidos grasos mediante métodos de análisis oficiales basados en la cromatografía de gases y en la cromatografía de capa fina. Posteriormente se realizó un estudio estadístico de los resultados obtenidos incluyendo un Análisis de Componentes Principales (PCA).

La composición de esteroides varió con la campaña y con la zona de producción. El único esteroide crítico fue el  $\Delta$ -7-Estigmastenol que en muchos casos mostró valores elevados. Además, su contenido varió con la campaña de producción. La composición de alcoholes fue similar entre las dos campañas (2017-18 y 2018-19) y el perfil de ácidos grasos mostró diferencias entre las campañas y entre las zonas de producción.

Estos resultados permitieron evidenciar que el perfil lipídico de los aceites de oliva de la variedad Empeltre varía en función de la campaña y de la zona de producción.

## **ABSTRACT**

This essay has studied the lipidic composition of both sterols and alcohols (aliphatic and triterpenic) and of fatty acids in Aragonese olive oils of the “Empeltre” variety, as well as the influence of the campaign and the production area on their lipidic profiles. For this purpose, samples of Empeltre olive oil from the Bajo Aragon and Moncayo areas were used. Samples of the latter were used from the 2017-18 and 2018-19 campaigns.

The composition of sterols, alcohols (aliphatic and triterpenic) and fatty acids was analysed using official analysis methods based on gas chromatography and thin layer chromatography. Subsequently, a statistical study of the results obtained was carried out, including a Principal Components Analysis (PCA).

The composition of sterols varied with the campaign and with the production area. The only critical sterol was  $\Delta$ -7-Stigmastenol, which in many cases showed high values. In addition, its content varied with the production campaign. The composition of alcohols was similar between the two campaigns (2017-18 and 2018-19) and the fatty acid profile showed differences between campaigns and between production areas.

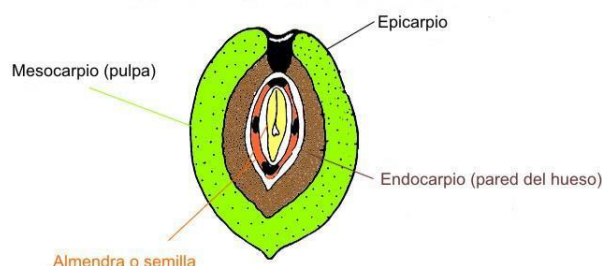
These results showed that the lipid profile of olive oils of the Empeltre variety varies according to the campaign and the production area.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 LA ACEITUNA

La aceituna, es una drupa caracterizada por ser el fruto del olivo, de pulpa carnosa y que contiene un solo hueso. La longitud es de 1 a 4 cm y presenta un diámetro de 0,6 a 2 cm. El peso medio de la aceituna está entre 1,5 y 6 g y también se encuentran diferencias en el color pudiendo ser desde verde a morado o negro.

Las aceitunas se diferencian de los demás frutos por su alto contenido en grasa. Este fruto está formado por tres tejidos principales: endocarpio, mesocarpio y epicarpio (Figura 1). El endocarpio es el hueso, el mesocarpio la pulpa o carne, y el epicarpio la piel o capa externa. Más de un 90% del aceite se localiza dentro de las vacuolas de las células del mesocarpio, aunque también se encuentra aceite disperso dentro del sistema coloidal del citoplasma y un pequeño porcentaje dentro del epicarpio y el endocarpio.



**Figura 1:** Esquema de los diferentes tejidos en la aceituna (Vera, 2011).

### 2.2 EL ACEITE DE OLIVA

El aceite de oliva es el obtenido a partir de la aceituna (*Olea europaea* L.) exclusivamente por procedimientos mecánicos u otros medios físicos, en condiciones especialmente térmicas que no produzcan la alteración del aceite, y que no haya tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado (COI, 2009).

El aceite de oliva es un producto consumido habitualmente en la dieta mediterránea gracias a que está dotado de una gran calidad nutritiva, organoléptica y comercial.

Además, se trata de un producto que está regulado por la legislación europea, lo que ha permitido clasificar y categorizar los distintos tipos de aceites de oliva en función de las características que poseen.

La calidad en el aceite de oliva se entiende como el conjunto de propiedades o atributos que él posee y que determina el grado de aceptación del consumidor respecto a un determinado uso.

La calidad del aceite de oliva depende de distintos factores como las condiciones climáticas, el método de recolección o de procesado, la variedad de la aceituna o incluso el grado de maduración. No obstante, todos los factores se pueden agrupar en las siguientes categorías:

- Tecnológicos: proceso de elaboración, envasado y conservación.
- Ambientales: condiciones climáticas y tipo de suelo.
- Agronómicos: técnicas de cultivo, de recolección y grado de maduración.
- Genéticos: variedad de la aceituna

#### 2.2.1 CALIDAD NUTRITIVA

La calidad nutricional del aceite de oliva está directamente relacionada con la composición química del mismo. Por lo tanto, desde el punto de vista químico, se puede establecer que la composición del aceite de oliva está dividida en dos fracciones, la fracción saponificable que es la mayoritaria (98-99% del peso total del aceite) y la fracción minoritaria (2% del peso total del aceite), denominada como fracción insaponificable:

- Fracción saponificable: entre sus constituyentes principales se encuentran los triglicéridos (ésteres de glicerol y ácidos grasos) puesto que las aceitunas acumulan en su interior lípidos en forma de distintas especies moleculares de triacilglicerol. Dentro del perfil de ácidos grasos el ácido oleico supone un 55-83%, por lo que se puede considerar al aceite de oliva como una grasa monoinsaturada (Aparicio y Harwood, 2003). La presencia de algunos ácidos grasos como el oleico, o ácidos poliinsaturados esenciales como el linoleico y linolénico en la composición del aceite de oliva hace que se diferencie de otras grasas vegetales, otorgando al aceite unas propiedades beneficiosas y saludables

para el consumidor humano. Entre otras destacan los efectos positivos que tiene el ácido oleico en la regulación del colesterol (aumenta el colesterol HDL y a disminuye el colesterol LDL). Además, este perfil rico en ácidos grasos en monoinsaturados (AGM) y bajo en ácidos grasos poliinsaturados (AGP) hace al aceite de oliva mucho más estable frente a la oxidación que otros aceites ricos en AGP.

- Fracción insaponificable: incluye una gran variedad de compuestos químicos, siendo los más importantes los compuestos fenólicos, que no se encuentran en otros aceites debido al refinado (Hrncirik y Fritsche, 2004). También se encuentran los esteroides y los alcoholes alifáticos y triterpénicos, junto a los tocoferoles y los pigmentos, que son antioxidantes naturales del aceite y confieren estabilidad frente a la oxidación. Dentro de los tocoferoles, el más importante es el  $\alpha$ -tocoferol conocido como vitamina E que es el principal antioxidante ante el enranciamiento (García-Ortiz, Fernández y Pacheco, 2016).

### 2.2.2. CALIDAD SENSORIAL

La calidad sensorial de un alimento es un concepto difícil de definir. Está relacionada con un conjunto de características evaluables a través de los órganos sensoriales que determinan su nivel de aceptación por parte del consumidor.

El aceite de oliva se caracteriza sensorialmente por tener una serie de atributos tanto positivos como negativos, que son imprescindibles a la hora de realizar la clasificación por categorías comerciales.

Atributos positivos:

- Frutado: conjunto de sensaciones olfativas características del aceite, dependientes de la variedad de aceituna, procedente de frutos sanos y frescos, verdes o maduros.
- Amargo: Sabor elemental característico del aceite obtenido de aceitunas verdes ó en envero.
- Picante: Sensación táctil de picor, característica, principalmente de aceitunas todavía verdes.

Atributos negativos:

- Atrojado/ borras: Flavor característico del aceite obtenido de aceitunas amontonadas en condiciones que han sufrido un avanzado grado de fermentación anaerobia.
- Rancio: Flavor de los aceites que han sufrido un proceso oxidativo.
- Avinado/avinagrado: Flavor característico de algunos aceites que recuerda al vino ó al vinagre.
- Moho/humedad: Flavor característico del aceite obtenido de frutos en los que se han desarrollado abundantes hongos y levaduras, a causa de la humedad.
- Otros: metálico, alpechín, etc

### 2.2.3. CALIDAD COMERCIAL

La importancia del aceite de oliva, como producto diferenciado dentro de la dieta mediterránea ha hecho que en los últimos años se hayan incrementado las marcas de calidad reconocida bajo las que se comercializa este producto.

En España en la actualidad hay registradas 29 Denominaciones de Origen (MAPA, 2019). La gran mayoría se localizan en Andalucía que cuenta con 12 marcas registradas. Aragón por su parte tiene dos Denominaciones de Origen reconocidas: “Aceite del Bajo Aragón” y “Aceite Sierra del Moncayo”.

En Aragón la superficie de cultivo del olivo oscila alrededor de las 48.000 Has que se reparten por toda la geografía aragonesa. Teruel abarca la mayor extensión de olivar con aproximadamente 25.000 hectáreas cultivadas, seguida de Zaragoza con 16.000 Has, y por último, la provincia de Huesca cuenta con 8.000 Has cultivadas. (MAPA, 2018).

Las zonas de mayor relevancia en cuanto a producción aceitera debido a la calidad de sus aceites podría decirse que son las áreas geográficas que comprenden el este de Aragón y la zona oeste de comunidad aragonesa.

La zona este de Aragón dedicada al cultivo del olivar se caracteriza por presentar un clima mediterráneo continentalizado con un balance de precipitaciones medias anuales entorno a los 450-467 mm/año. Esta zona esteparia presenta grandes diferencias en cuanto a las temperaturas en función del periodo del año. Las temperaturas medias oscilan entre 7-14 °C, pero en verano se alcanzan los 40 °C que contrastan con los -16 °C que se pueden dar en los meses invernales (Orden de 28 de Agosto de 2014). Otra característica interesante de esta zona es la presencia del cierzo; el cierzo es un aire frío



y seco que debido a su elevada actividad provoca que las tierras se vuelvan áridas. Por otra parte elimina la formación de nieblas y escarchas, aspecto positivo para el olivar.

El oeste aragonés, conocido también como el Bajo Aragón se caracteriza por ser una zona llana o suavemente alomada, cuyos suelos son mayoritariamente calizos. El clima se caracteriza por tender al continental. El amplio conjunto de municipios que abarca esta zona hace que sea difícil calcular un valor medio de las precipitaciones anuales de la zona. Se podría decir que los valores oscilan entre 328-368 mm/año, siendo el otoño la estación con un mayor porcentaje de precipitaciones. Respecto a la temperatura media anual también varía en función del municipio. Esta zona se caracteriza por una amplitud térmica alta. Los meses de verano son los más cálidos mientras que enero es el mes en el que se registra una menor temperatura. La temperatura anual media de la zona se situaría entre los 14-15 °C (Orden de 17 de Marzo de 2009).

Estas características hacen que en Aragón crezca una de las variedades de olivo con mayor historia dentro de la agricultura hispánica la variedad Empeltre.

La variedad de aceituna Empeltre proviene de la variedad de olivo de mismo nombre que se caracteriza por presentar un gran desarrollo cuando se cultiva en buenas condiciones ecológicas, árbol de porte erguido y con ramas de fuerte tendencia a la verticalidad. Tiene entrenudos largos y produce pocas ramificaciones. La copa tiene un follaje espeso y los frutos se encuentran en el interior, siendo poco visibles (Orden de 28 de Agosto de 2014), además se singulariza por tener una elevada productividad y una temprana fructificación. La aceituna fruto del Empeltre presenta un tamaño medio, alargado, asimétrico, ligeramente abombada por el dorso y plana en lado opuesto y tiene un color negro (Barranco, Fernández-Escobar, Rallo, 2008). Además, los aceites que se obtienen de esta variedad se singularizan por su sabor suave, no excesivamente amargo, con matices dulces. Estas propiedades realzan la genuinidad de este aceite monovarietal.

#### 2.2.4. CALIDAD REGLAMENTADA

La calidad reglamentada de los aceites de oliva viene definida en el Reglamento (CEE) nº 2568/1991 (CEE, 1991) y posteriores modificaciones. En él se definen las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sus métodos de

análisis. De acuerdo con esta legislación, para cada categoría comercial se establecen unos criterios de calidad recogidos en la Tabla 1. Dichos criterios se basan en límites máximos de parámetros físico químicos y sensoriales para cada categoría comercial.

PARÁMETROS	Aceite de oliva virgen extra	Aceite de oliva virgen	Aceite de oliva lampante
Acidez (% ácido oleico)	$\leq 0,8$	$\leq 2$	$\geq 2,0$
Índice de peróxidos (meqO <sub>2</sub> /kg)	$\leq 20$	$\leq 20$	-
K <sub>270</sub> (Abs 270 nm)	$\leq 0,22$	$\leq 0,25$	-
K <sub>232</sub> (Abs 232 nm)	$\leq 2,50$	$\leq 2,60$	-
Ésteres etílicos de ácidos grasos (mg/kg)	$\leq 30$	-	-
Mediana del frutado	$> 0$	$> 0$	0
Mediana de defectos	0	$\leq 3,5$	$> 3,5$

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

No basta con que los aceites de oliva cumplan con los criterios de calidad, sino que también deben cumplir con los denominados criterios de pureza para poder ser clasificados dentro de una categoría comercial. Los criterios de pureza vienen estipulados asimismo, en el Reglamento (CEE) n° 2568/1991 (CEE, 1991). Dentro de estos criterios de pureza se encuentran entre otros, el contenido de ácidos grasos, de ceras o la composición de esteroides. Estos parámetros son característicos de cada tipo de grasa. En el Reglamento (CEE) n° 2568/1991 (CEE, 1991) se define el esquema de decisiones para la comprobación de la conformidad de una categoría de aceite con respecto a la declarada comercialmente.

La determinación de los ácidos grasos es importante debido a que aporta información sobre la estabilidad del aceite y sobre posibles adulteraciones que haya podido sufrir, ya sea con un aceite de distinta categoría comercial o con otro tipo de grasa.

El aceite de oliva debe cumplir con los valores estipulados en el mencionado Reglamento. Así pues, los aceites de oliva deberán cumplir; con un contenido en porcentaje (%) de:  $\leq 0,05$  de Mirístico,  $\leq 1,0$  Linolénico,  $\leq 0,6$  Araquídico,  $\leq 0,4$  Eicosenoico,  $\leq 0,2$  Behénico,  $\leq 0,2$  Lignocérico, 7,5-20,0 Palmítico, Palmitoleico: 0,3-3,5; Heptadecanoico:  $\leq 0,3$ ; Heptadecenoico:  $\leq 0,3$ ; Esteárico: 0,5-5,0; Oleico: 55,0-83,0; Linoleico: 3,5-21,0.

La composición de esteroides es otro criterio para evaluar la pureza de un aceite de oliva, ya que son distintos que los de otras grasas.

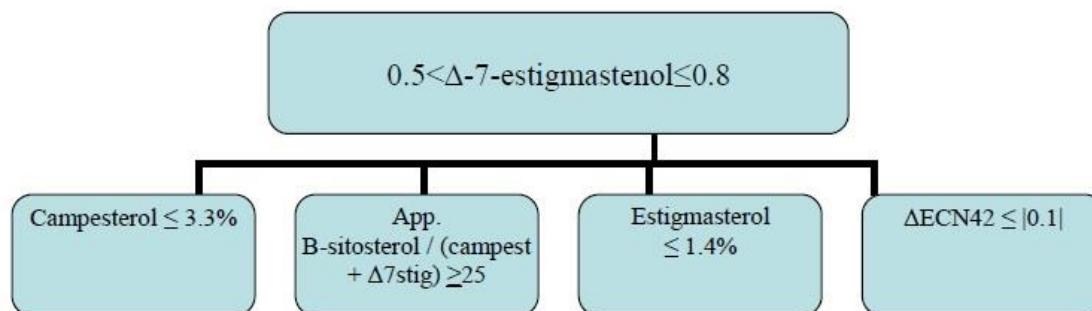
En el caso de los esteroides los porcentajes legislados varían en función de la categoría. De esta forma, para que un aceite se pueda clasificar bajo la denominación de virgen extra deber cumplir: Colesterol (%):  $\leq 0,5$ ; Brasicasterol (%):  $\leq 0,1$ ; Campesterol (%):  $\leq 4,0$ ; Estigmasterol (%):  $< \text{Camp.}$ ; Beta-sitosterol (%):  $\geq 93,0$ ; Delta-7-estigmastenol (%):  $\leq 0,5$ ; Esteroides totales (mg/kg):  $\geq 1\ 000$ .

Las ceras se evalúan junto con los alcoholes alifáticos. Si el contenido en ceras está comprendido entre 300-350 mg/Kg se deben determinar los alcoholes alifáticos y la suma de eritrodiol y uvaol. Se considerará un aceite de oliva virgen lampante si su contenido en alcoholes alifáticos es  $\leq$  a 350 mg/kg o si su contenido en eritrodiol + uvaol es  $\leq$  a 3,5% perdiendo de esta forma, su categoría de virgen o virgen extra. El contenido de ceras y de alcoholes alifáticos se consideran criterios de pureza y se utilizan para categorizar un aceite.

Como se ha mencionado anteriormente, en el Reglamento (CEE) n° 2568/1991 (CEE, 1991) está descrito el árbol de decisiones que hay que seguir para categorizar un aceite de oliva. El árbol de decisiones se puede observar en el Anexo I, donde se describen los pasos a seguir para categorizar correctamente un aceite de oliva (Figuras 8 y 9).

No obstante, esta no es la única clasificación legal existente. El CODEX (Codex, 1981) y el Consejo Oleícola Internacional (COI) establecen otra clasificación basada en los mismos criterios de calidad y pureza.

En el Reglamento (CEE) n° 2568/1991 (CEE, 1991) y en El Consejo Oleícola Internacional (COI, 2018) se añade una rama del árbol de decisiones cuando los valores del  $\Delta$ -7-Estigmastenol superan el valor porcentual de 0,5 para los aceites virgen y virgen extra (CEE, 1991; COI, 2018) (Figura 2).



**Figura 2:** Árbol de decisiones para la categorización del aceite de oliva (CEE, 1991; COI, 2018).

De esta forma, si el porcentaje de  $\Delta$ -7-Estigmastenol es  $0,5 < \Delta$ -7-Estigmastenol  $\leq 0,8$  y cumple con las condiciones descritas en la Figura 2, podría seguir categorizándose como virgen o virgen extra.

Sin embargo, el CODEX y otras legislaciones, al margen de la Unión Europea y el COI, no permiten valores de  $\Delta$ -7-Estigmasntenol por encima de 0,5. Esto hace que aceites categorizados como aceites de oliva virgen o virgen extra pierdan esta categorización cuando se comercializan fuera de Europa, teniendo que comercializarse como “coupage” o ser destinados a lampante a pesar de cumplir con todos los criterios de calidad necesarios para ser virgen o virgen extra.

Estudios científicos desarrollados en los últimos años han demostrado que la composición lipídica de ciertos aceites de oliva depende de la variedad de aceituna que se emplee para la elaboración del aceite (Gracia, Royo, Guillen, 2009).

En el caso particular de los aceites monovarietales “Empeltre”, variedad aragonesa, distintos estudios han demostrado que la composición esterólica varía en función de diversos factores. (Romero, Ninot, Hermoso, 2016 y Rey-Giménez et al., 2019).

Algunos autores han descrito la influencia del año de cosecha sobre los valores de algunos esteroides, así como las diferencias con otras variedades en la mencionada composición esterólica (Gracia, Royo, Guillen, 2009). La zona de producción también afectaría al perfil esterólico de la variedad aragonesa (Romero, Ninot, Hermoso, 2016).

Los mismos autores manifestaron que el único esteroide cuyo valor se encontraría por encima de los límites establecidos en la legislación para los aceites monovarietales “Empeltre” sería el  $\Delta$ -7-Estigmastenol. Se conoce que el porcentaje de este esteroide varía con la maduración, comprometiendo el límite legal establecido por el Reglamento (CEE) n° 2568/1991 (CEE, 1991) cuando las aceitunas presentan una maduración temprana (Rey-Giménez et al., 2019).

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

España es el principal productor de aceite de oliva en el mundo. En Aragón, la principal variedad autóctona es la aceituna “Empeltre”. Esta variedad tiene dos aptitudes, elaboración de aceite y aceituna de mesa. Los aceites de oliva monovarietales Empeltre se singularizan de aceites de otras variedades por su color amarillo y su sabor suave no excesivamente amargo. En estudios previos sobre la composición esterólica en aceites de esta variedad se han observado diferencias respecto a los aceites de otras variedades. Sin embargo, no se ha estudiado la influencia de distintos factores, como la campaña de cosecha, o las zonas geográficas aragonesas, en el perfil de esteroides de aceites aragoneses de la variedad Empeltre.

El objetivo general del trabajo es determinar la composición lipídica, tanto de esteroides como de alcoholes (alifáticos y triterpénicos) y de ácidos grasos en aceites de oliva aragoneses de la variedad Empeltre.

Para ello se contemplan los siguientes objetivos parciales:

- Determinar la composición esterólica en aceites de oliva Empeltre de la zona del Moncayo de las campañas 2017-2018 y 2018-2019.
- Determinar la composición en alcoholes en aceites de oliva Empeltre de la zona del Moncayo de las campañas 2017-2018 y 2018-2019.
- Determinar la composición de ácidos grasos en aceites de oliva Empeltre de la zona del Moncayo de las campañas 2017-2018 y 2018-2019.
- Determinar la composición esterólica en aceites de oliva Empeltre de la zona del Bajo Aragón en la campaña 2017-2018.
- Determinar la composición de ácidos grasos en aceites de oliva Empeltre de la zona del Bajo Aragón en la campaña 2017-2018.
- Realizar un estudio estadístico comparando aceites Empeltre de diferentes zonas aragonesas y de distintas campañas de elaboración, mostrando una especial atención al parámetro  $\Delta$ -7-Estigmastenol.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1. MATERIALES**

#### **4.1.1. Aceites de oliva**

Los aceites de oliva de la variedad Empeltre utilizados en el estudio fueron seleccionados por zona, variedad y campaña. Los aceites provenían de almazaras aragonesas localizadas en la zona del Moncayo y en la zona este del Bajo Aragón.

De la zona del Moncayo se seleccionaron 10 aceites correspondientes a la campaña 2018-2019 y 14 aceites pertenecientes a la campaña 2017-2018. Los aceites originarios de almazaras situadas a lo largo de la zona este del Bajo Aragón eran de la campaña 2017-2018 y fueron un total de 8.

Las 32 muestras estudiadas fueron seleccionadas previamente por el Laboratorio Agroambiental del Gobierno de Aragón y categorizadas como aceites de oliva vírgenes o vírgenes extra tras su análisis. Posteriormente fueron filtradas, envasadas y congeladas a -20 °C hasta su análisis para este estudio.

Las muestras de aceite de oliva fueron codificadas antes de su análisis. Se estableció un código de identificación de 3 ó 4 dígitos. El dígito de la derecha correspondía con la zona de procedencia; así pues, si procedía de la zona del Moncayo se identificaba con la letra “M” y si provenía de la zona del Bajo Aragón se identificaba con la letra “B”. El dígito del centro se relacionaba con el año de campaña. Si la muestra era de la campaña 2018-19 el dígito era un 2, mientras si era de la campaña 2017-18, el dígito era un 1. El dígito de la izquierda se identificaba con el orden en el que habían sido analizadas las muestras, siendo un número natural comprendido entre el nº 1 y el 32.

### **4.2 MÉTODOS**

#### **4.2.1. Determinaciones en el aceite**

##### **4.2.1.1. Consideraciones previas**

Los análisis de este Trabajo Fin de Grado fueron realizados en el Laboratorio Agroambiental del Gobierno de Aragón, ubicado en Montañana (Zaragoza).

Puesto que este laboratorio realiza análisis de control oficial, debe cumplir con lo descrito en el Reglamento (CE) 882/2004 (CEE, 2004), que especifica que los laboratorios que realizan los controles oficiales deben aplicar procedimientos autorizados internacionalmente y emplear métodos de análisis que, en la medida de lo

posible, hayan sido validados, además deben ser evaluados y acreditados según la norma UNE-EN-ISO/IEC-17025 (Rey et al., 2017).

El Laboratorio Agroambiental se encuentra acreditado por ENAC (Entidad Nacional de Acreditación) mediante la norma UNE-EN ISO / IEC 17025:2017. Los análisis a los aceites de oliva se han realizado en la sala de aceites, grasas y productos lácteos perteneciente al Área Técnica de Alimentación.

#### **4.2.1.2. Determinación de la composición y contenido de esteroides y dioltriterpénicos.**

Para realizar la determinación de la composición y contenido de esteroides se siguió la metodología oficial descrita en el Anexo V del Reglamento de la CEE 2568/91 (CEE, 1991).

El método se divide en dos partes: preparación del insaponificable y separación de la fracción de esteroides y dioltriterpénicos (eritrodiol + uvaol).

##### **1. Preparación de insaponificable:**

En un matraz de 250 ml se pipetea 500 µl de solución de patrón interno  $\alpha$ -colecstanol al 0,2%. Se evapora hasta sequedad, con una ligera corriente de nitrógeno. A continuación, se añaden  $5 \pm 0,01$  g de muestra de aceite previamente filtrada, en el mismo matraz. Después, se añaden 50 mL de solución etanólica de hidróxido potásico 2 N. Seguidamente se ajusta el condensador de flujo y se calienta la muestra a ebullición suave hasta que se produce la saponificación (la muestra se vuelve incolora). Este proceso dura alrededor de 40 minutos.

A continuación se añaden 50 ml de agua destilada por la parte superior del condensador para recoger los vapores, tras ello, se retira el condensador de flujo y se enfría el matraz hasta una temperatura de 30 °C aproximadamente. Una vez el matraz está templado, se pasa el contenido del matraz a un embudo de decantación de 500 ml usando dos fracciones de agua destilada (50 ml). Para obtener la materia insaponificable, se añaden aproximadamente 80 ml de éter etílico y se agita energéticamente durante 60 segundos aproximadamente con liberación periódica de la presión quitando el tapón al embudo. Se deja reposar unos minutos hasta que se produzca una completa separación en dos fases. Se retira entonces, la solución de jabón lo más exhaustivamente posible y se pasa a un segundo embudo de decantación de 500 ml. La fase hidroalcohólica se vuelve a verter en el primer embudo de decantación y se repite el proceso con dos lavados con 70 y 60 ml de



éter etílico sucesivamente. Si se forman emulsiones durante el proceso se pueden eliminar añadiendo pequeñas cantidades de etanol. Se combinan las tres extracciones de éter en un único embudo de decantación.

A continuación; se añaden 50 ml de hidróxido potásico 0,5 N y se agita vigorosamente el embudo y cuando se separan las fases se elimina la fase inferior. Ulteriormente, se realizan unos 7 ó 8 lavados con agua destilada hasta que la muestra alcance un pH aproximadamente neutro. Para comprobarlo, se añaden un par de gotas de una solución de fenolftaleína en el agua de lavado. Este no debe adquirir color rosa.

Una vez eliminada el agua de lavado, se filtra con sulfato sódico anhidro a un matraz de 250 ml, lavando el embudo y el filtro con pequeñas cantidades de éter etílico. Se evapora el disolvente mediante su destilación en el rotavapor. Se elimina totalmente el disolvente volátil con una ligera corriente de nitrógeno. La materia insaponificable seca se redisuelve en 2 ml de acetato de etilo.

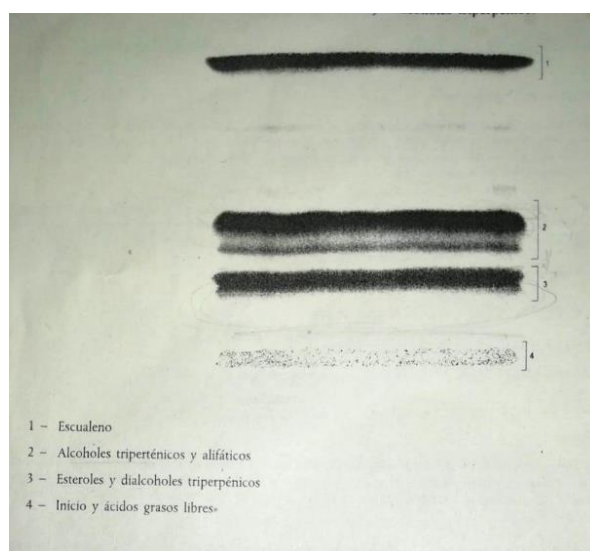
## 2. Separación de la fracción de esteroides y dialcoholes triterpénicos.

En primer lugar se preparan las placas para cromatografía en capa fina básica. Para ello se sumergen las placas con gel de sílice en una solución etanólica 0,2 N durante 10 segundos; se dejan secar las placas en una campana durante dos horas y, por último se mantienen en estufa a 100 °C durante una hora. Luego, se mantienen en un desecador hasta el momento del uso.

En una cubeta de desarrollo se coloca una mezcla de hexano y éter etílico 70/30 (V/V) y se deja durante al menos media hora hasta que se establezca el equilibrio líquido-vapor. Posteriormente, se depositan aproximadamente 0,1 ml de la solución del insaponificable en el extremo inferior de la placa cromatográfica sobre una línea fina e uniforme, utilizando una microjeringa de 1 ml. Paralela a esta línea, se colocan 10 µl de una solución de betulina para marcar el nivel de desarrollo y asegurar, de esta forma, que se rasca el eritrodiol y el uvaol.

Posteriormente se introduce la placa en la cubeta de desarrollo para que se produzca la elución hasta que el frente del disolvente quede próximo al extremo superior de la placa. Cuando esto ocurre, se deja secar la placa bajo una campana unos minutos. Se pulverizan sobre la placa ligera y uniformemente una solución de 2,7-diclorofluoresceína y se deja secar. Tras ello, se pueden identificar las

bandas de esteroides y alcoholes triterpénicos y alifáticos mediante la comparación con las manchas obtenidas al aplicar el revelador. A continuación se rasca con una espátula metálica el gel de sílice contenido en el área 3 indicada en la figura 3, donde se observa el área que debe rasparse para determinar el contenido de esteroides y dialcoholes triterpénicos (zona 3) y alcoholes alifáticos (zona 2).



**Figura 3:** Placa cromatográfica en capa fina de aceite de oliva en la que se observa el área que debe rasparse para determinar el contenido de esteroides y alcoholes triterpénicos y alifáticos (CEE, 1991).

Una vez raspada el área 3, delimitada para el análisis de esteroides, se introduce el material obtenido en un embudo filtrante. Se realizan tres lavados con acetato de etilo y se filtra a vacío, recogiendo el filtrado en un matraz corazón acoplado al embudo filtrante. El filtrado se evapora por destilación en rotavapor y se seca aplicando una ligera corriente de nitrógeno. El residuo que queda está formado por la fracción de esteroides y dialcoholes triterpénicos.

A continuación se preparan los trimetilsililéteres. Para ello, se le añaden al matraz que contiene la fracción de esteroides y alcoholes triterpénicos 200  $\mu$ l del reactivo de sililación (silol), se agita cuidadosamente el matraz y se deja reposar al menos durante 30 minutos. La solución límpida está lista para el análisis mediante cromatografía de gases.

Posteriormente se procede a la inyección de la solución en el cromatógrafo utilizando los siguientes parámetros:

- Temperatura de la columna: 260 °C;
- Temperatura del inyector: 300 °C
- Temperatura del detector: 300 °C
- Relación del fraccionamiento: 1/100
- Cantidad de sustancia inyectada: 1 µl de solución de trimetilsililéteres
- Flujo del gas portador: 1 ml/min (Helio)

Para la expresión de resultados se indican las concentraciones de cada uno de los esteroides, expresados en % de materia grasa, y su suma como “esteroides totales” expresados en mg/kg de materia grasa. El porcentaje de cada uno de los esteroides se calcula a partir de la razón del área del pico correspondiente y la suma de las áreas de los picos de los esteroides.

Primero se calcula el contenido de cada uno de los esteroides, expresado en mg/kg de materia grasa:

$$\text{Esterol } x = A_x \times m_s \times 1000 / A_s \times m$$

Dónde:

$A_x$ : área del pico del esteroide  $x$ , en unidades de cuenta del sistema informático;

$A_s$ : área del pico de  $\alpha$ -colestanol, en unidades de cuenta del sistema informático

$m_s$ : peso del  $\alpha$ -colestanol añadido, en miligramos

$m$ : peso de la muestra tomada para la determinación, en gramos.

Segundo, se suman todos los esteroides individuales (mg/kg) y se obtiene el valor de “esteroides totales” en mg/kg.

Tercero se calcula el porcentaje de cada uno de los distintos esteroides:

$$\text{Esterol } x = A_x / \Sigma A \times 100$$

Dónde:

$A_x$  = área del pico  $x$ ;

$\Sigma A$  = suma de las áreas de todos los picos de esteroides.

Cálculo del porcentaje del dialcoholes triterpénicos:

$$\text{Eritrodiol} + \text{uvaol} = (\text{Er} + \text{Uv}) / (\text{Er} + \text{Uv} + \Sigma A) \times 100$$

Dónde:

$\Sigma A$  = suma de las áreas de los esteroides;

Er = área del eritrodiol;

Uv = área del uvaol.

El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases de la marca Agilent y modelo 6890N (Agilent, Estados Unidos).

Consta de un sistema de inyección split-splitless 1:100 y la columna de cromatografía es de la marca Supelco modelo CP-sil 8cB con unas dimensiones de 25m x 0,25 micras x 0,25 micras. Por último, el equipo utilizado consta de un detector de ionización de llama (FID).

Este equipo se empleó también para el análisis de alcoholes alifáticos.

Como puede observarse en la descripción del método, se trata de un análisis largo y tedioso. A pesar de ser el método oficial para el análisis de esteroides, presenta una serie de defectos. El momento de mayor arbitrariedad lo constituye el raspado del área del gel de sílice que contiene los esteroides en la cromatografía de capa fina. La dificultad radica en, que en ocasiones y en función del raspado, aparecían a posteriori una serie de interferencias que eran notorias durante la detección de los picos de los esteroides (Camacho et al., 1994). Estas interferencias provocaban errores en la cuantificación de los esteroides, obligando a repetir el análisis.

Debido a esta dificultad analítica las muestras de aceites pertenecientes a la zona del Bajo Aragón no pudieron ser analizadas en el tiempo especificado para el análisis experimental y los resultados analíticos de dichas muestras fueron proporcionados por el Laboratorio Agroambiental de Aragón.

#### **4.2.1.3. Determinación de la composición y contenido de alcoholes alifáticos.**

Para realizar la determinación de la composición y contenido de alcoholes alifáticos se siguió la metodología oficial descrita en el Anexo XIX del Reglamento de la CEE 2568/91.

El método seguido para esta determinación es similar al de la determinación de esteroides. El principio del procedimiento se basa en la saponificación de la materia grasa, a la que se habrá añadido 1-heneicosanol como patrón interno, con una solución etanólica de hidróxido potásico; a continuación, extracción del insaponificable con éter etílico. Posteriormente separación de la fracción alcohólica del insaponificable mediante cromatografía en placa de gel de sílice básica. Los alcoholes recuperados del gel de sílice se transforman en trimetilsililéteres y se analizan mediante cromatografía de gases con columna capilar.

Por tanto, como patrón interno se utilizó 1-heneicosanol 0,1%. El resto del procedimiento es idéntico al especificado en el apartado 4.2.1.2 hasta el momento del raspado de los alcoholes recolectados en el gel de sílice. En este caso se deberá raspar el área 2, especificada en la figura 3, donde se indica el área que debe rasparse para determinar el contenido de esteroides y dialcoholes triterpénicos y alcoholes alifáticos. Se continúa siguiendo el método descrito en el apartado 4.2.1.2 hasta el momento de la cromatografía de gases.

Durante el análisis en el cromatógrafo de gases se siguieron las siguientes condiciones de trabajo:

- Temperatura de la columna: inicialmente 180 °C, luego se incrementa 5 °C/minuto hasta alcanzar 265 °C
- Temperatura del inyector: 280 °C
- Temperatura del detector: 290 °C
- Relación del fraccionamiento: de 1/50 a 1/100
- Cantidad de sustancia inyectada: 1 µl de solución de trimetilsililéteres;
- Flujo del gas portador (Helio): 1 ml/min

Para la expresión de resultados, se calcula cuantitativamente el área de los alcoholes C<sub>22</sub>, C<sub>24</sub>, C<sub>26</sub>, C<sub>28</sub>. Posteriormente, para determinar el contenido de cada uno de los alcoholes alifáticos se realiza el siguiente cálculo:

$$\text{Alcohol x} = A_x \times m_s \times 1000 / A_s \times m$$

Dónde;

A<sub>x</sub> = área del pico del alcohol x

A<sub>s</sub> = área del pico del 1-heneicosanol

$m_s$  = peso de 1-heneicosanol añadido, en miligramos;

$m$  = peso de la muestra tomada para la determinación, en gramos.

El resultado se expresa en miligramos de cada alcohol alifático por 1000 gramos de materia grasa y su suma como alcoholes alifáticos totales.

#### **4.2.1.4. Perfil de ácidos grasos**

Para realizar la determinación del perfil de ácidos grasos se siguió el método acreditado por el laboratorio basado en el método oficial descrito en el Anexo X del Reglamento de la CEE 2568/91.

En un tubo de rosca de 5 ml, se pesó aproximadamente 0,1 g de la muestra de aceite. Se añadió 2 ml de heptano y se agitó energéticamente. Posteriormente, se añadieron 0,2 ml de solución metanólica de hidróxido potásico 2 M, se cerró correctamente el tubo y se agitó vigorosamente durante 30 segundos. Se dejó en reposo hasta que la parte superior de la solución quedó clara. Se decantó la capa superior, que es la que contiene los ésteres metílicos.

Posteriormente se procedió a la inyección de la solución en el cromatógrafo utilizando los siguientes parámetros:

❖ Condiciones de inyección:

- Temperatura inyector: 250 °C
- Relación de fraccionamiento: 1:100
- Volumen de inyección: 1 µl

❖ Condiciones de detección:

- Temperatura detector: 260 °C
- Flujo hidrógeno: 40 ml/min.
- Flujo aire: 400 ml/min.
- Flujo nitrógeno: 40 ml/min.

❖ Condiciones del horno:

- Temperatura del horno: 170°C (30 min.) a 200°C a 5°C/min.
- Flujo del gas portador (He): 1,2 ml/min.

Para la expresión de resultados se calcula el contenido de cada pico, expresado como porcentaje en masa, mediante la determinación del porcentaje que representa el área de su pico en relación con la suma de las áreas de todos los picos:

$$A_i / \Sigma A \times 100$$

Siendo:

$A_i$ : área del pico correspondiente al componente i.

$\Sigma A$ : suma de las áreas de todos los picos.

El equipo utilizado fue un cromatógrafo de gases de la marca Agilent y modelo 7890A (Agilent, Estados Unidos).

En cuanto al equipo que se ha utilizado, consta de un sistema de inyección split-splitless 1:100, la columna de cromatografía es de la marca Supelco sp-2380 con unas dimensiones de 60m x 250 micras x 0,2 micras. Por último, el equipo utilizado consta de un detector de ionización de llama (FID).

#### **4.2.2. Tratamiento estadístico.**

Para los tres análisis realizados, las muestras se analizaron por duplicado. Se calculó el valor medio y la desviación estándar. Para establecer el grado de significación de los parámetros de interés en los perfiles lipídicos de las muestras de las distintas zonas y campañas, se aplicó el test T de Student entre las medias objeto de estudio. Se realizó un análisis de componentes principales (PCA) comparando el perfil de esteroides por campañas y por zonas.

El programa estadístico SPSS v. 25 de IBM para Windows fue utilizado para el análisis estadístico.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **5.1. Determinaciones en el aceite.**

#### **5.1.1. Determinación de la composición lipídica en aceites aragoneses de la variedad Empeltre.**

##### **5.1.1.1 Determinación de la composición esteróica.**

En las Tablas 2 y 3 se puede observar el contenido porcentual de cada uno de los esteroides estudiados, así como el contenido de esteroides totales expresado en mg/kg.

Las 14 primeras muestras corresponden a la zona del Moncayo y campaña 2017-2018; las 10 siguientes pertenecen a la campaña 2018-2019 y a la misma zona. Las 8 últimas

proceden de la zona del Bajo Aragón y de la campaña 2017-2018. Los resultados de estas últimas fueron facilitados por el Laboratorio Agroambiental de Aragón.

Los resultados del análisis sobre el contenido de esteroides mostraron que cumplían con los criterios de pureza establecidos por el Reglamento (CEE) nº 2568/1991 (CEE, 1991) (Colesterol (%):  $\leq 0,5$ ; Brasicasterol (%):  $\leq 0,1$ ; Campesterol (%):  $\leq 4,0$ ; Estigmasterol (%):  $< \text{Camp.}$ ;  $\beta$ -sitosterol (%):  $\geq 93,0$ ;  $\Delta$ -7-estigmastenol (%):  $\leq 0,5$ ; Esteroides totales (mg/kg):  $\geq 1\,000$ ).

La única excepción fue el  $\Delta$ -7-estigmastenol, cuyo contenido fue elevado en todas las muestras analizadas. Valores elevados de  $\Delta$ -7-estigmastenol en aceites Empeltre también fueron descritos por otros autores (Gracia, 2001; Gracia, 2009; Rey-Giménez et al., 2019).

En la totalidad de las muestras analizadas de la zona del Moncayo de la campaña 2017-2018 se obtuvieron valores de  $\Delta$ -7-estigmastenol por encima del límite establecido de 0,5 %, en la normativa actual (Reglamento (CEE) nº 2568/199; COI, 2018; CODEX, 1981). Sin embargo, cumplieron con el límite máximo de 0,8 %, considerado en el árbol decisional especificado en el Reglamento (CEE) nº 2568/1991 (CEE, 1991) y en el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2018). (Figura 2).

Las muestras de la zona del Moncayo y campaña 2018-2019 presentaron valores de  $\Delta$ -7-estigmastenol dentro del límite establecido por la normativa actual (Reglamento (CEE) 2568/91; COI, 2018; CODEX, 1981). Solo dos muestras superaron el valor límite de 0,5%. No obstante, cumplieron con el árbol decisional especificado el Reglamento (CEE) nº 2568/1991 (CEE, 1991) y en el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2018).

Las muestras de aceite procedentes de la zona del Bajo Aragón fueron las que mostraron valores de  $\Delta$ -7-estigmastenol más elevados. Todas las muestras mostraron valores superiores a 0,5 %; incluso una de ellas superó el límite máximo considerado de 0,80 % en el árbol decisional (Reglamento (CEE) 2568/91; COI, 2018) y consecuentemente, perdería la categorización como aceite de oliva por incumplimiento de los criterios de pureza.

Sin embargo, valores de  $\Delta$ -7-estigmastenol por encima 0,50 % significarían la pérdida de categorización como aceite de oliva, por incumplimiento de este parámetro



normativo, para legislaciones ajenas a la europea o al COI. Por ejemplo, según la norma del CODEX (Codex, 1981) los aceites con esta característica perderían la categoría de aceite de oliva aunque también podrían comercializarse como “coupage”.

El incumplimiento de los criterios de pureza que deben cumplir los aceites de oliva en cuanto al contenido de esteroides también se han descrito para aceites de otras variedades. Otros autores han descrito contenidos altos de campesterol (>4%) para aceites de la variedades Morrut (Romero, Ninot, Hermoso, 2016) y Cornicabra (Fregapane y Salvador, 2016). No obstante el contenido de campesterol en los aceites Empeltre cumplió con los criterios de pureza. El contenido en este esteroide fue más elevado en las muestras de la zona del Bajo Aragón que en las muestras pertenecientes a la zona del Moncayo.

El contenido en esteroides totales fue superior en las muestras de aceites del Bajo Aragón, donde la mayoría de muestras superaron los 1500 mg/kg. Aceites de oliva de la variedad Empeltre con elevadas concentraciones de esteroides totales ya fueron descritos por otros autores (Gracia, 2001).

El estigmasterol presentó concentraciones superiores en las muestras de la campaña 2018-19 que en las muestras de la 2017-18. Gracia (2001) ya describió diferencias entre campañas para este esteroide. Los resultados fueron semejantes a los descritos por autores (Gracia, Royo, Guillén, 2009). Las concentraciones de estigmasterol en aceites de la zona del Moncayo fueron similares a las de los aceites de la zona del Bajo Aragón.

El contenido de dialcoholes triterpénicos (eritrodiol + uvaol) fue superior en la campaña 2018-19 que en la campaña 2017-18. Los valores de eritrodiol + uvaol cumplieron, en las dos campañas, con los límites legales de la normativa actual ( $\leq 4,5$  %) descritos en el Reglamento (CEE) nº 2568/1991 (CEE, 1991) y en el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2018). En ambas campañas (17-18 y 18-19) los valores de los dialcoholes triterpénicos fueron más elevados ( $\approx 2\%$ ) comparados con los descritos por otros autores en aceites de otras variedades (Gracia, Royo, Guillén, 2009). No obstante, Gracia (2001) describió valores de eritrodiol + uvaol similares en aceites de la variedad Empeltre.

En vista de los resultados obtenidos, se planteó un estudio estadístico para comparar las diferencias en la composición esterólica de los principales esteroides por zonas y por campañas, prestando una especial atención al  $\Delta$ -7-estigmastenol.

Muestra	Esteroides totales	Campesterol	Estigmastenol	$\beta$ -sitosterol aparente	$\Delta$ -5-Avenasterol	$\Delta$ -7-Estigmastenol	$\Delta$ -7-Avenasterol
252B	1813	2,90	0,75	93,91	5,94	<b>0,73</b>	1,20
262B	1714	2,94	0,59	93,97	6,12	<b>0,78</b>	1,24
272B	1643	2,89	0,41	94,16	6,89	<b>0,74</b>	1,30
282B	1795	3,05	0,43	93,99	5,79	<b>0,81</b>	1,29
292B	1598	2,99	0,75	93,96	10,10	<b>0,61</b>	1,07
302B	1676	3,35	0,43	93,92	7,22	<b>0,51</b>	1,09
312B	1524	3,04	0,40	93,96	8,54	<b>0,66</b>	1,41
322B	1410	3,09	0,74	93,88	9,88	<b>0,58</b>	0,98

**Tabla 2:** Concentración de esteroides en las muestras del Bajo Aragón objeto de estudio. En negrita aparecen los valores que podrían comprometer los límites de la Normativa Comunitaria.

Muestra	Esteroles totales	Colesterol	Brassicasterol	Campesterol	Estigmasterol	$\beta$ -sitosterol aparente	$\beta$ -Sitosterol	Sitosterol	$\Delta$ -5-Avenasterol	$\Delta$ -7-Estigmasterol	$\Delta$ -7-Avenasterol	Eritrodiol+uvaol
11M	1300 $\pm$ 148	0,09 $\pm$ 0,09	0,03 $\pm$ 0,05	2,94 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,02	93,93 $\pm$ 0,15	81,87 $\pm$ 0,84	0,61 $\pm$ 0,09	53 $\pm$ 0,47	<b>0,55</b> $\pm$ 0,02	1,15 $\pm$ 0,09	0,93 $\pm$ 0,00
21M	1313 $\pm$ 88	0,09 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,01	2,92 $\pm$ 0,00	0,64 $\pm$ 0,04	94,04 $\pm$ 0,05	82,76 $\pm$ 0,15	0,59 $\pm$ 0,03	2,89 $\pm$ 0,05	<b>0,56</b> $\pm$ 0,03	1,14 $\pm$ 0,03	1,10 $\pm$ 0,41
31M	1380 $\pm$ 102	0,07 $\pm$ 0,00	0,02 $\pm$ 0,02	2,94 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,02	93,94 $\pm$ 0,11	83,50 $\pm$ 0,27	0,54 $\pm$ 0,02	8,03 $\pm$ 0,08	<b>0,58</b> $\pm$ 0,04	1,16 $\pm$ 0,05	1,73 $\pm$ 0,00
41M	1493 $\pm$ 25	0,08 $\pm$ 0,01	<0,01	2,84 $\pm$ 0,02	0,72 $\pm$ 0,02	93,94 $\pm$ 0,04	84,63 $\pm$ 0,08	0,54 $\pm$ 0,00	7,14 $\pm$ 0,04	<b>0,71</b> $\pm$ 0,05	1,24 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,90
51M	1473 $\pm$ 4	0,08 $\pm$ 0,02	0,01 $\pm$ 0,01	2,81 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,00	94,02 $\pm$ 0,12	84,50 $\pm$ 0,04	0,51 $\pm$ 0,01	7,13 $\pm$ 0,05	<b>0,65</b> $\pm$ 0,01	1,20 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 1,08
61M	1454 $\pm$ 124	0,09 $\pm$ 0,02	<0,01	2,99 $\pm$ 0,01	0,87 $\pm$ 0,00	93,61 $\pm$ 0,37	83,67 $\pm$ 0,83	0,72 $\pm$ 0,04	7,18 $\pm$ 0,31	<b>0,63</b> $\pm$ 0,07	1,13 $\pm$ 0,12	2,06 $\pm$ 0,13
71M	1441 $\pm$ 127	0,09 $\pm$ 0,04	0,03 $\pm$ 0,04	2,82 $\pm$ 0,02	0,60 $\pm$ 0,00	93,78 $\pm$ 0,52	83,72 $\pm$ 1,21	0,51 $\pm$ 0,06	7,76 $\pm$ 0,63	<b>0,72</b> $\pm$ 0,01	1,11 $\pm$ 0,19	1,34 $\pm$ 0,77
81M	1395 $\pm$ 15	0,10 $\pm$ 0,03	0,06 $\pm$ 0,06	2,89 $\pm$ 0,08	0,68 $\pm$ 0,02	93,71 $\pm$ 0,02	84,09 $\pm$ 0,14	0,54 $\pm$ 0,11	7,32 $\pm$ 0,02	<b>0,71</b> $\pm$ 0,02	1,31 $\pm$ 0,06	1,57 $\pm$ 0,14
91M	1263 $\pm$ 158	0,07 $\pm$ 0,00	0,05 $\pm$ 0,02	2,91 $\pm$ 0,04	0,52 $\pm$ 0,02	94,13 $\pm$ 0,03	83,21 $\pm$ 0,53	0,59 $\pm$ 0,01	8,78 $\pm$ 0,41	<b>0,61</b> $\pm$ 0,00	1,15 $\pm$ 0,02	1,41 $\pm$ 0,81
101M	1344 $\pm$ 25	0,09 $\pm$ 0,00	0,06 $\pm$ 0,08	2,91 $\pm$ 0,01	0,65 $\pm$ 0,03	93,96 $\pm$ 0,08	83,80 $\pm$ 0,86	0,57 $\pm$ 0,02	8,06 $\pm$ 0,16	<b>0,60</b> $\pm$ 0,01	1,23 $\pm$ 0,04	2,26 $\pm$ 0,11
111M	1439 $\pm$ 118	0,10 $\pm$ 0,02	<0,01	2,80 $\pm$ 0,03	0,67 $\pm$ 0,02	93,90 $\pm$ 0,17	83,82 $\pm$ 0,82	0,50 $\pm$ 0,03	7,88 $\pm$ 0,57	<b>0,71</b> $\pm$ 0,02	1,26 $\pm$ 0,02	1,31 $\pm$ 0,26
121M	1392 $\pm$ 169	0,11 $\pm$ 0,06	<0,01	2,80 $\pm$ 0,00	0,72 $\pm$ 0,01	93,67 $\pm$ 0,45	83,56 $\pm$ 1,37	0,54 $\pm$ 0,05	7,81 $\pm$ 0,69	<b>0,71</b> $\pm$ 0,06	1,33 $\pm$ 0,29	1,89 $\pm$ 0,49
131M	1426 $\pm$ 78	0,07 $\pm$ 0,00	<0,01	2,88 $\pm$ 0,02	0,65 $\pm$ 0,02	94,15 $\pm$ 0,24	84,21 $\pm$ 1,07	0,59 $\pm$ 0,05	7,65 $\pm$ 0,41	<b>0,61</b> $\pm$ 0,03	1,17 $\pm$ 0,07	1,97 $\pm$ 0,24
141M	1344 $\pm$ 113	0,08 $\pm$ 0,01	0,06 $\pm$ 0,06	2,92 $\pm$ 0,01	0,75 $\pm$ 0,02	94,06 $\pm$ 0,19	84,29 $\pm$ 0,90	0,65 $\pm$ 0,04	7,60 $\pm$ 0,43	0,56 $\pm$ 0,06	1,06 $\pm$ 0,14	2,02 $\pm$ 0,19
152M	1345 $\pm$ 52	0,11 $\pm$ 0,00	<0,01	2,89 $\pm$ 0,07	1,08 $\pm$ 0,04	94,00 $\pm$ 0,09	82,96 $\pm$ 0,57	0,62 $\pm$ 0,03	8,79 $\pm$ 0,35	0,50 $\pm$ 0,02	0,83 $\pm$ 0,09	2,18 $\pm$ 0,54
162M	1309 $\pm$ 110	0,11 $\pm$ 0,03	<0,01	2,87 $\pm$ 0,04	1,19 $\pm$ 0,01	93,95 $\pm$ 0,05	82,30 $\pm$ 0,75	0,89 $\pm$ 0,44	9,32 $\pm$ 0,33	0,42 $\pm$ 0,03	0,88 $\pm$ 0,02	1,19 $\pm$ 0,38
172M	1293 $\pm$ 84	0,09 $\pm$ 0,01	<0,01	2,85 $\pm$ 0,03	1,25 $\pm$ 0,00	93,94 $\pm$ 0,08	82,08 $\pm$ 0,13	0,57 $\pm$ 0,01	9,57 $\pm$ 0,05	0,39 $\pm$ 0,01	0,91 $\pm$ 0,02	1,17 $\pm$ 0,32
182M	1456 $\pm$ 143	0,10 $\pm$ 0,05	0,04 $\pm$ 0,05	2,76 $\pm$ 0,01	1,45 $\pm$ 0,01	93,29 $\pm$ 0,28	82,26 $\pm$ 1,11	0,39 $\pm$ 0,02	8,91 $\pm$ 0,51	<b>0,66</b> $\pm$ 0,04	1,22 $\pm$ 0,08	2,16 $\pm$ 0,30
192M	1444 $\pm$ 155	0,09 $\pm$ 0,01	0,01 $\pm$ 0,02	2,87 $\pm$ 0,01	1,22 $\pm$ 0,03	94,07 $\pm$ 0,29	81,12 $\pm$ 0,93	0,66 $\pm$ 0,02	10,76 $\pm$ 0,45	0,36 $\pm$ 0,09	0,77 $\pm$ 0,05	2,30 $\pm$ 0,61
202M	1257 $\pm$ 198	0,07 $\pm$ 0,02	<0,01	2,96 $\pm$ 0,01	1,33 $\pm$ 0,09	93,71 $\pm$ 0,33	81,19 $\pm$ 0,92	0,72 $\pm$ 0,03	10,47 $\pm$ 0,53	0,38 $\pm$ 0,01	0,83 $\pm$ 0,10	2,34 $\pm$ 0,68
212M	1389 $\pm$ 73	0,07 $\pm$ 0,02	<0,01	2,86 $\pm$ 0,04	1,19 $\pm$ 0,02	94,24 $\pm$ 0,09	83,20 $\pm$ 0,10	0,78 $\pm$ 0,05	8,86 $\pm$ 0,16	0,42 $\pm$ 0,02	0,69 $\pm$ 0,02	2,47 $\pm$ 0,07
222M	1396 $\pm$ 76	0,08 $\pm$ 0,02	0,01 $\pm$ 0,02	2,96 $\pm$ 0,03	0,88 $\pm$ 0,01	94,25 $\pm$ 0,01	83,62 $\pm$ 0,40	0,60 $\pm$ 0,02	8,42 $\pm$ 0,34	0,41 $\pm$ 0,03	0,87 $\pm$ 0,07	1,31 $\pm$ 0,99
232M	1332 $\pm$ 133	0,11 $\pm$ 0,00	<0,01	2,72 $\pm$ 0,02	1,62 $\pm$ 0,02	93,33 $\pm$ 0,17	81,66 $\pm$ 0,58	0,50 $\pm$ 0,01	9,44 $\pm$ 0,35	0,49 $\pm$ 0,02	1,10 $\pm$ 0,05	1,74 $\pm$ 0,87
242M	1390 $\pm$ 96	0,09 $\pm$ 0,01	<0,01	2,90 $\pm$ 0,02	0,67 $\pm$ 0,02	94,09 $\pm$ 0,06	84,49 $\pm$ 0,03	0,57 $\pm$ 0,05	7,46 $\pm$ 0,10	<b>0,57</b> $\pm$ 0,00	1,12 $\pm$ 0,03	1,66 $\pm$ 0,81

**Tabla 3:** Concentración de esteroides en las muestras de la zona del Moncayo objeto de estudio. Valores medios  $\pm$  SD (n=2). En negrita aparecen los valores que podrían comprometer los límites de la Normativa Comunitaria.

### 5.1.1.2. Determinación de alcoholes alifáticos.

En la Tabla 4 se puede observar el contenido de cada uno de los alcoholes alifáticos, expresados en mg/kg para las diferentes muestras.

Se analizaron las muestras de aceites correspondientes a la zona del Moncayo. Las 14 primeras pertenecían la campaña 2017-18, mientras que las 10 restantes correspondían a la campaña 2018-19.

El contenido en alcoholes alifáticos totales en este estudio presentó un rango de 86-213 mg/kg, siendo algo más elevado en comparación con lo descrito por otros autores (Gracia, Royo, Guillén, 2009), que indicaban un rango de 79-123 mg/kg para aceites de oliva Empeltre.

Los resultados de los análisis obtenidos expresaron que la totalidad de las muestras estudiadas presentaban valores dentro de los contemplados en la normativa actual (<350 mg/kg) para aceites de oliva (Reglamento (CEE) 2568/91; COI, 2018; CODEX, 1981). En vista de que la legislación (Reglamento (CEE) 2568/91; COI, 2018) solo estipula el contenido de alcoholes alifáticos totales como criterio de pureza y que ambas campañas muestran contenidos similares y siempre dentro de la legislación se consideró no necesario realizar un estudio estadístico sobre la comparación del contenido en alcoholes alifáticos de las campañas 2017-18 y 2018-19.

Muestra	C22	C24	C26	C28	TOTALES
11M	25±3	42±5	36±5	24±2	117±15
21M	29±5	44±8	37±7	14±3	124±22
31M	24±3	41±6	34±5	23±2	113±16
41M	33±4	51±5	41±4	16±2	141±14
51M	30±3	47±3	38±1	15±0	128±8
61M	37±9	74±18	64±17	26±7	202±50
71M	16±3	31±7	28±6	12±3	86±19
81M	25±0	53±1	39±0	15±0	132±1
91M	38±4	56±6	45±4	15±1	155±15
101M	35±1	59±1	49±0	18±1	162±0
111M	33±1	55±4	45±4	16±1	148±10
121M	33±1	54±2	46±4	17±2	150±9
131M	36±2	64±2	51±0	19±1	171±3
141M	41±3	64±6	57±5	20±1	182±14
152M	22±3	33±6	37±7	13±3	106±19
162M	22±1	34±2	40±3	14±2	110±8
172M	20±2	29±4	34±4	12±2	95±12
182M	31±0	51±0	52±0	21±0	155±0
192M	24±17	34±23	45±31	17±12	121±83
202M	21±13	30±18	42±24	15±8	109±64
212M	33±1	47±2	64±3	23±0	167±7
222M	35±6	52±9	53±8	17±2	157±25
232M	43±9	58±11	58±10	21±3	180±33
242M	53±8	74±10	62±8	23±2	213±28

**Tabla 4:** Concentración de alcoholes alifáticos en las muestras objeto de estudio. Valores medios ± SD (n=2).

### 5.1.1.3. Determinación de la composición en ácidos grasos.

En las Tablas 5 y 6 se puede observar la composición porcentual de los ácidos grasos presentes en los aceites de oliva, así como la relación entre los ácidos grasos monoinsaturados (AGM) y poliinsaturados (AGP).

Las 14 primeras muestras correspondían a la zona del Moncayo y campaña 2017-2018; las 10 siguientes pertenecían a la campaña 2018-2019 y a la misma zona. Las 8 últimas procedían de la zona del Bajo Aragón y de la campaña 2017-2018. Los resultados de estas últimas fueron facilitados por el Laboratorio Agroambiental de Aragón.

La totalidad de las muestras de aceites estudiadas cumplieron con los requisitos estipulados por la legislación actual (Reglamento (CEE) 2568/91; COI, 2018; CODEX, 1981) para la categorización como aceite de oliva ((%)  $\leq 0,05$  de Mirístico,  $\leq 1,0$  Linolénico,  $\leq 0,6$  Araquídico,  $\leq 0,4$  Eicosenoico,  $\leq 0,2$  Behénico,  $\leq 0,2$  Lignocérico, 7,5-20,0 Palmítico, Palmitoleico: 0,3-3,5; Heptadecanoico:  $\leq 0,3$ ; Heptadecenoico:  $\leq 0,3$ ; Estéarico: 0,5-5,0; Oleico: 55,0-83,0; Linoleico: 3,5-21,0).

No obstante, observando las Tabla 5 y 6 se pueden apreciar diferencias entre las zonas y campañas en la composición de los principales ácidos grasos presentes en el aceite: palmítico (C16:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3) y la relación entre los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados. El resto de ácidos grasos estudiados no mostraron diferencias relevantes. Otros autores han descrito variaciones en el perfil de ácidos grasos en clones de aceites Empeltre (Rey-Giménez et al., 2019).

El ácido oleico es el principal ácido graso en el aceite de oliva. Los resultados obtenidos mostraron un elevado contenido en C18:1 en las muestras de la zona del Moncayo, ya que en todas se dieron contenidos superiores al 73%. Las muestras del Bajo Aragón por su parte tuvieron valores entorno al 70%. La campaña que presentó muestras con valores más elevados fue la campaña 2018-19 con valores de alrededor del 75%. Gracia (2001) describió diferencias entre concentraciones de oleico entre distintas campañas. El ácido linoleico es un ácido mayoritario en la composición lipídica del aceite de oliva. En los análisis realizados se observaron diferencias entre las muestras de la zona del Moncayo y la zona del Bajo Aragón. Los aceites de la zona del Bajo Aragón mostraron concentraciones superiores ( $\approx 12\%$ ) a las concentraciones que obtuvieron los aceites de la zona del Moncayo ( $\approx 9\%$ ). El ácido linolénico presentó valores superiores en las muestras del Bajo Aragón ( $\approx 0,70\%$ ) asemejándose a lo descrito por otros autores en

estudios sobre aceites Empeltre (Gracia, Royo, Guillén, 2009). Las muestras de la zona del Moncayo presentaron valores inferiores ( $\approx 0,60\%$ ) siendo los valores de las muestras de la campaña 2017-18 superiores a los de los aceites estudiados de la campaña 2018-19. Diversos autores (Gracia, Royo, Guillén, 2009) han descrito la importancia de la relación oleico/linoleico en la calidad nutricional de los aceites y en su estabilidad oxidativa. En este trabajo se estudió la relación entre AGM/AGP. Esta relación obtuvo valores superiores en las muestras de la zona del Moncayo ( $\approx 7-9$ ) en comparación con las muestras del Bajo Aragón ( $\approx 5-6$ ). Entre los aceites de la zona del Moncayo, las muestras de la campaña 2018-19 tuvieron valores superiores ( $>8$ ) a los que mostraron las muestras de la campaña 2017-18 ( $<8$ ). El palmítico es el ácido saturado mayoritario en el aceite de oliva. A pesar de que los contenidos en C16:0 de todos los aceites analizados fueron similares (10-15%), las muestras estudiadas del Bajo Aragón presentaron mayor contenido en este ácido con muestras que incluso superaron el 12% llegando hasta el 15%. Sin embargo las muestras de la zona del Moncayo mostraron concentraciones entorno al 11 o al 12%.

A la vista de las diferencias observadas, se planteó un estudio estadístico comparando la composición de los principales ácidos grasos por zonas en una misma campaña (zona del Moncayo y del Bajo Aragón) y por campañas (2017-18 y 2018-19) de las muestras de la zona del Moncayo.

Muestra	Palmítico	Estearico	Oleico	Linoleico	Linolénico	AGM/AGP
251B	15,05	1,92	69,21	10,64	0,52	6,5
261B	12,32	2,06	70,80	11,73	0,78	5,5
271B	11,71	2,32	71,01	12,06	0,75	5,5
281B	12,19	2,29	69,07	13,41	0,82	5,1
291B	13,42	1,93	69,83	11,62	0,67	6,0
301B	11,70	3,38	70,30	11,59	0,93	6,0
311B	11,90	2,34	70,09	12,75	0,44	5,5
321B	12,30	2,14	71,77	10,86	0,65	6,1

**Tabla 5:** Contenido de ácidos grasos en las muestras del Bajo Aragón objeto de estudio (%).

Muestra	Mirístico	Palmitico	Palmitoleico	Heptadecanoico	Heptadecenoico	Esteárico	Oleico	Linoleico	Linolénico	Araquídico	Eicosenoico	Behénico	Lignocérico	AGM/AGP
11M	0,01±0,00	11,77±0,04	1,00±0,01	0,11±0,00	0,23±0,00	1,89±0,01	74,75±0,30	8,98±0,03	0,60±0,00	0,34±0,01	0,32	0,11±0,00	0,05±0,00	7,93±0,04
21M	0,01±0,00	11,31±0,00	0,92±0,01	0,11±0,00	0,23±0,00	2,00±0,01	75,31±0,26	8,87±0,03	0,59±0,01	0,34±0,00	0,32	0,12±0,01	0,05±0,00	8,08±0,03
31M	0,01±0,00	11,91±0,00	1,02±0,00	0,11±0,00	0,24±0,00	1,82±0,00	74,04±0,05	9,41±0,05	0,61±0,00	0,33±0,00	0,32±0,00	0,12±0,00	0,05±0,00	7,52±0,04
41M	0,01±0,00	11,37±0,06	0,92±0,01	0,11±0,00	0,24±0,00	2,84±0,01	74,89±0,12	9,19±0,05	0,61±0,01	0,33±0,00	0,32±0,00	0,12±0,00	0,05±0,00	7,75±0,03
51M	0,01±0,00	11,51±0,00	0,24±0,00	0,11±0,00	0,24±0,00	1,86±0,00	74,66±0,02	9,25±0,01	0,62±0,00	0,33±0,00	0,32±0,00	0,12±0,00	0,05±0,00	7,68±0,01
61M	0,01±0,00	12,87±0,00	1,14±0,00	0,11±0,00	0,25±0,00	1,80±0,00	72,99±0,04	9,35±0,01	0,66±0,00	0,34±0,00	0,31±0,01	0,11±0,01	0,06±0,00	7,39±0,09
71M	0,01±0,00	12,11±0,05	1,05±0,01	0,10±0,00	0,23±0,00	1,85±0,00	74,18±0,04	9,06±0,00	0,60±0,00	0,33±0,00	0,31±0,01	0,11±0,01	0,05±0,01	7,80±0,01
81M	0,01±0,00	12,66±0,05	1,10±0,00	0,11±0,00	0,25±0,00	1,76±0,00	73,25±0,07	9,43±0,00	0,64±0,00	0,33±0,00	0,31±0,00	0,11±0,01	0,05±0,01	7,37±0,05
91M	0,01±0,00	11,04±0,01	0,75±0,10	0,12±0,00	0,24±0,00	2,23±0,00	75,07±0,13	9,13±0,00	0,60±0,00	0,35±0,00	0,30±0,00	0,11±0,02	0,04±0,00	7,81±0,02
101M	0,01±0,00	11,07±0,01	0,87±0,00	0,10±0,00	0,23±0,00	1,98±0,00	75,80±0,02	8,48±0,00	0,57±0,00	0,35±0,00	0,35±0,01	0,12±0,00	0,06±0,00	8,49±0,03
111M	0,01±0,00	11,36±0,03	0,93±0,00	0,10±0,00	0,22±0,00	1,93±0,01	74,59±0,06	9,47±0,04	0,60±0,00	0,32±0,00	0,30±0,00	0,11±0,01	0,05±0,01	7,49±0,08
121M	0,01±0,00	11,32±0,01	0,93±0,01	0,10±0,00	0,23±0,00	1,93±0,01	74,75±0,04	9,32±0,02	0,61±0,02	0,33±0,00	0,30±0,00	0,11±0,01	0,05±0,00	7,65±0,03
131M	0,01±0,00	11,47±0,19	0,96±0,03	0,10±0,00	0,23±0,00	1,91±0,02	74,83±0,10	9,09±0,32	0,61±0,01	0,33±0,00	0,32±0,00	0,11±0,00	0,04±0,00	7,89±0,32
141M	0,01±0,00	10,76±0,01	0,83±0,00	0,09±0,00	0,20±0,00	2,23±0,00	76,68±0,03	7,76±0,01	0,56±0,01	0,37±0,01	0,35±0,01	0,12±0,00	0,06±0,00	9,34±0,03
152M	0,01±0,00	11,21±0,07	0,87±0,00	0,10±0,00	0,23±0,00	1,87±0,01	76,42±0,09	7,89±0,01	0,57±0,00	0,33±0,00	0,33±0,01	0,12±0,01	0,05±0,00	9,18±0,02
162M	0,01±0,00	11,47±0,05	0,90±0,01	0,10±0,00	0,23±0,00	1,91±0,01	75,97±0,07	8,01±0,02	0,57±0,00	0,34±0,00	0,11±0,00	0,11±0,00	0,05±0,01	8,99±0,03
172M	0,01±0,00	11,43±0,01	0,52±0,55	0,44±0,48	0,23±0,00	1,86±0,00	76,19±0,11	7,91±0,03	0,57±0,00	0,33±0,00	0,32±0,01	0,12±0,00	0,05±0,00	9,08±0,01
182M	0,01±0,00	13,17±0,03	1,17±0,01	0,10±0,01	0,24±0,00	1,73±0,00	72,50±0,09	9,66±0,00	0,61±0,00	0,32±0,00	0,31±0,01	0,10±0,00	0,05±0,00	7,20±0,00
192M	0,01±0,00	11,37±0,03	0,88±0,00	0,11±0,00	0,23±0,00	2,08±0,00	75,92±0,02	7,97±0,00	0,55±0,03	0,37±0,03	0,33±0,01	0,12±0,00	0,06±0,00	9,06±0,03
202M	0,01±0,00	11,44±0,00	0,87±0,00	0,11±0,00	0,22±0,00	2,16±0,00	76,14±0,01	7,62±0,00	0,55±0,00	0,37±0,00	0,33±0,01	0,12±0,00	0,06±0,00	9,46±0,00
212M	0,01±0,00	11,15±0,00	0,86±0,00	0,11±0,00	0,22±0,00	2,07±0,00	76,32±0,00	7,86±0,00	0,60±0,00	0,34±0,00	0,30±0,00	0,11±0,00	0,03±0,03	9,16±0,00
222M	0,01±0,00	10,65±0,02	0,77±0,00	0,11±0,00	0,24±0,00	2,11±0,00	76,85±0,00	7,85±0,00	0,58±0,00	0,35±0,00	0,26±0,07	0,12±0,00	0,05±0,00	9,12±0,01
232M	0,01±0,00	11,57±0,04	0,88±0,00	0,11±0,00	0,23±0,00	1,89±0,00	75,52±0,02	8,35±0,02	0,54±0,01	0,36±0,00	0,35±0,01	0,13±0,00	0,06±0,00	8,63±0,02
242M	0,01±0,00	10,87±0,04	0,82±0,00	0,12±0,00	0,24±0,00	2,01±0,00	75,46±0,04	9,00±0,00	0,56±0,00	0,38±0,00	0,35±0,00	0,12±0,00	0,06±0,00	8,01±0,01

**Tabla 6:** Contenido de ácidos grasos en las muestras objeto de estudio (%). Valores medios ± SD (n=2).

## 5.2. Análisis estadístico.

### 5.2.1. Comparación entre las campañas 2017-18 y 2018-19 en muestras del Moncayo.

#### 5.2.1.1 Comparación en la composición de esteroides.

Como se puede observar en la Tabla 7, donde se indica la concentración de los principales esteroides de la zona del Moncayo en la campaña 2017-18 y 2018-19; no se encontraron diferencias significativas en el contenido de esteroides totales ni en el porcentaje de campesterol. Sin embargo, se encontraron diferencias significativas en el resto de esteroides estudiados. Diferencias significativas en la composición esteroidea de aceites Empeltre en distintas campañas fueron descritas por otros autores (Romero, Tous, Gracia, 2011 y Gracia, 2001).

El  $\Delta$ -7-estigmastenol sería el único esteroide estudiado que pondría en compromiso la clasificación comercial basándose en la legislación actual (Reglamento (CEE) 2568/91; COI, 2018; CODEX, 1981) debido a sus valores elevados. El límite para este parámetro es de 0,5%. Por tanto las muestras de aceites de la campaña 2018-19 cumplirían con este criterio, contrastando con el valor medio de las muestras de la campaña 2017-18 (0,64 %) que estaría por encima de lo estipulado en la normativa vigente. Sin embargo, estaría dentro del valor especificado (0,8%) en el árbol de decisiones descrito en el Reglamento (CEE) nº 2568/1991 (CEE, 1991) y en el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2018).

Esteroides % m/m	MUESTRAS	
	2017-2018	2018-2019
<b>Esteroides totales (mg/kg)</b>	1390 $\pm$ 69 a*	1361 $\pm$ 65 a
<b>Campesterol</b>	2,88 $\pm$ 0,06 a	2,87 $\pm$ 0,07 a
<b>Estigmastenol</b>	0,69 $\pm$ 0,08 a	1,19 $\pm$ 0,27 b
<b><math>\beta</math>-sitosterol aparente</b>	93,92 $\pm$ 0,17 a	93,89 $\pm$ 0,34 b
<b><math>\Delta</math>-5-Avenasterol</b>	7,91 $\pm$ 0,72 a	9,20 $\pm$ 0,96 b
<b><math>\Delta</math>-7-Estigmastenol</b>	0,64 $\pm$ 0,06 a	0,46 $\pm$ 0,09 b
<b><math>\Delta</math>-7-Avenasterol</b>	1,19 $\pm$ 0,08 a	0,92 $\pm$ 0,17 b

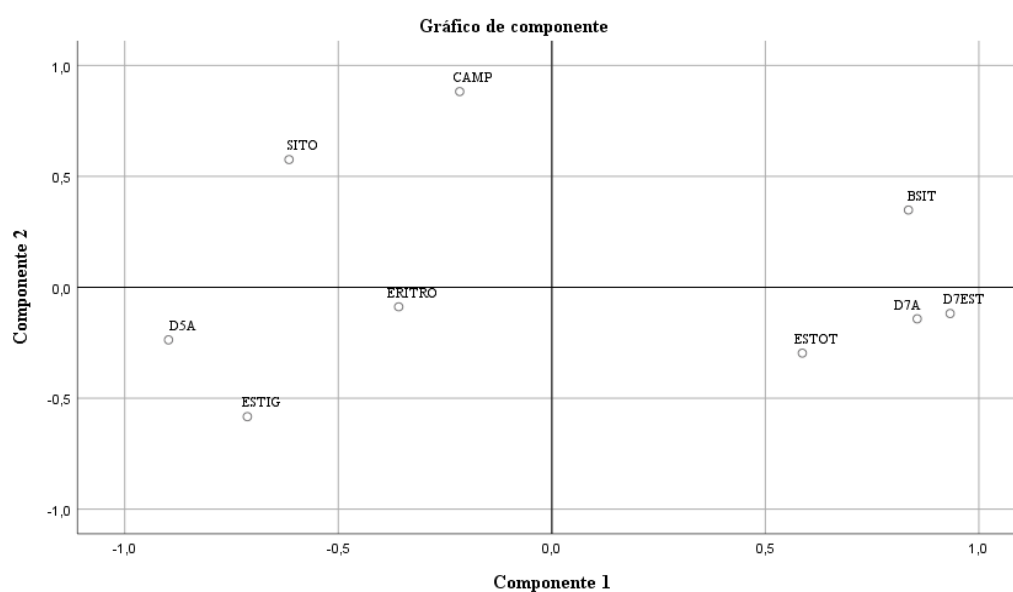
**Tabla 7:** Contenido de los principales esteroides en aceites de la zona del Moncayo en la campaña 2017-18 y 2018-19. \* Valores medios (de las distintas campañas) con distinta letra en distinta columna indican diferencias significativas entre campaña ( $p < 0,05$ ) según test T de Student. Valores medios  $\pm$  SD.

Una vez se observó que había diferencias significativas en la composición de esteroides entre distintas campañas, se realizó un Análisis de Componentes Principales para

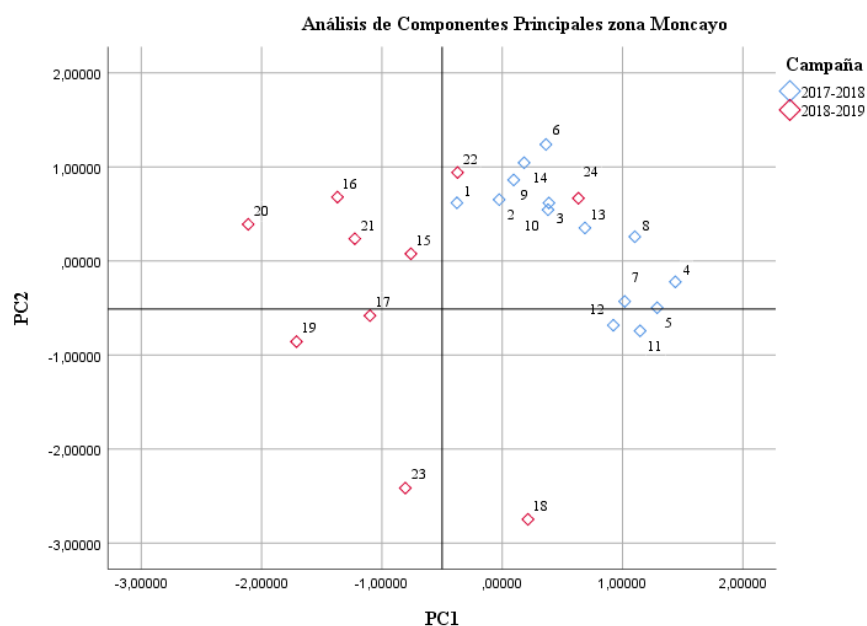


determinar si había una correlación entre los distintos esteroides y dialcoholes triterpénicos estudiados y las muestras de aceite analizadas.

Como puede verse en las Figuras 4 (gráfico de componentes de los esteroides estudiados) y 5 (análisis de Componentes Principales), la concentración de esteroides totales, de  $\Delta$ -7-avenasterol,  $\Delta$ -7-estigmasterol y de  $\beta$ -sitosterol es superior en las muestras de la campaña 2017-2018; mientras que el contenido en Eritrodiol-uvaol,  $\Delta$ -5-avenasterol, sitosterol y estigmasterol es superior en las muestras de la campaña 2018-2019.



**Figura 4:** Gráficos de componentes de los esteroides estudiados. Siendo SITO: sitosterol; CAMP: campesterol; D5A:  $\Delta$ -5-avenasterol; ESTIG: estigmasterol; ESTOT; esteroides totales; D7A:  $\Delta$ -7-avenasterol; D7EST:  $\Delta$ -7-estigmasterol; BSIT:  $\beta$ -sitosterol.



**Figura 5:** Análisis de Componentes principales. Muestras campaña 17-18 (azul) y 18-19(rojo).

### 5.2.1.2 Comparación en la composición de ácidos grasos.

Se estudiaron los principales ácidos grasos presentes en el aceite: palmítico (C16:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3) y la relación entre los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados.

En la Tabla 8 se muestra la concentración de los principales ácidos grasos en aceites de la zona del Moncayo en las campañas 2017-18 y 2018-19. Como puede observarse, se encontraron diferencias significativas entre los valores medios de oleico, linoleico, linolénico y en la relación de AGM y AGP de las diferentes campañas. El único ácido graso que no mostro variaciones significativas fue el palmítico. El ácido oleico tuvo mayor concentración en la campaña 18-19, mientras que el contenido del resto de ácidos grasos estudiados fue superior en la 17-18. Algunos autores ya describieron variaciones en el perfil de ácidos grasos en aceites Empeltre entre distintas campañas (Gracia, 2001).

Los valores medios de ácido oleico de las muestras estudiadas en las dos campañas mostraron valores elevados (>74 %) por comparación con los valores descritos por otros autores ( $\approx 70\%$ ) (Rey-Giménez et al., 2019), ( $\approx 66\%$ ) (Gracia, Royo, Guillén, 2009) para aceites de la variedad Empeltre. Los valores medios de los ácidos grasos poliinsaturados (C18:2 y C18:3) por su parte, mostraron valores inferiores a los descritos por dichos autores. Esto se evidencia en la relación de los AGM y AGP, para los que los valores medios descritos por otros autores estarían en un rango aproximado

de entre 4-7, inferiores a los valores de las muestras de aceites Empeltre estudiadas (7,50-9). Sin embargo, los resultados obtenidos concuerdan con los valores medios descritos por García (2001) para los ácidos grasos estudiados.

Ácidos grasos (%)	MUESTRAS	
	2017-2018	2018-2019
C16:0	11,60±0,60 a*	11,43±0,68 a
C18:1	74,70±0,94 a	75,72±1,21 b
C18:2	9,06±0,46 a	8,21±0,64 b
C18:3	0,61±0,02 a	0,57±0,02 b
AGM/AGP	7,87± 0,52 a	8,79±0,68 b

**Tabla 8:** Concentración de los principales ácidos grasos en aceites de la zona del Moncayo en la campaña 2017-18 y 2018-19. \* Valores medios con distinta letra en distinta columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según test T de Student. Valores medios  $\pm$  SD.

## 5.2.2. Comparación entre la zona del Moncayo y la zona del Bajo Aragón en la campaña 2017-18.

### 5.2.2.1 Comparación en la composición de esteroides.

En la Tabla 9 se indica la concentración de los esteroides estudiados en aceites de la campaña 2017-18 en la zona del Moncayo y en la zona del Bajo Aragón. Como puede apreciarse, se observaron diferencias significativas entre los valores medios de los esteroides totales, el campesterol y el estigmasterol de las muestras estudiadas de las distintas zonas. El contenido medio de esteroides totales y de campesterol fue superior en los aceites de la zona del Bajo Aragón, mientras que la media de los valores de estigmasterol de las muestras estudiadas fue mayor en la zona del Moncayo. Sin embargo, ni el  $\Delta$ -5-avenasterol, ni el  $\Delta$ -7-estigmastenol, ni el  $\Delta$ -7-avenasterol mostraron diferencias significativas en sus valores medios. Variaciones entre la composición esteróica de aceites Empeltre procedentes de distintas zonas fueron descritas en estudios científicos (Romero, Tous, Gracia, 2011 y Romero, Ninot, Hermoso, 2016).

El único esteroil crítico para los aceites de las dos zonas fue el  $\Delta$ -7-estigmastenol. Los valores medios de las muestras estudiadas fueron, en ambas zonas, superiores a 0,60%. Esto coincide con los resultados descritos por otros autores (Gracia, Royo, Guillén, 2009 y Rey-Giménez et al., 2019) donde el contenido de este esteroil superaba el 0,60

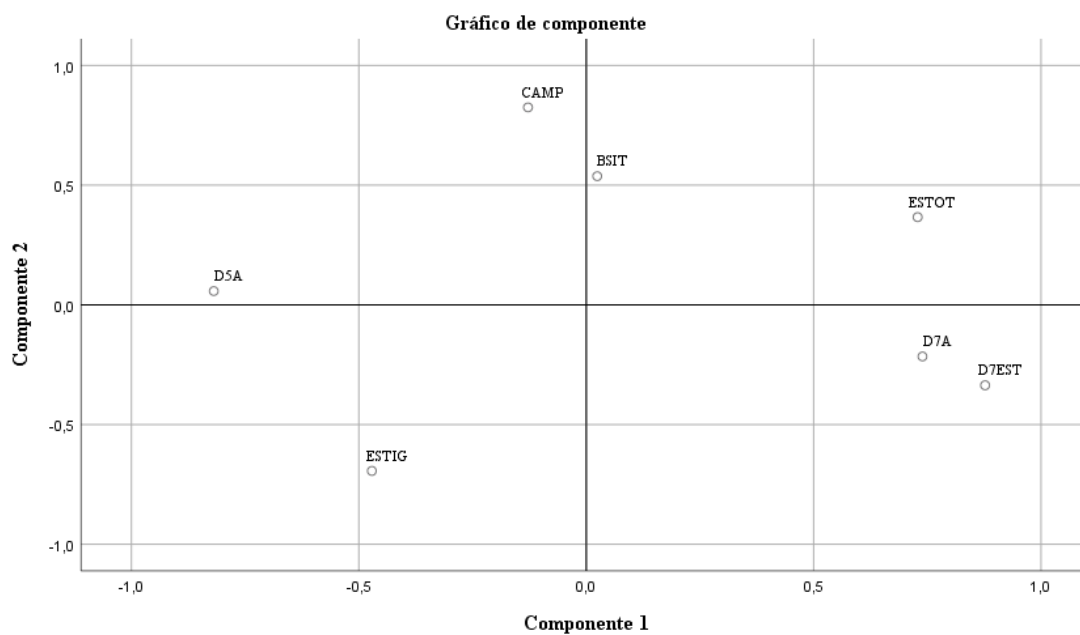
%. Esto pondría en riesgo la categorización como aceite de oliva en los aceites de ambas zonas.

Esteroles % m/m	MUESTRAS	
	Moncayo	Bajo Aragón
<b>Esteroles totales (mg/kg)</b>	1390 ±69 a*	1647±135 b
<b>Campesterol</b>	2,88±0,06 a	3,03±0,15 b
<b>Estigmasterol</b>	0,69± 0,08 a	0,56±0,16 b
<b>B-sitosterol aparente</b>	93,92±0,17 a	93,97±0,09 a
<b>Δ-5-Avenasterol</b>	7,91±0,72 a	7,56±1,74 a
<b>Δ-7-Estigmastenol</b>	0,64±0,06 a	0,68±0,10 a
<b>Δ-7-Avenasterol</b>	1,19±0,08 a	1,20±0,14 a

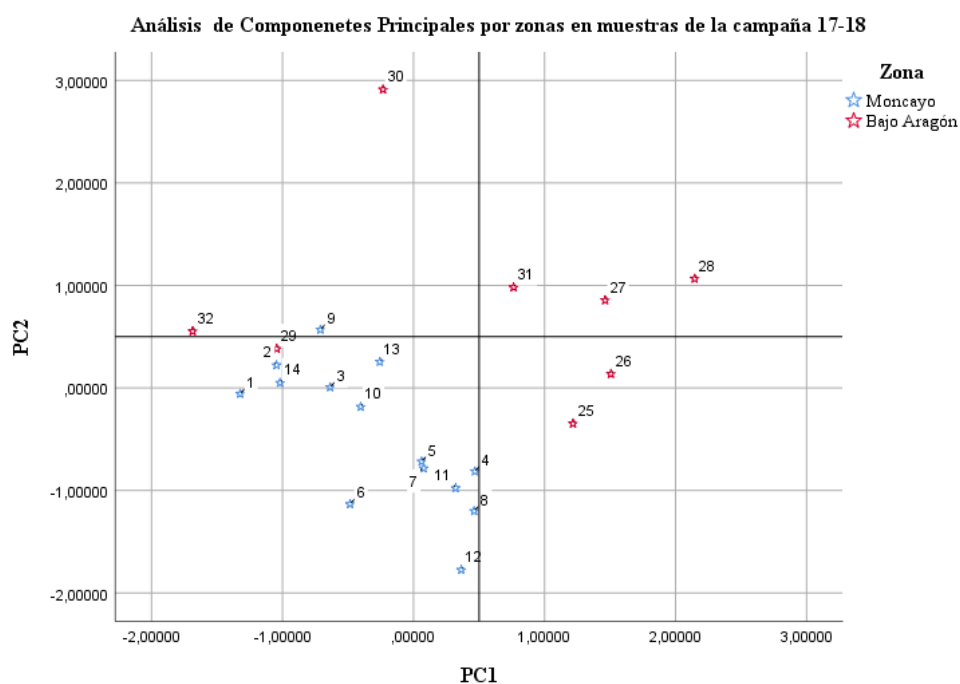
**Tabla 9:** Concentración de los principales esteroides en aceites de la campaña 2017-18 en zona del Moncayo y en la zona del Bajo Aragón. \* Valores medios con distinta letra en distinta columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según test T de Student. Valores medios  $\pm$  SD.

Una vez se observó que había diferencias significativas en la composición de esteroides entre distintas zonas, se realizó un análisis de Componentes principales para comprobar si había una correlación entre los distintos esteroides estudiados y las muestras de aceite analizadas.

En el análisis de componentes principales (PCA) (figuras 6 y 7) se puede observar como las muestras de aceites del Moncayo presentaron una concentración de estigmasterol más elevada que los aceites de la zona del Bajo Aragón. No obstante, hay un grupo de muestras del Bajo Aragón que mostraron una concentración superior de esteroides totales, Δ-7-estigmastenol, Δ-7-avenasterol y β-sitosterol aparente que las muestras de aceite de la zona del Moncayo.



**Figura 6:** Gráficos de componentes de los esteroides estudiados. Siendo CAMP: campesterol; D5A:  $\Delta$ -5-avenasterol; ESTIG: estigmasterol; ESTOT; esteroides totales; D7A:  $\Delta$ -7-avenasterol; D7EST:  $\Delta$ -7-estigmastanol; BSIT: B-sitosterol aparente.



**Figura 7:** Análisis de Componentes principales. Muestras de la zona del Moncayo (azul) y zona del Bajo Aragón (roja) en la campaña 17-18.

### 5.2.2.2 Comparación en la composición de ácidos grasos.

Se estudiaron los principales ácidos grasos presentes en el aceite de oliva: palmítico (C16:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3) y la relación entre los ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados.

En la Tabla 10 se observa la concentración de los principales ácidos grasos en aceites de la zona del Moncayo y de la zona del Bajo Aragón en la campaña 2017-18. Como se puede apreciar; el ácido oleico y el linoleico presentaron diferencias significativas en el contenido medio de las muestras analizadas. Los valores medios de ácido oleico en los aceites de la zona del Moncayo fueron significativamente superiores ( $\approx 75\%$ ) respecto a los de la zona del Bajo Aragón ( $\approx 70\%$ ). No obstante, los valores medios estudiados de ácido linoleico fueron superiores en los aceites del Bajo Aragón ( $\approx 12\%$ ) en comparación a los de la zona del Moncayo ( $\approx 9\%$ ). Por consiguiente, la relación entre AGM/AGP también mostró diferencias significativas a favor de la zona del Moncayo. El resto de ácidos grasos estudiados (C16:0, C18:3) no presentaron diferencias significativas entre las dos zonas.

Los valores medios en los ácidos grasos obtenidos en el estudio fueron similares a los valores medios descritos por otros autores en aceites de oliva Empeltre (Rey-Giménez et al., 2019).

Ácidos grasos (%)	MUESTRAS	
	Moncayo	Bajo Aragón
C16:0	11,60 $\pm$ 0,60 a*	12,57 $\pm$ 1,14 a
C18:1	74,70 $\pm$ 0,94 a	70,26 $\pm$ 0,92 b
C18:2	9,06 $\pm$ 0,46 a	11,83 $\pm$ 0,92 b
C18:3	0,61 $\pm$ 0,02 a	0,70 $\pm$ 0,16 a
AGM/AGP	7,87 $\pm$ 0,52 a	5,80 $\pm$ 0,43 b

**Tabla 10:** Concentración de los principales ácidos grasos en aceites de la zona del Moncayo y de la zona del Bajo Aragón en la campaña 2017-18. \* Valores medios con distinta letra en distinta columna indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) según test T de Student. Valores medios  $\pm$  SD.

## 6. CONCLUSIONES

- La composición de esteroides de los aceites de oliva aragoneses objeto de estudio varió con la campaña. El único esteroide crítico fue el  $\Delta$ -7-Estigmastenol que en muchos casos mostró valores elevados. El contenido en  $\Delta$ -7-Estigmastenol varió con la campaña de producción.
- La composición en alcoholes (alifáticos y triterpénicos) en estos aceites de oliva no varió con la campaña.
- El perfil de ácidos grasos de los aceites de oliva se modificó en función de la campaña de cosecha. En particular el contenido de ácido oleico, ácido linoleico y ácido linoleico mostró diferencias significativas con la campaña. El ácido oleico fue significativamente superior en la campaña 2018-19 en comparación a la campaña 2017-18. El ácido linoleico y el ácido linolénico fueron significativamente superiores en la campaña 2017-18.
- La composición de esteroides de los aceites de oliva varió con la zona de producción. El único esteroide crítico fue el  $\Delta$ -7-Estigmastenol que en muchos casos mostró valores elevados. El contenido en este compuesto no varió con la zona de producción.
- El perfil de ácidos grasos de los aceites de oliva se modificó en función de la zona de producción. El contenido de ácido oleico fue significativamente superior en la zona del Moncayo en comparación con la zona del Bajo Aragón. El contenido de ácido linoleico fue significativamente superior en la zona del Bajo Aragón.
- De forma general los perfiles lipídicos de los aceites de oliva aragoneses de la variedad Empeltre varían con la campaña y con la zona de producción.

## CONCLUSIONS

- The sterol composition of the Aragonese olive oils subject of study varied with the campaign. The only critical sterol was  $\Delta$ -7-Stigmastenol, which in many cases showed high values. The content in  $\Delta$ -7-Stigmastenol varied with the production campaign.
- The composition in alcohols (aliphatic and triterpenic) in these olive oils did not vary with the campaign.
- The fatty acid profile of olive oils was modified according to the harvest campaign. In particular the content of oleic acid, linoleic acid and linoleic acid showed significant differences with the campaign. Oleic acid was significantly higher in the 2018-19 campaign compared to the 2017-18 campaign. Linoleic acid and linolenic acid were significantly higher in the 2017-18 campaign.
- The sterol composition of olive oils varied with the production area. The only critical sterol was  $\Delta$ -7-Stigmastenol which in many cases showed high values. The content of this compound did not vary with the production area.
- The fatty acid profile of olive oils was modified according to the production area. The oleic acid content was significantly higher in the Moncayo area compared with the Bajo Aragón area. The linoleic acid content was significantly higher in the Bajo Aragon area.
- In general, the lipidic profiles of the Empeltre variety of Aragonese olive oils vary with the campaign and the production area.



## 7. VALORACIÓN PERSONAL

El cursar la asignatura Trabajo de Fin de Grado me ha aportado diversas competencias.

He ampliado mis conocimientos sobre el aceite de oliva, sobre todo en cuanto a los criterios de calidad y de pureza. He podido ver de primera mano cómo se realiza un estudio científico y he podido desarrollarlo yo mismo.

He tenido la oportunidad de realizar análisis en un Laboratorio de Control Oficial rodeado de grandes profesionales, de los que he podido aprender y con los que he podido trabajar.

He mejorado notablemente mi habilidad en el trabajo experimental, sobre todo a la hora de trabajar autónomamente y mejorar la forma de organizarme para optimizar el tiempo de trabajo. He aprendido, muy a mi pesar, a tener paciencia a la hora de obtener resultados. En cuanto a la hora de realizar el informe escrito, mejorar mi capacidad de redacción y estructuración de informes.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Aparicio, R., y Harwood, J. (2003). *Manual del aceite de oliva*. Editorial AMV, Ediciones Mundiprensa. Madrid
- Barranco, D., Fernández-Escobar, R., y Rallo, L. (2008). *El cultivo del olivo*. Ed. Junta de Andalucía y Mundi Prensa. Sevilla.
- Camacho, M.L., y Cert, A. (1994). *Recomendaciones para la palicación de algunos métodos analíticos incluidos en el reglamento CEE 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de orujo de oliva*. Sevilla: Instituto de la Grasa (CSIC).
- Codex Alimentarius (1981). Estándar for olive and olive oils. Codex Stan 33-1981. Rev. 2015.
- COI, 2009. COI/T.15/NC n°3/Rev. 4. Norma comercial aplicable a los aceites de oliva y los aceites de orujo de oliva.
- COI, 2018. COI/T.15/NC n°3/Rev. 12 (2018). Trade standard applying to olive oil an olive pomace oils.
- Fregapane, G., y Salvador, A. (2016). *Aceites de la variedad Cornicabra*. Ciudad Real: Universidad de Castilla la Mancha.
- García-Ortiz, C., Fernández Hernández, A., y Pacheco Reyes, R. (2016). *Aprovechamiento del alperujo como enmienda orgánica en el olivar*. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén.
- Gracia, M. S., Royo, A., y Guillén, M. (2009). *Composición química de aceites de las variedades Arbequina y Empeltre cultivadas en regadío*. Zaragoza: Grasas y Aceites.
- Hrnčirik, K., y 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, 504-549.
- MAPA (2018). *Estadísticas Agrícolas*. Disponible en: <https://www.aragon.es/-/estadisticas-agricolas>. [Consultado 21-08-2019]
- MAPA (2019). *Listado de denominaciones de origen protegidas e indicaciones de origen protegidas agroalimentarias registradas en la Unión Europea*. Disponible en: [https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/web-listadodops-igpsagroalimporceaa010119\\_tcm30-426472.pdf](https://www.mapa.gob.es/es/alimentacion/temas/calidad-agroalimentaria/web-listadodops-igpsagroalimporceaa010119_tcm30-426472.pdf) [Consultado 21-08-2019].
- Rey-Gimenez, R., Machina, M. D., Jimenez, J. L., Royo, A. J., Camuñas, F., Laya, D., y Sánchez-Gimeno, A. C. (2019). *Influencia de la maduración en el perfil lipídico de aceites de oliva de clones empeltre de origen aragonés*. Zaragoza: Grasas y Aceites.
- Romero, A., Ninot, A., y Hermoso, J.F. (2016). *Aceite de las variedades “Empeltre” y Morrut*. Cataluña: Investigación y tecnología agroalimentaria.
- Romero, A., Tous, J., y Gracia, M.S. (2011). *Fatty acids and sterol composition of “Empeltre” virgin oil in Ebro Valley and Balearic Islands*. Acta Horticulturae: 924.
- UNE-EN ISO/IEC 17025:2005 sobre requisitos que deben cumplir los laboratorios de ensayo y calibración.
- Vera, M. (2011). *Aceite de oliva virgen extra. Su obtención y conservación*. Ed. AMV., Madrid (España).

## ANEXO Legislación

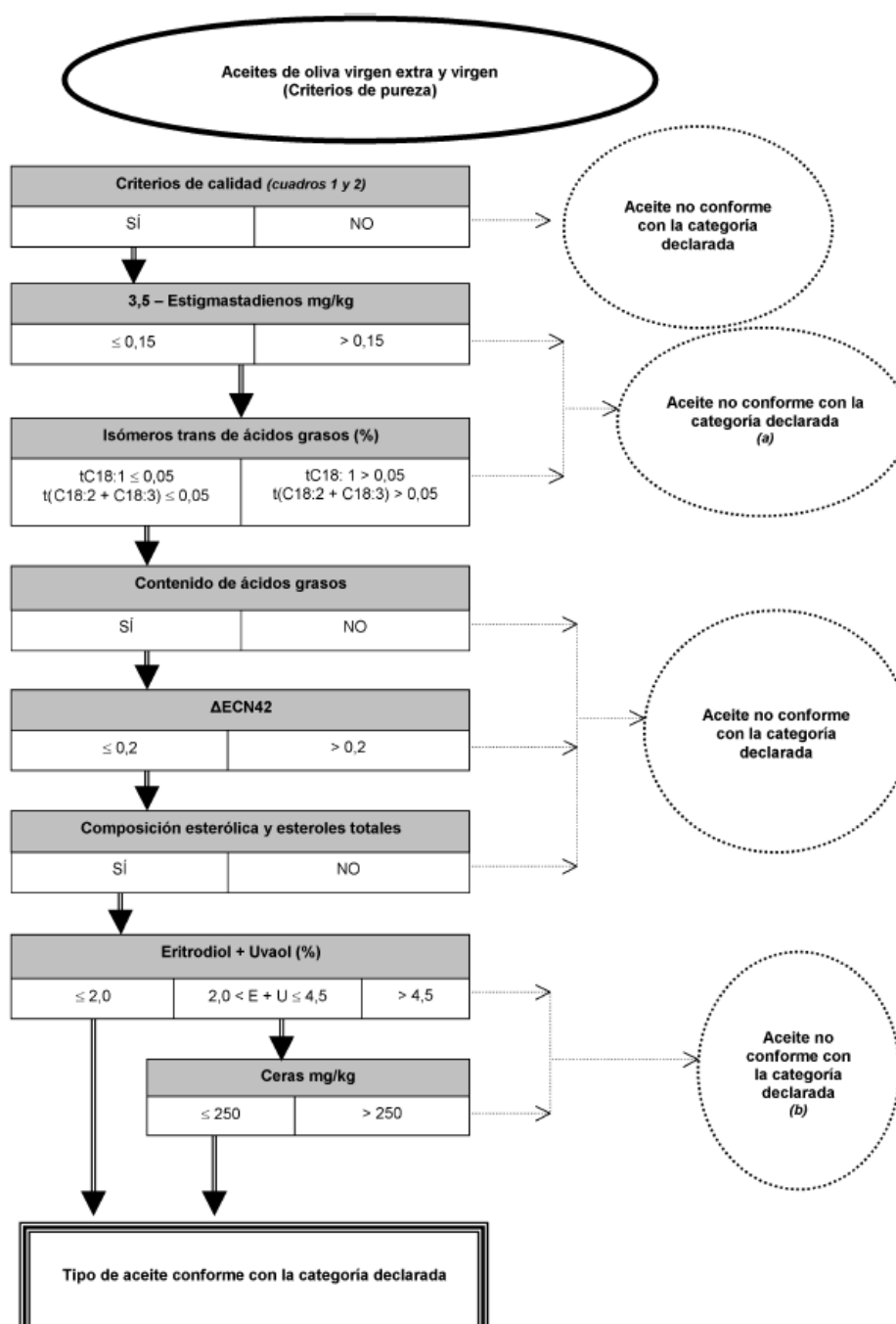
### LEGISLACIÓN COMUNITARIA

- 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 las Comunidades Europeas**, L196, de 5 de septiembre de 1991.
- Reglamento (CE) N° 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004 sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales. **Diario Oficial de las Comunidades Europeas**, L 191, de 28 de mayo de 2014.

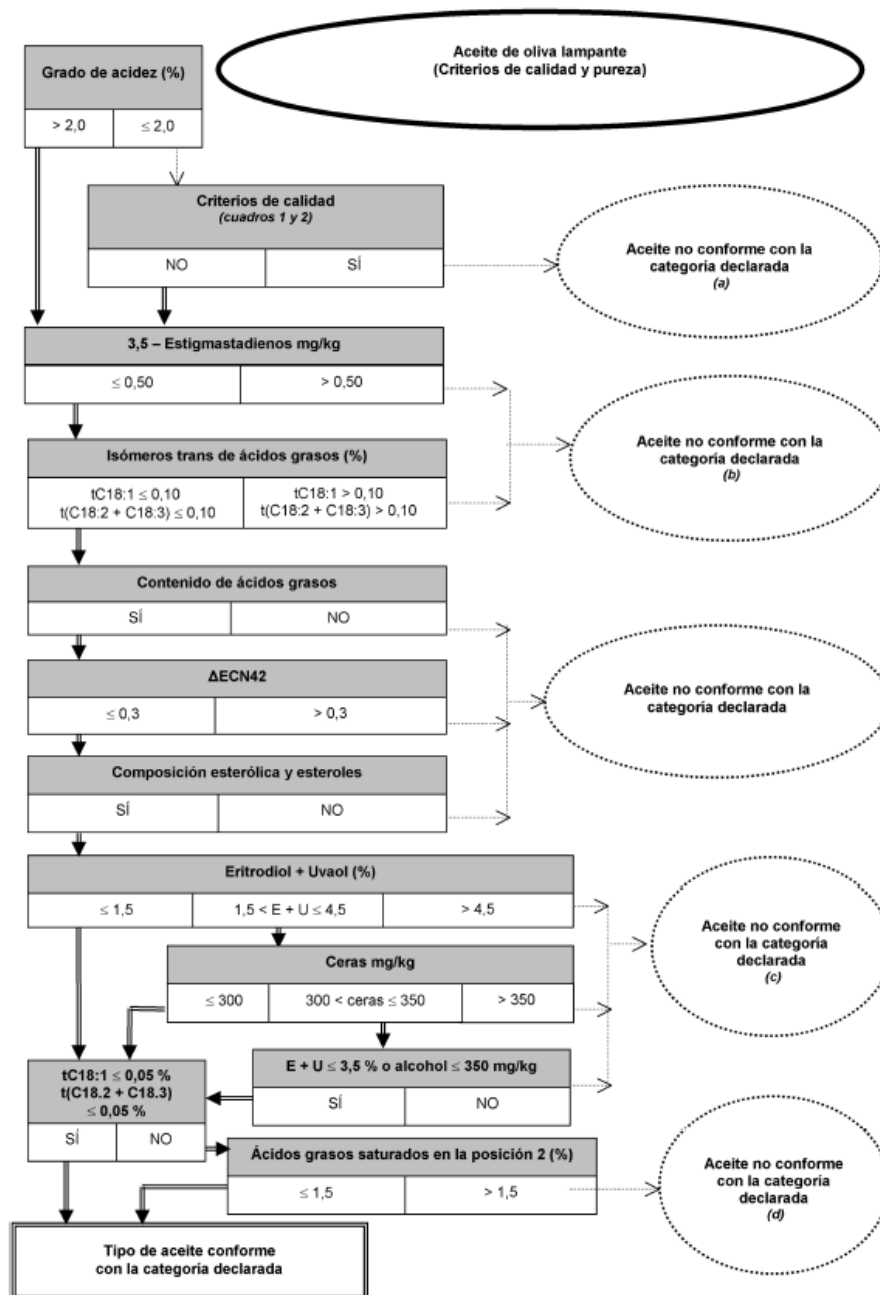
### LEGISLACIÓN AUTONÓMICA

- 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**, n. 70, de 14 de marzo de 2009.
- Orden de 28 de agosto de 2014, del Consejero de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente, por la que se modifica la 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**, n.184, del 19 de septiembre de 2014.

## ANEXO 1



**Figura 8:** Árbol de decisiones para categorizar un aceite de oliva. (Reglamento (CEE) 2568/91).



**Figura 9:** Árbol de decisiones para categorizar un aceite de oliva. (Reglamento (CEE) 2568/91).