



Capítulo 7

Composición del aceite de oliva

Jesús Lozano Sánchez, Antonio Segura Carretero y Alberto Fernández Gutiérrez

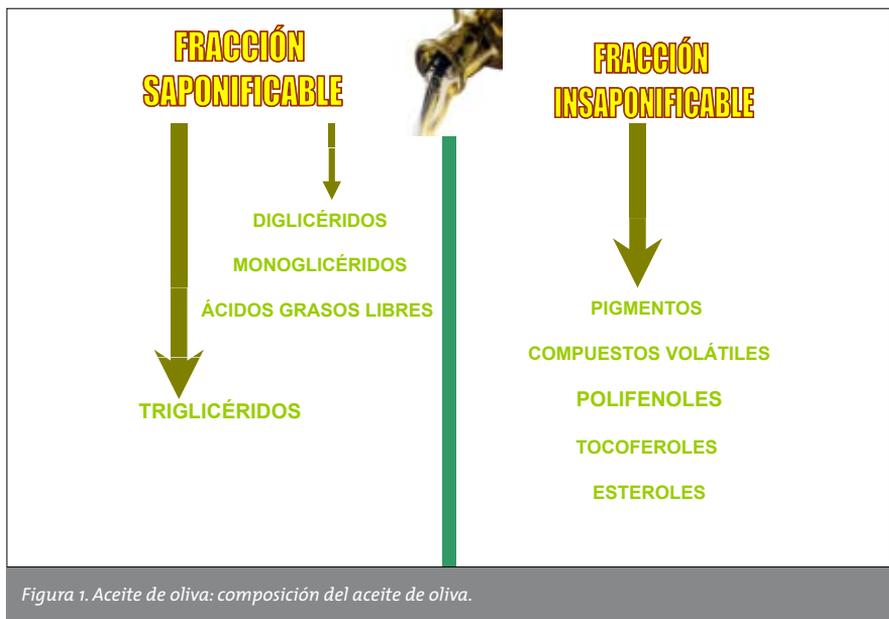
Composición del aceite de oliva

Jesús Lozano Sánchez, Antonio Segura Carretero y Alberto Fernández Gutiérrez

1. Introducción

El aceite de oliva es un alimento altamente energético, aporta 9 kcal/ g provenientes de sus ácidos grasos, de los cuales el ácido oleico representa del 68-81.5%, siendo por ello el aceite considerado una grasa monoinsaturada. Pero más allá de su alto valor energético, presenta efectos positivos sobre la salud de los consumidores que lo convierten en un alimento funcional.

Su composición varía en función de diversos factores como son: variedad de aceituna, grado de maduración, condiciones agronómicas, y características tecnológicas de producción. Desde el punto de vista bromatológico, podemos establecer que la composición del aceite de oliva queda dividida en dos fracciones: fracción mayoritaria, que representa el 98- 99% del peso total del aceite, y fracción minoritaria, que alcanza sobre el 2% del peso del aceite de oliva.



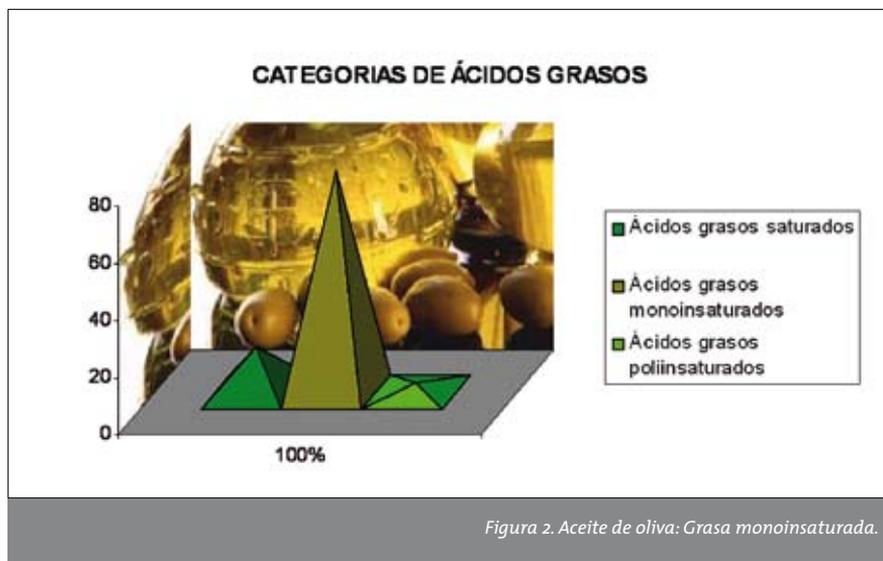
2. Fracción mayoritaria

Esta fracción es conocida como fracción saponificable. Entre los constituyentes de la fracción saponificable están los triglicéridos, que suponen el componente principal del aceite de oliva, ya que las aceitunas, al igual que la mayoría de los cultivos oleaginosos, acumulan lípidos en forma de distintas especies moleculares de triacilglicérols. También se encuentran presentes en una proporción mucho menor: diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres.

2.1. Ácidos grasos.

El conocimiento de la composición en ácidos grasos del aceite de oliva, tanto cuantitativa como cualitativamente, ha sido siempre un tema de gran interés debido a su importancia en la descripción y detección de posibles adulteraciones.

El aceite de oliva es una grasa vegetal que se diferencia de otras grasas vegetales en su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados. La presencia de ácidos grasos libres le confiere al aceite su carácter más o menos ácido, dependiendo de la mayor o menor concentración de éstos. Pero salvo en contadas ocasiones, los ácidos grasos, no se encuentran como ácidos grasos libres, y cuando lo están es tan sólo en pequeñas concentraciones, debido a que en su gran mayoría los ácidos grasos se encuentran formando ésteres, habitualmente combinados con glicerina, en forma de triglicéridos. También pueden formar ésteres con alcoholes grasos de estructura lineal (ceras) o terpénica (ésteres de terpenos y ésteres de esteroleos).



Los aceites vegetales comestibles raramente contienen ácidos grasos de cadena ramificada o con número impar de átomos de carbono, o ácidos grasos insaturados con menos de 16 átomos de carbono o con más de 20 átomos de carbono (Aparicio y Harwood, 2003).

Los ácidos grasos presentes en el aceite de oliva son: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmítoleico (C16:1), heptadecanoico (C17:0), heptadecenoico (C17:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoléico (C18:2), linolénico (C18:3), araquídico (C20:0), eicosenoico (C20:1), behénico (C22:0) y lignocérico (C24:0). En la tabla 1 aparecen reflejados los porcentajes de los ácidos grasos mayoritarios:

Ácidos grasos	%
16:0	12.8
18:0	2.7
18:1 n-9	71.9
18:2 n-6	5.6
18:3 n-3	0.7
Otros	6.3
Ácidos grasos saturados	16.3
Ácidos grasos monoinsaturados	77.5
Ácidos grasos poliinsaturados	6.4

Tabla 1. Composición en ácidos grasos. Abia et al., 1999.

La composición en ácidos grasos difiere de una muestra a otra, dependiendo de la zona de producción del aceite de oliva. Los factores principales que afectan a la composición en ácidos grasos son: latitud, condiciones climáticas, variedad y grado de madurez de las aceitunas recogidas.

Generalmente el ácido oleico, ácido graso monoinsaturado, representa una concentración mayor, del 68-81.5%, que otros ácidos grasos (linoleico, palmítico, y esteárico). El ácido oleico (18:1 n-9) y el ácido palmítoleico (16:1 n-7), tienen un doble enlace en su estructura, ácido linoleico (18:2 n-6) dos dobles enlaces, y el ácido linolénico (18:3 n-3) tres dobles enlaces.

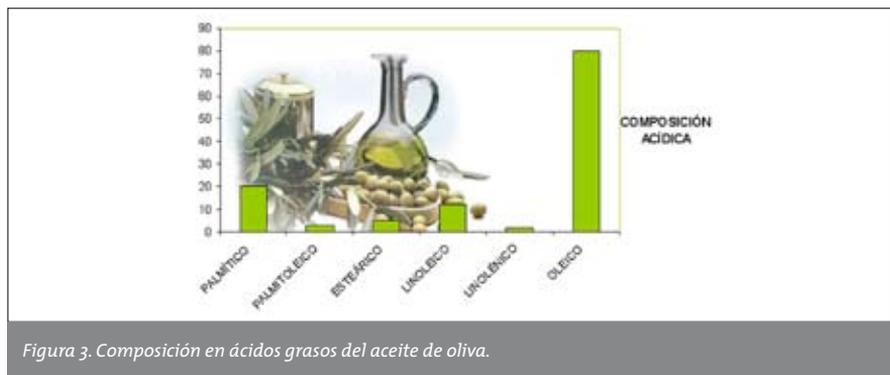


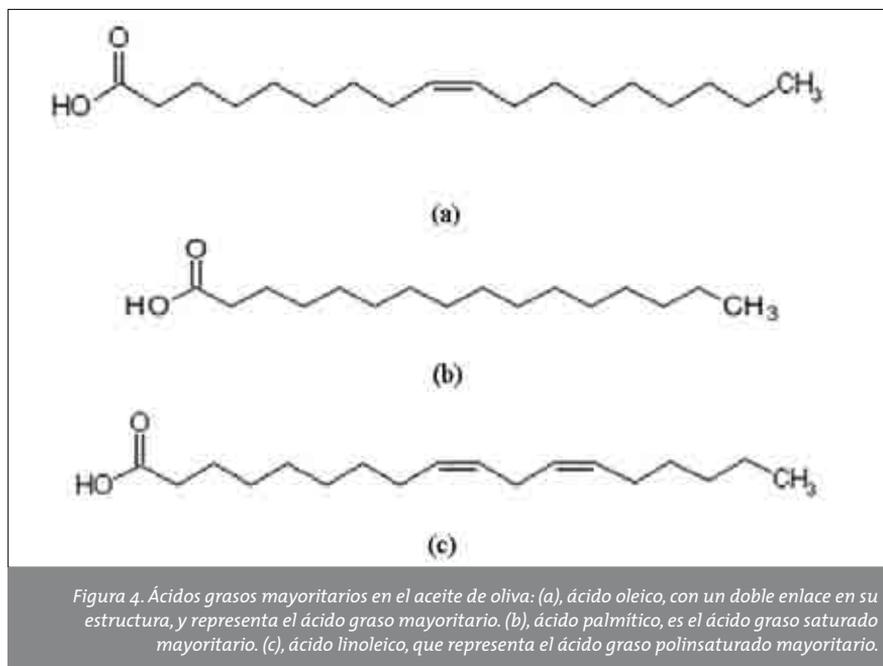
Figura 3. Composición en ácidos grasos del aceite de oliva.

Los estudios realizados en torno a los ácidos grasos del aceite de oliva se centran en la posibilidad de utilizarlos como parámetros clasificatorios o distintivos de los aceites de oliva de diferentes zonas de procedencia, de forma que basados en los análisis de muestras de distintos países varios autores han clasificado el aceite en dos tipos. Uno con un contenido bajo de linoleico-palmitico y alto de oleico, y otro tipo con un contenido alto de linoleico-palmitico y bajo en oleico. Los aceites de España, Italia y Grecia son del primer tipo, mientras que los tunecinos son del segundo tipo.

Los límites de la composición acídica fijados por el C.O.I. son los siguientes:

C 16: 0	7,5 - 20 %
C 16:1	0,3 -3,5 %
C 18:0	0,5 -5,0 %
C 18:1	55 - 83 %
C 18:2	3,5 - 21 %
C 18: 3	0,0 - 1,5 %

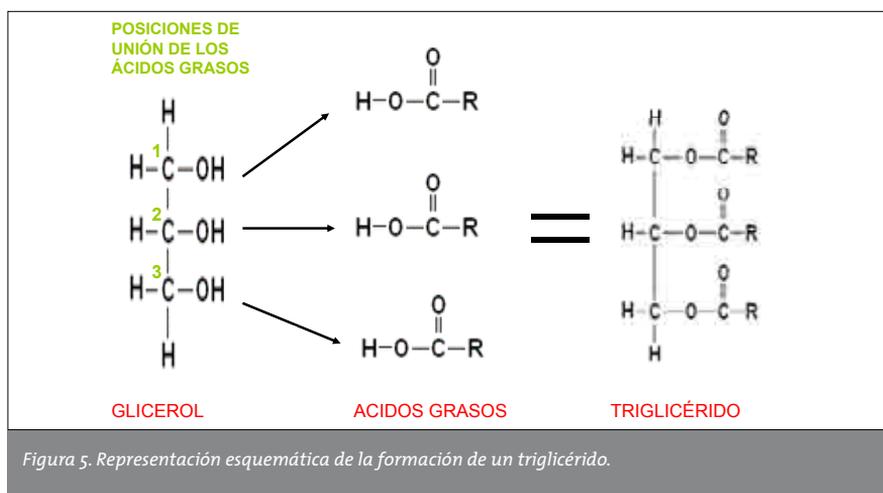
La estructura química de los ácidos grasos mayoritarios son:



2.2. Triglicéridos

Son los componentes mayoritarios de la fracción saponificable. Los triglicéridos son ésteres provenientes de la unión del trialcohol glicerina (1, 2, 3- propanotriol),

con ácidos grasos, ya sean los tres iguales con el mismo número de átomos de carbono, dos iguales y uno diferente, o bien los tres diferentes.



En el aceite de oliva, la distribución de los ácidos grasos en las moléculas de triglicéridos muestra una asimetría entre las posiciones 1, 2 y 3 del trialcohol. Según Santinelli, Damiani y Christie (1992), la teoría sobre la distribución al azar de los ácidos grasos en los triglicéridos, no se puede aplicar al aceite de oliva, pero si podemos afirmar que la composición triglicéridica normalmente sigue un patrón, en la cual los ácidos grasos en la posición central, o posición 2 de la molécula de glicerol son insaturados, el ácido linoléico, por ejemplo, resulta favorecido frente a los ácidos oleico y linoleico para ocupar esta posición que además sólo es ocupada por ácidos grasos saturados cuando la concentración total de los mismos es muy alta en la matriz, lo que no ocurre en este caso.

Teóricamente, basándose en la composición en ácidos grasos que hemos visto en el apartado anterior, se pueden presentar más de 70 triglicéridos en el aceite de oliva. Sin embargo, el número de triglicéridos que realmente se encuentran presentes es inferior ya que determinadas distribuciones de los ácidos grasos en las distintas posiciones del glicerol no aparecen nunca y otros lo hacen en cantidades despreciables. Según Tiscornia, los triglicéridos totalmente saturados como PPP, EEE, PEP, EPE, etc, nunca se encuentran en el aceite de oliva. El mismo caso tenemos con los triglicéridos triinsaturados que contienen ácido linoléico (PoPoLn, por ejemplo):

Triglicéridos totalmente saturados:

- PPP: Palmítico-Palmítico-Palmítico
- EEE: Esteárico-Esteárico-Esteárico
- PEP: Palmítico-Esteárico-Palmítico
- EPE: Esteárico-Palmítico-Esteárico

Triglicéridos triinsaturados con linolénico:

- PoPoLn: Palmitoleico- Palmitoleico-Linolénico

Aunque los triacilglicerolos del aceite de oliva muestran una asimetría en la distribución de los ácidos grasos, encontramos una única molécula simétrica, la trioleína OOO, formada por glicerol esterificado con tres moléculas de ácido oleico, que representa la mitad del total de estos compuestos. En la tabla 2 aparecen indicados los porcentajes de cada uno de los triglicéridos que encontramos en el aceite.

Triglicéridos	%
OOO	61.96
P00	29.35
OOL	4.05
S00	1.82
POL	1.17
PPO/PLS	1.02
PLL/POLn	0.20
POS	0.16
OLL/OOLn	0.14
PPL/PSLn	0.05
LLL	0.01
PPPo	0.01

Tabla 2. Composición en Triglicéridos. Abia et al. 1999. Abreviaturas: L, linoleico; O, oleico; Ln, linolénico; P, palmítico; S, esteárico; Po, palmitoleico.

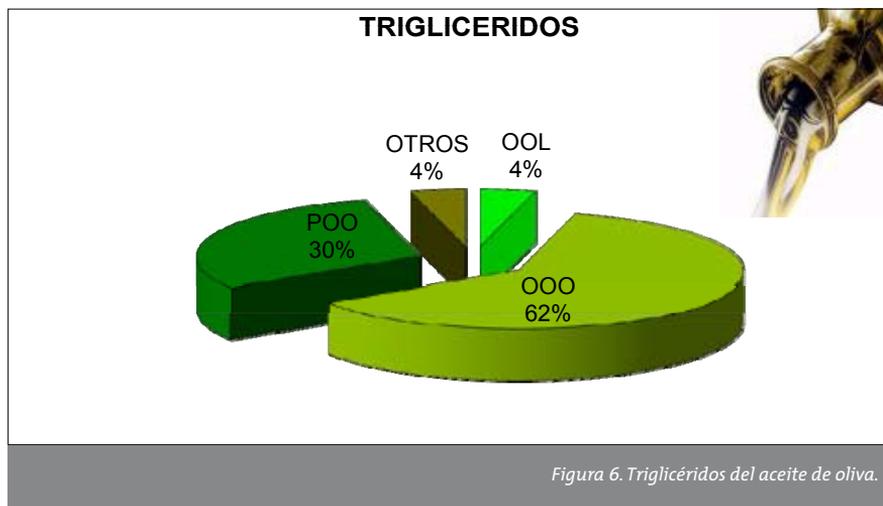


Figura 6. Triglicéridos del aceite de oliva.

2.3. Mono- y Di-glicéridos.

El aceite de oliva, a parte de contener mayoritariamente triglicéridos, también contiene glicéridos parciales. La presencia de mono- y di-acilglicéridos es debida, en parte, a una incompleta biosíntesis, pero principalmente a la hidrólisis del aceite: pueden ser 1,2- diglicéridos provenientes de la síntesis incompleta de los triglicéridos, y 1,3-diglicéridos provenientes de la hidrólisis de los triglicéridos.

En el aceite de oliva virgen, las concentraciones de diglicéridos varían entre 1 y 2,8 %. Los monoglicéridos están presentes en cantidades mucho menores (menos del 0,25 %).

Las condiciones de almacenamiento afectan a la relación de 1,2-diacilglicéridos con 1,3-diacilglicéridos. Los 1,2-diacilglicéridos presentes en el aceite recién prensado tienden a isomerizarse a la forma más estable 1,3-diacilglicéridos. Este reordenamiento de un grupo acil, provoca un cambio significativo en las cantidades relativas de ambos, lo que nos sirve para saber las condiciones de almacenamiento y la edad de ciertos aceites.

Cuando los di-acilglicéridos están presentes de forma libre, el aceite de oliva es de baja calidad, y por tanto, la determinación de di-acilglicéridos se puede usar para evaluar la calidad del aceite de oliva, ya que ciertas relaciones de 1,2-diacilglicéridos y 1,3-diacilglicéridos han servido para relacionar la acidez de aceites de oliva virgen extra, o para diferenciar los distintos tipos de aceites (virgen extra, virgen, lampante...). Se observa un incremento de 1,3- diacilglicéridos en el aceite de oliva virgen extra turbio, lo que indica que se ha producido la hidrólisis.

3. Fracción minoritaria

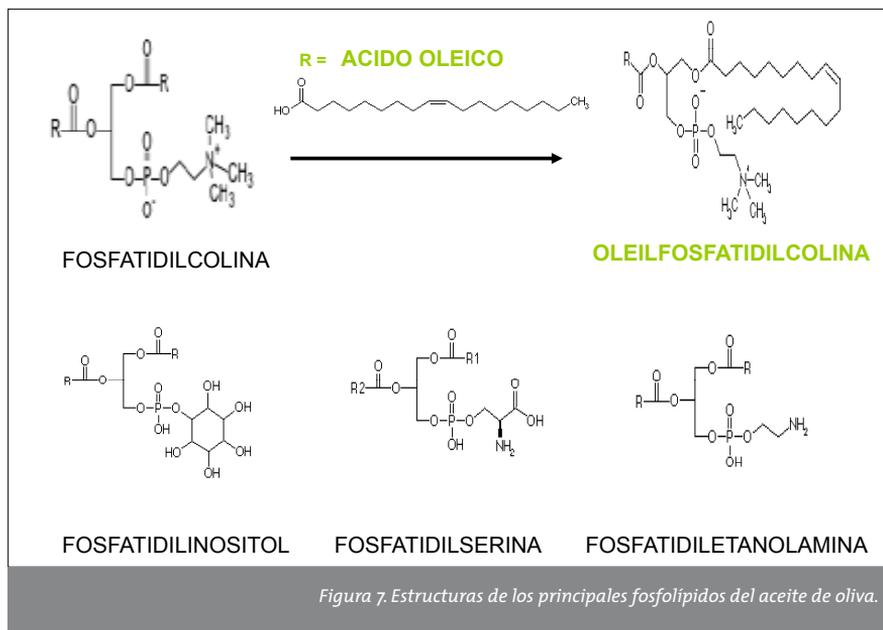
La fracción minoritaria del aceite de oliva representa sobre el 2% del peso del aceite de oliva. Aunque en peso supone una pequeña parte de la composición, podemos decir que incluye una gran variedad de compuestos químicos. Es extremadamente difícil determinar de forma precisa la totalidad de los constituyentes menores, debido a su naturaleza compleja y a su baja concentración, además, algunos de los constituyentes menores sólo están presentes en el aceite crudo, y el procesado tecnológico como la refinación los elimina, como es el caso de los compuestos fenólicos.

Las diversas clases de constituyentes menores pueden dividirse en dos grupos. El primer grupo consta de derivados de ácidos grasos, tales como fosfolípidos, ceras y ésteres de esteroides. El segundo grupo incluye clases de compuestos que no están químicamente relacionados con los ácidos grasos. Son hidrocarburos, alcoholes alifáticos, esteroides libres, tocoferoles, clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos.

3.1. Compuestos relacionados con los ácidos grasos

3.1.1. Fosfolípidos

Los principales fosfolípidos encontrados en el aceite de oliva son: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina (Cert y al, 1994). El ácido oleico es el ácido graso predominante en la estructura de los fosfolípidos, y el patrón de ácidos grasos es similar al de los triglicéridos. El aceite de oliva virgen recién producido puede contener cantidades pequeñas de fosfolípidos, entre 40 y 135 mg/kg.



3.1.2. CERAS.

Las ceras son ésteres de alcoholes grasos con ácidos grasos. Las principales ceras de los aceites de oliva son de número de carbono par, es decir, ésteres C-36 a C-46. La cantidad máxima que puede estar presente en el aceite de oliva virgen extra es de 250 mg/ kg.

Las ceras se producen mediante una esterificación entre alcoholes presentes en el aceite y los ácidos grasos libres. Cuando se produce una hidrólisis de los triglicéridos se aumenta el contenido de ácidos grasos libres, originándose un aumento en la velocidad de reacción de esterificación.

Varios autores han demostrado que se producen cambios en la concentración de ceras de los aceites de oliva de forma natural. Así se ha visto que tiene lugar un incremento en el contenido de ceras durante el almacenamiento del aceite de oliva virgen. Este incremento depende de la concentración de especies reactivas y de las condiciones de almacenamiento (Mariani y Venturini, 1996). De esta manera, una elevada concentración de alcoholes alifáticos, pueden provocar con el tiempo un

aumento del contenido de ceras inicial. Este mismo aumento se ha detectado, tras el almacenamiento, en el aceite de oliva virgen usado como cobertura de conservas vegetales envasadas en vidrio (*Mucciarella y Marsilio, 1997*).

También se ha observado diferencias en el contenido de ceras de aceites de oliva de distintas variedades obtenidos por sistemas de presión y centrifugación, siendo ligeramente superior el contenido de ceras en los aceites obtenidos por presión (*Ranalli y Serraiocco, 1996*). Igualmente varía en los aceites obtenidos en primera y en segunda centrifugación, siendo los valores más altos en los aceites de oliva de segunda centrifugación.

3.1.3. ÉSTERES DE ESTEROLES

La estructura de los esteroides es una estructura esteroidea que deriva del ciclo-pentanoperhidrofenantreno con diferentes radicales y, entre ellos grupos alcohólicos o hidroxilos.

Los esteroides pueden estar presentes de forma libre o esterificada. Aproximadamente, el 10-15% de los esteroides totales están presentes como esteril ésteres. La esterificación de los esteroides se produce entre los grupos hidroxilos que tienen con ácidos grasos libres.

3.2. Compuestos que no están químicamente relacionados con los ácidos grasos

Dentro de este grupo, como veníamos diciendo, quedan incluidos hidrocarburos, alcoholes alifáticos, esteroides libres, tocoferoles, clorofilas, carotenoides y compuestos fenólicos.

3.2.1. HIDROCARBUROS

Los hidrocarburos presentes en el aceite de oliva pueden ser de diversa naturaleza: terpénicos, esteroides, o policíclicos aromáticos.

3.2.1.1. HIDROCARBUROS TERPÉNICOS

En el aceite de oliva se han encontrado dos hidrocarburos en cantidades considerables: escualeno y β -caroteno.

El escualeno es un hidrocarburo insaturado de treinta átomos de carbono ($C_{30}H_{50}$). Es un triterpeno lineal polímero del isopreno. Está presente en todos los aceites y grasas vegetales, especialmente en el aceite de oliva, y es un precursor bioquímico de la biosíntesis de los esteroides. Es el principal constituyente de la materia insaponificable, pudiendo llegar a suponer hasta un 40% del peso total de esta fracción.

La estructura del β - caroteno es un terpenoide de cuarenta átomos de carbono, se encuentra en concentraciones que varía de 0,5 a 4 mg/kg.

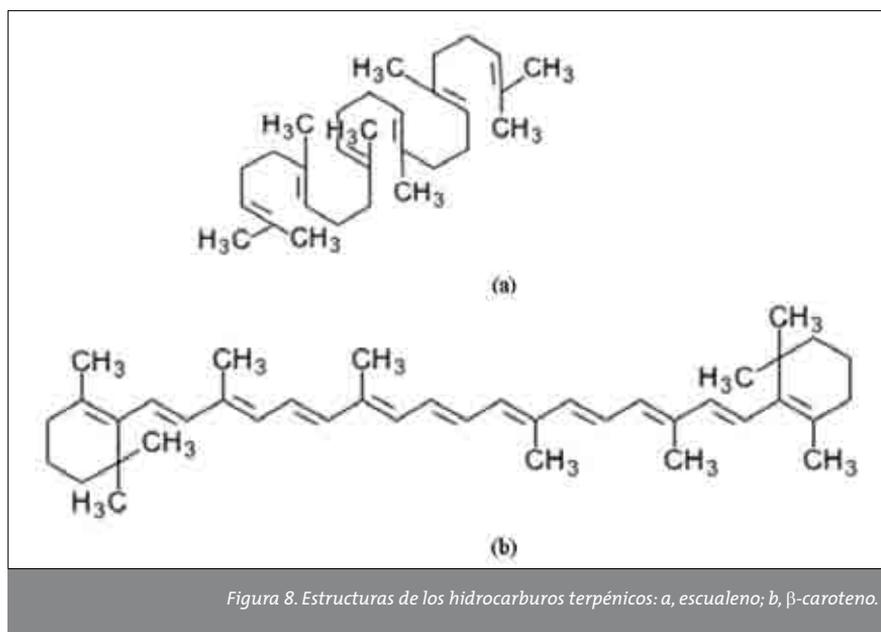


Figura 8. Estructuras de los hidrocarburos terpénicos: a, escualeno; b, β -caroteno.

3.2.1.2. HIDROCARBUROS ESTEROIDES

Los hidrocarburos esteroideos no se encuentran de forma natural, o se encuentran en cantidades por debajo de 0,15 mg/ kg en los aceites de oliva virgen. Esto es debido a que estos hidrocarburos aparecen en los procesos de refinado, al que no es sometido el aceite de oliva virgen. Durante este proceso, tiene lugar la deshidratación de los esteroides, por acción del calentamiento, es decir un grupo hidroxilo se combina con el hidrógeno del carbono adyacente formando un doble enlace o insaturación. El hidrocarburo más significativo que se forma es el estigmasta-3,5-dieno a partir del β -sitosterol en los procesos de refinación (Cert *et al*, 1994). Este compuesto sirve para evidenciar la presencia de aceite refinado en aceite de oliva virgen.

3.2.1.3. HIDROCARBUROS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS

Los hidrocarburos aromáticos presentes en el aceite de oliva son, entre otros: naftaleno, fenantreno, fluorantreno, 1,2-benzoantraceno, criseno y perileno (Fedeli, 1977). Se han encontrado en aceite de oliva en pequeñísimas cantidades. Según algunos autores los valores encontrados pueden variar desde por debajo de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ hasta 700 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Según Tiscornia, estos compuestos son más producto de la contaminación que hayan sufrido los aceites que de metabolitos propiamente dichos (Tiscornia, Fiorina y Evangelisti, 1982).

3.2.2. ALCOHOLES GRASOS

Los alcoholes grasos pueden ser lineales (alifáticos) o triterpénicos. Son constituyentes importantes ya que pueden emplearse para diferenciar los diferentes tipos de aceites.

3.2.2.1. ALCOHOLES ALIFÁTICOS O LINEALES

Los alcoholes alifáticos son precursores de la formación de ceras. Así, un alto contenido de alcoholes puede traer como consecuencia, que el contenido en ceras aumente con el tiempo. Son compuestos de estructura lineal. Según el número de átomos de carbono, estos alcoholes pueden ser el monoconasol (C-21), diconasol (C-22), triconasol (C-23), tetraconasol (C-24), pentaconasol (C-25), hexaconasol (C-26), heptaconasol (C-27), y octaconasol (C-28).

Normalmente en los aceites de oliva los alcoholes con cantidades más relevantes son los de número par, mientras que los impares se encuentran en pequeñas cantidades.

El contenido total de este grupo de compuestos está en torno a 350 mg/kg de aceite, nunca en cantidades superiores. Unas condiciones climáticas secas y altas temperaturas, pueden provocar un contenido alto en el aceite de oliva.

3.2.2.2. ALCOHOLES TRITERPÉNICOS

Los alcoholes triterpénicos son también denominados por 4,4-dimetilesteroles. Los principales alcoholes triterpénicos que están presentes en los aceites de oliva son: β -amirina, butirispermol, cicloartenol y 24-metilencicloartenol.

Es una fracción compleja en la que aún muchos de los compuestos no han sido identificados. Están presentes en concentraciones que varían de 1000 a 1500 mg/kg de aceite.

3.2.2.3. DITERPENOIDES

Dentro de la fracción alcohólica se han encontrado los que se denominan diterpenoides acíclicos, concretamente dos de ellos: el fitol y el geranilgeraniol. El origen probable del fitol es la clorofila. Paganuzzi ha informado de una concentración de fitol en el aceite de oliva de 120-180 mg/kg¹.

3.2.3. ESTEROLES

Los esteroides comprenden un amplio grupo de compuestos que presentan una estructura molecular análoga, que deriva del ciclopentanoperhidrofenantreno. Pueden estar presentes en su forma libre o esterificada con ácidos grasos. La diferencia entre los diferentes esteroides está en el número y posición de los dobles enlaces y en la naturaleza de la cadena lateral. Los principales esteroides del aceite de oliva son: β -sitosterol, Δ -5-avenasterol y campesterol, cuyas estructuras químicas aparecen en la Figura 9.

Se establecen valores que están comprendidos en el rango de 1130-2650 mg/kg^{2,3}. Estos valores pueden ser hasta tres veces más altos. Se relaciona el contenido total de esteroides con la acidez libre: los aceites con un porcentaje alto de ácidos grasos libres, también tienen un alto valor de esteroides totales. Numerosos estudios demuestran que el β -sitosterol representa el 75-90% de la fracción total de esteroides. En pequeñas cantidades tenemos: estigmasterol, colesterol, 24-metilen-colesterol, Δ -7-campesterol, Δ -5,23-estigmastadienol, clerosterol, sitostanol, Δ -5,24-estigmastadienol, Δ -7-estigmastanol y Δ -7-avenasterol.

Los límites que establece el Reglamento (CEE) nº 2568/91 modificados en Reglamento (CE) nº 282/98 para los niveles de esteroides que pueden presentar los distintos tipos de aceite de oliva virgen son:

ESTEROLES	CONCENTRACIÓN
Colesterol	≤ 0,5 %
Brasicasterol	< 0,1 %
Campesterol	≤ 4,0 %
Estigmasterol	≤ 4,0 %
β-Sitosterol *	≤ 93 %
δ-7-Estigmastenol	≤ 0,5 %
Esteroides totales	≥ 1000 mg/Kg

(*) β-Sitosterol es suma de los esteroides δ-5,23 estigmastadienol, clerosterol, β-sitosterol, sitostanol, δ-5-avenasterol y δ-5,25 estigmastadienol.

Tabla 3. Límites en la concentración de esteroides en aceite de oliva virgen que establece el Reglamento nº 2568/91

En un estudio realizado sobre un total de 63 muestras de aceite vírgenes elaboradas a partir de aceitunas de las variedades extremeñas: Carrasqueña, Cacereña, Cornezuelo, Corniche, Morisca, Picual y Verdial de Badajoz, se observó que el contenido total en esteroides presenta en todos los casos niveles que superan el límite mínimo establecido pero con grandes diferencias entre las variedades, desde un mínimo contenido en la variedad Cacereña (1108 mg/Kg) hasta el máximo presentado por la variedad Corniche (2080 mg/kg). Los niveles más altos encontrados se refieren al sitosterol, seguido del δ-5-Avenasterol. Teniendo en cuenta el factor maduración, se aprecia una tendencia a disminuir conforme aumenta este índice, algo que puntualizan diversos autores (Mariani *et al.*, 1991; Gutiérrez *et al.*, 1999), bajo el concepto de que los esteroides se sintetizan en las primeras etapas de desarrollo y más tarde se van diluyendo en la grasa del fruto. Tan sólo en verde se diferencia de los estados envero y maduro, el 2,4 metilencolesterol, metabolito inmediato en la síntesis del campesterol, es el único que presenta una clara diferencia significativa entre los distintos grados de maduración, aunque también presenta algunas diferencias significativas entre variedades. El campesterol, presenta claras diferencias entre variedades, con unos niveles muy superiores en las variedades Corniche, Picual y Verdial de Badajoz, frente a los que presentan las variedades Carrasqueña, Cacereña, Cornezuelo y Morisca; con la particularidad de que este esteroide es poco sensible a variaciones frente a factores como el estrés hídrico (Stefanoudeki *et al.*, 2001), localización geográfica (Duarte y Martins, 1976; Chistopoulou *et al.*, 1996; Harwood y Aparicio, 2000) y conservación (Gutiérrez *et al.*, 2000; Soledad *et al.*, 2001). En lo referente al estigmasterol, las muestras estudiadas presentaron niveles bajos de este esteroide, indicativos de aceites provenientes de frutos sanos y obtenidos por sistemas no forzados (Koutsaftakis *et al.*, 1999) y aunque si presentan diferencias entre variedades, no hay significación en cuanto a maduración⁴.

La composición en esteroides también se ve afectada por el periodo de almacenamiento de las aceitunas y por el tratamiento. Fedeli indica que el estigmasterol alcanza niveles mayores en aquellas aceitunas que proceden del suelo si las comparamos con las de vuelo. Cuando el almacenamiento es largo, se puede producir un aumento significativo del contenido total de esteroides, un aumento del porcentaje de estigmasterol, y una disminución en el Δ -5-avenasterol. Durante el procesamiento de las aceitunas se producen unas pérdidas significativas de esteroides, siendo más pronunciadas en la fracción de esteroides libres.

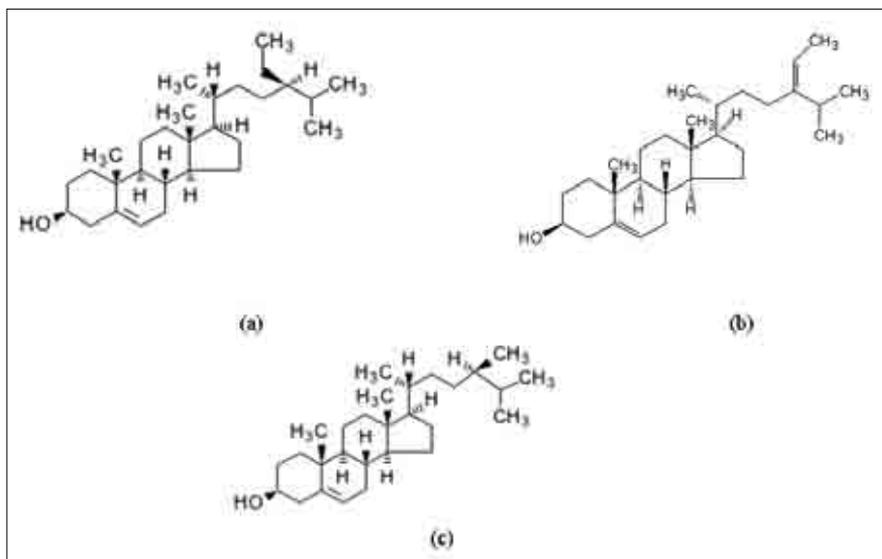


Figura 9. Estructuras de los principales esteroides presentes en el aceite de oliva: a, β -sitosterol; b, Δ -5-avenasterol; c, campesterol.

También podemos encontrar los compuestos denominados 4 α -metil-esteroides (o esteroides 4-monometil) que son productos intermedios en la biosíntesis de los esteroides. Se encuentran presentes en pequeñas cantidades. Los más predominantes son el obtusifoliol, gramisterol, cicloeucatenol y citrostadienol. Son esteroides Δ -7 y Δ -8, excepto el cicloeucalenol, que tiene un anillo 9,19-ciclopropano en el esqueleto esteroide.

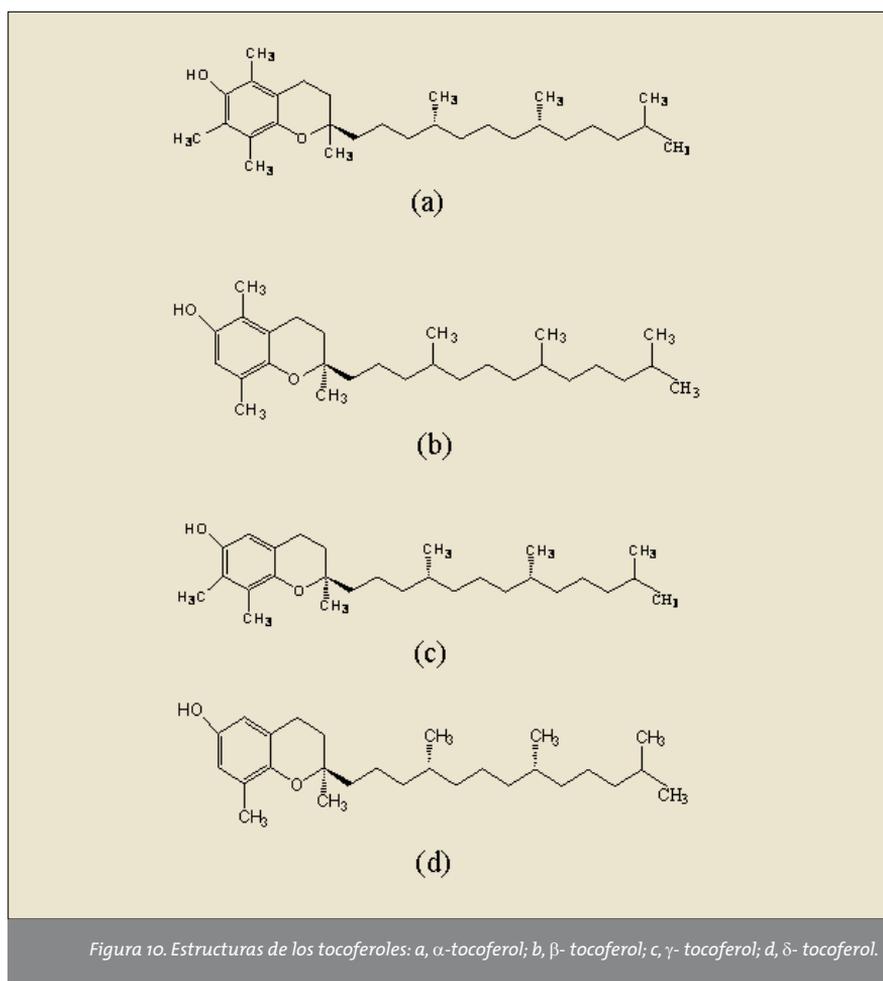
Esta fracción 4-monometil presenta unas concentraciones en torno a 200- 800 mg/ kg de aceite.

3.2.4. TOCOFEROLES

Algunos autores clasifican a los tocoferoles como fenoles lipofílicos. Los tocoferoles son compuestos heteroácidos de alto peso molecular. Se conocen 8 compuestos en la serie de tocoferoles que se producen en la naturaleza, los cuales son derivados del 6-cromanol. Esta serie está formada por 4 compuestos con una estructura tocol

que tiene una cadena saturada isoprenoide de C_{16} y 4 compuestos con una estructura tocotrienol que tiene 3 enlaces dobles en la cadena C_{16} .

Se han identificado varios tocoferoles aislados y se han designado como α , β , γ y δ -tocoferol. Todos tienen, por tanto, un núcleo de cromano sustituido con grupos fenólicos y metilos y una cadena lateral saturada, de 16 átomos de carbono, con tres esqueletos de isopreno. Se diferencian unos de otros en la posición de los grupos metilos sustituyentes. En el aceite de oliva, están presentes sólo en su forma libre (no esterificada). El principal homólogo de las formas de vitamina E presente en el aceite de oliva es el α -tocoferol y representa aproximadamente el 90-95% de los tocoferoles totales, las formas β y γ se encuentran por debajo del 10% y la forma δ en proporciones muy bajas. Algunos autores, incluso, afirman que la forma δ -tocoferol no está presente en el aceite de oliva (*Micali y Curro, 1984; Dionisi y col., 1995; Rovellini y col., 1997*), llegándolo a utilizar como patrón interno en el análisis de tocoferoles del aceite de oliva (*Aparicio y col., 1999*). Las estructuras químicas de los cuatro tocoferoles son las siguientes:



Son formidables agentes antioxidantes naturales y confieren estabilidad a la grasa o aceite que los posee. Por tanto, los tocoferoles son unos constituyentes importantes en el aceite de oliva, ya que le da estabilidad, y tienen un papel biológico beneficioso como antioxidantes. Se sabe que el consumo de aceite de oliva produce beneficios debido a su composición de ácidos grasos y a la presencia de antioxidantes naturales (vitamina E). Químicamente el α -tocoferol es la forma de la vitamina E que ejerce una acción antioxidante más importante, ya que reacciona con los radicales peróxido de los ácidos grasos, que son los productos primarios de la autooxidación de la grasa, y detiene así la alteración en las primeras etapas.

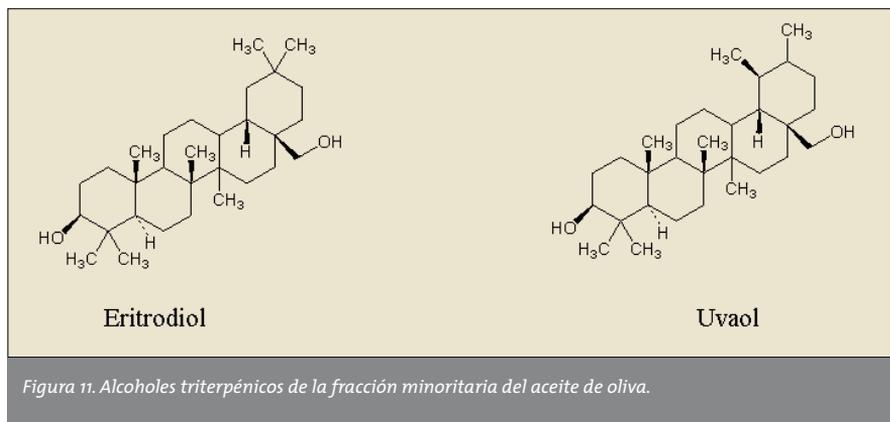
El contenido en tocoferol depende mucho de la variedad de aceituna. Sus concentraciones varían desde 5 a 300 mg/kg. En los aceites de oliva de buena calidad, el contenido suele estar entre los 100 y 300 mg/kg. En los aceites comerciales de alta acidez es donde se han encontrado valores tan bajos como 5 mg/kg. Otros autores lo establecen en el rango de 12 a 400 mg/ kg.

El contenido en estos compuestos disminuye con la maduración del fruto del olivo. La concentración de tocoferol es mayor cuando las aceitunas se recogen en el primer periodo de campaña y hacia el final de la recogida de las aceitunas se reduce el contenido. La biosíntesis de tocoferoles continúa después de la recogida.

Los aceites de oliva que han sido refinados, decolorados y desodorizados, su contenido en tocoferol queda marcadamente disminuido, ya que se producen muchas pérdidas en el transcurso de estos procesos, especialmente durante la desodorización.

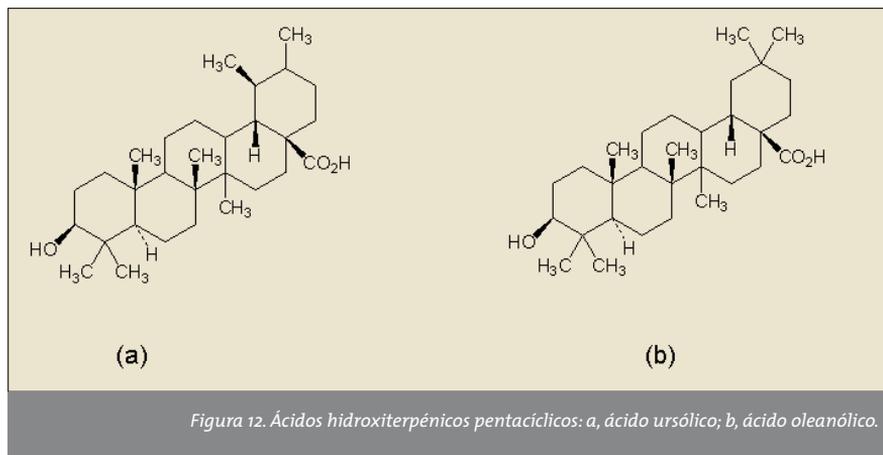
3.2.5. DIALCOHOLES TRITERPÉNICOS

Dentro de los alcoholes triterpénicos pentacíclicos, los más abundantes son: eritrodil (homo-olestranol, 5α -olean-12-en- 3β , 28-diol) y el uvaol (Δ -12-ursen- 3β , 28diol).



Las cantidades varían en función de la fuente consultada, de una forma general podemos establecer valores de 10 a 200 mg/kg de aceite. En otros estudios llevados a cabo, se han fijado las cantidades de 150 a 1000 mg/ kg de aceite para el eritrodil⁵, y de 60-200 mg/kg de aceite para el uvaol⁶.

También podemos encontrar ácidos hidroxiterpénicos pentacíclicos, que son la forma oxidada de los dialcoholes triterpénicos. Entre estos compuestos, podemos diferenciar: ácido oleanólico, ácido maslínico, ácido ursólico, ácido botulínico, ácido 2 α -hidroxi-ursólico y ácido deoxiursólico.



3.2.6. PIGMENTOS

El color del aceite de oliva virgen va desde verde (oscuro a claro) al dorado o amarillo, y es considerado un parámetro importante de calidad, enumerándose como uno de los atributos para evaluar el aceite. Estos colores son debidos al contenido en pigmentos presentes en los aceites, y dependen de la variedad y del grado de maduración del fruto. Los pigmentos están involucrados en los mecanismos de auto-oxidación y en la foto-oxidación.

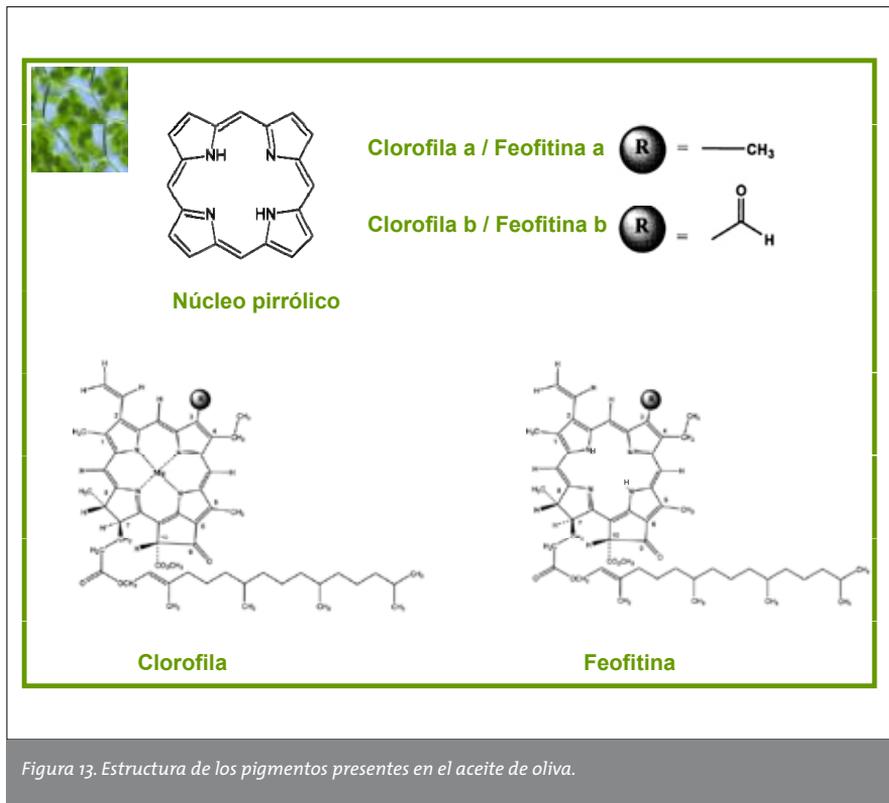
Se pueden dividir en dos grupos: clorofilas y feofitinas por un lado y los carotenoides por otro. Los pigmentos responsables del color verde son las clorofilas, y del color amarillo los carotenoides. Cada estado de madurez de la aceituna tiene límites determinados de concentración de pigmentos. Cuando los frutos son verdes, las clorofilas y los carotenoides están agrupados en el cloroplasto en una relación de 5:1. Estudios realizados en las variedades Hojiblanca y Manzanilla han demostrado que la proporción de los pigmentos cloroplásticos es idéntica para ambas variedades y se mantiene inalterada hasta el momento en que entran en acción las antocianinas^{7,8}.

Las clorofilas y las feofitinas pueden ser a o b, y son las responsables del color de los aceites. La diferencia entre ellas estriba en que la a tiene un grupo metilo en el carbono número 3 mientras que la b posee un grupo formilo. Su contenido varía entre 1 y 20 mg/ kg. Las estructuras moleculares de la clorofila y de la feofitina contienen cuatro grupos pirrólicos con un átomo de magnesio, en el caso de la clorofila, y de dos átomos de hidrógeno, en el caso de la feofitina. El carácter hidrofóbico de estos compuestos se debe a la presencia del fitol, un alcohol isoprenoide monoinsaturado de estructura C₂₀ que se encuentra esterificando el resto de ácido propiónico del carbono número 7 de la molécula de clorofila.

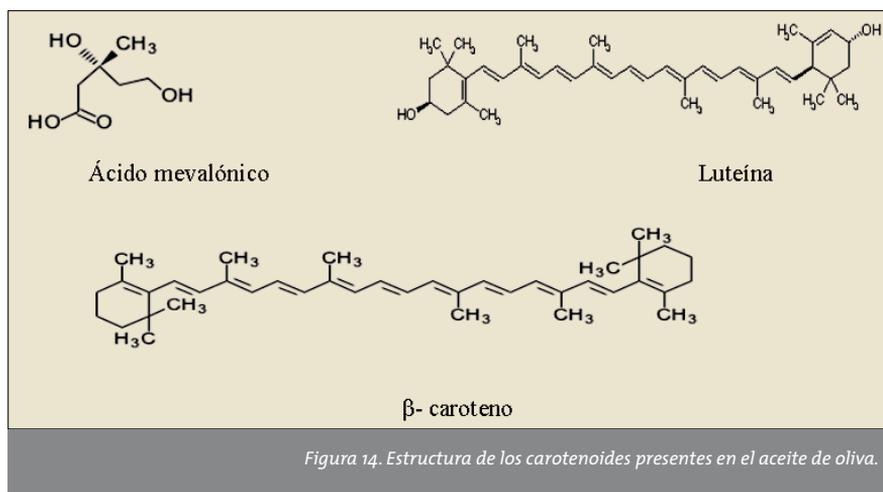
Predomina la feofitina a, representando el 70-80% del total de pigmentos, y además si el aceite se extrae de aceitunas negras, es el único pigmento de esta clase que está presente.

La concentración de clorofilas en los aceites va a depender de:

- El sistema empleado en la extracción: en la centrifugación directa el contenido en clorofilas es mayor que en el prensado clásico.
- La madurez de los frutos: el contenido en clorofilas es superior en las primeras épocas que al final del periodo de recogida estado de maduración en el que va a ser mayor el contenido en xantofilas.



En cuanto a los carotenoides presentes en el aceite de oliva están: la luteína, el β- caroteno, violaxantina y neoxantina. Químicamente se clasifican como terpenoides y se consideran biosintéticamente derivados del ácido mevalónico, intermediario metabólico que aporta la unidad básica estructural. Están formados básicamente por 8 unidades de isopreno, de tal forma que la unión de cada unidad se invierte en el centro de la molécula.



El contenido en carotenos del aceite varía de 1 a 20 mg/kg. De todos ellos, el mayoritario es la luteína. Al igual que ocurre con las clorofilas y feofitinas, el contenido en carotenoides va a depender de:

- Los sistemas de extracción empleados (la concentración de carotenoides va a ser mayor en la centrifugación).
- Los sistemas de molturación de las aceitunas: se han observado diferencias entre las mismas variedades cuando se utilizan diferentes molinos, martillos fijos o móviles.

Se han encontrado marcadas diferencias en la composición de pigmentos fotosintéticos del aceite en función de la zona de origen, así, se ha observado que en los aceites griegos las relaciones luteína/β-caroteno y pigmentos clorofílicos/pigmentos fotosintéticos es mayor a la unidad y oscila entre 2 y 11, respectivamente, (*Psomidou y Tsimidou, 2001*) mientras que en aceites españoles el rango varía entre 1.3 y 5.1 para la relación luteína/β-caroteno y se mantiene próxima a la unidad en la relación pigmentos clorofílicos/pigmentos carotenoides (*Gandul y Mínguez, 1996*).

3.2.7. COMPUESTOS FENÓLICOS

La fracción fenólica del aceite de oliva consiste en una mezcla heterogénea de componentes, presentes en el mesocarpio de la aceituna, y que no están en ningún otro aceite vegetal. Son considerados como una parte importante del sistema químico de defensa del fruto. Se les atribuyen funciones diversas, entre las que podemos citar su actividad antimicrobiana (*Fleming y col. 1973, Mahjoub y Bullerman, 1987; Tranter y col., 1993; Tassou y Nychas, 1995; Aziz y col., 1998*), y protección frente al daño oxidativo al limitar los efectos de la luz UV (*Galli y Visioli, 1999*).

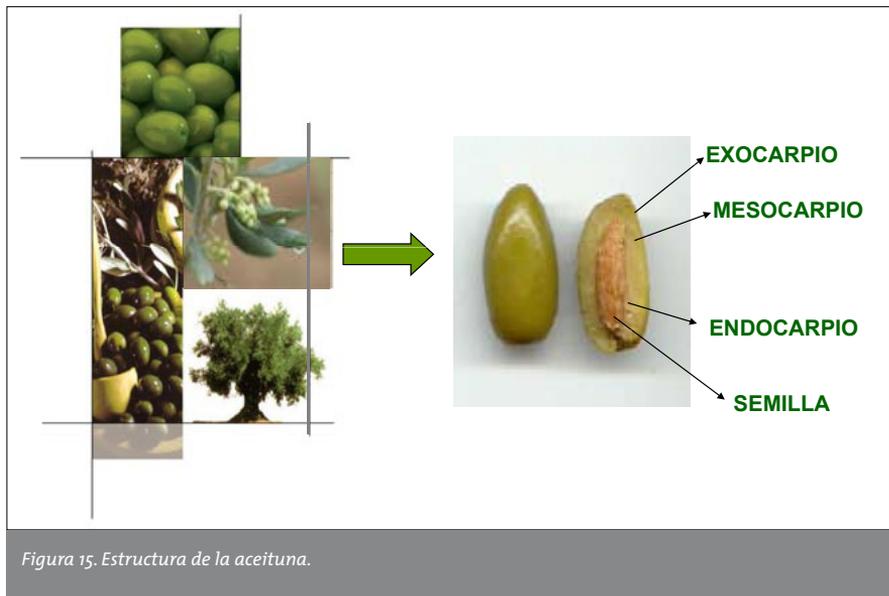


Figura 15. Estructura de la aceituna.

Afectan a la estabilidad frente a la oxidación, sabor y aroma del aceite obtenido del fruto, y han sido identificados como los principales responsables de las propiedades antioxidantes del aceite de oliva virgen extra. Por otra parte, los polifenoles también contribuyen a las propiedades organolépticas de los aceites de oliva vírgenes, participando así de los atributos positivos que permiten la clasificación de los aceites por un panel de catadores. Se han relacionado con la astringencia y el amargo, sabor característico de los aceites obtenidos de aceitunas verdes o en invierno^{9-10,11}.

La concentración de fenoles totales varía entre 50 y 200 mg/kg de aceite, pero se pueden encontrar aceites con contenidos de hasta 1000 mg/kg de aceite. Se han fijado márgenes entre 200 y 1500 mg/kg¹². El margen, en cuanto a contenido en fenoles, es tan amplio porque depende de un gran número de factores como son:

- La maduración del fruto (que se recolecte más o menos verde).
- El sistema de extracción empleado. Los aceites obtenidos en un sistema de centrifugación continua, contienen menos polifenoles que los aceites obtenidos por otros sistemas.
- Las variables que intervienen en el proceso de extracción en el molino: diferencias en la maquinaria de molido, tiempos de contacto del aceite con el agua en el proceso de extracción, volumen total de agua...
- El proceso de filtración.
- Variables climatológicas y agronómicas del cultivo o campaña.
- Variedad de aceituna.

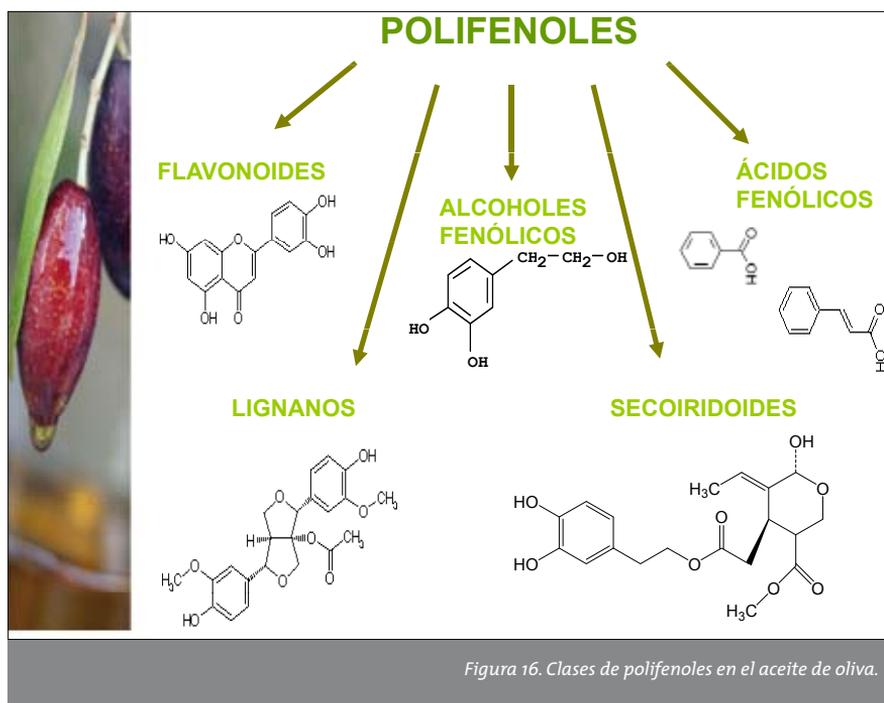
Durante la maduración del fruto o durante el procesado de las aceitunas, tienen lugar una serie de reacciones químicas y enzimáticas, que dan lugar a la aparición de fenoles libres. Estos últimos, aunque son compuestos polares, son retenidos en

el aceite en cantidades mínúsculas. Diversas enzimas endógenas se activan durante el tratamiento^{13,14} como polifenoloxidasa (PPO), peroxidasa (POD), y lipoxigenasa (LPO)^{15,16}. El enzima PPO y POD catalizan la oxidación de fenoles durante el proceso de malaxación.

La cantidad de agua utilizada durante el proceso de extracción, afecta a su concentración. Cuando la cantidad de agua es grande, se separan más polifenoles del aceite. Esto ocurre porque el agua produce una solubilización de los tejidos, o más particularmente por la separación de las sustancias coloidales (proteínas y polisacáridos), que ligan estos compuestos.

Los aceites producidos en sistemas de dos fases, no emplean agua caliente, no hay aguas de desecho, tienen concentraciones más altas en compuestos fenólicos, por lo que son más estables ante la autoxidación.

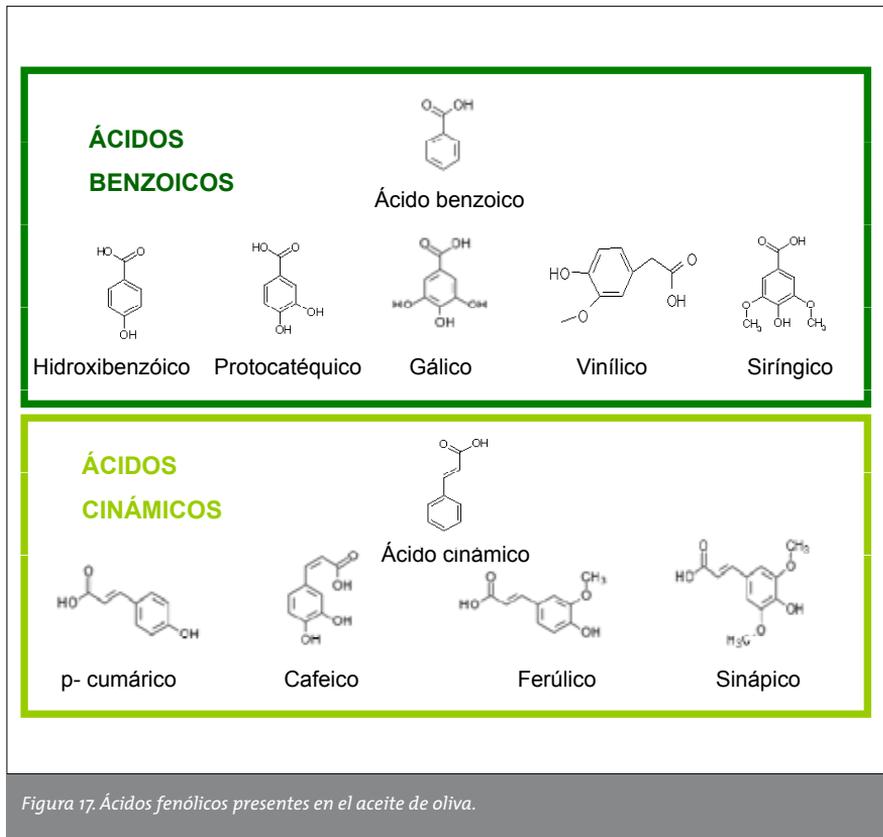
La estructura química de los polifenoles presentes en el aceite de oliva aparece recogida en la siguiente figura:



3.2.7.1. ÁCIDOS FENÓLICOS.

Los ácidos fenólicos fueron los primeros descritos en bibliografía para el aceite de oliva virgen. Se trata de metabolitos secundarios de plantas aromáticas. Están presentes en muy pequeñas cantidades, inferiores a 1 mg de analito/ kg de aceite de oliva¹⁷. Se subdividen en dos grandes grupos: ácidos benzoicos, con una estructura química básica de C6-C1, y ácidos cinámicos, con una estructura básica de C6-C3:

- Ácidos benzoicos: ácido benzoico, p-hidroxibenzoico, protocatéuico, gálico, vanílico y siríngico.
- Ácidos cinámicos: ácido cinámico, cafeico, ferúlico, sinápico, p-cumárico y o-cumárico.



Los ácidos fenólicos se han asociado con las cualidades sensoriales y organolépticas (sabor, astringencia y dureza), así como con las propiedades antioxidantes. Es de especial interés resaltar que de estos compuestos se deriva una función protectora, a través de la ingestión de frutas y hortalizas, frente a enfermedades que pueden estar relacionados con el daño oxidativo (enfermedad coronaria, accidentes cerebrovasculares y el cáncer)¹⁸⁻²⁰.

3.2.7.2. ALCOHOLES FENÓLICOS.

Los alcoholes fenólicos son: hidroxitirosol o (3,4- dihidroxifenil)etanol, tirosol o (p-hidroxifenil)etanol y (3,4- dihidroxifenil) etanol glucósido. Se han realizado numerosos análisis para determinar la concentración de estos compuestos en el aceite de oliva virgen. Owen y col. analizaron 18 muestras de distintos aceites y obtuvieron unos valores medios en torno a 14,4 mg/kg para el hidroxitirosol y 27,45 mg/kg para

el tirosol. Sin embargo Servilli *y col.* en una muestra total de 210 aceites de oliva virgen pertenecientes a países de la zona mediterránea obtuvieron valores de 1,8 y 1,9 mg/kg de hidroxitirosol y tirosol respectivamente.

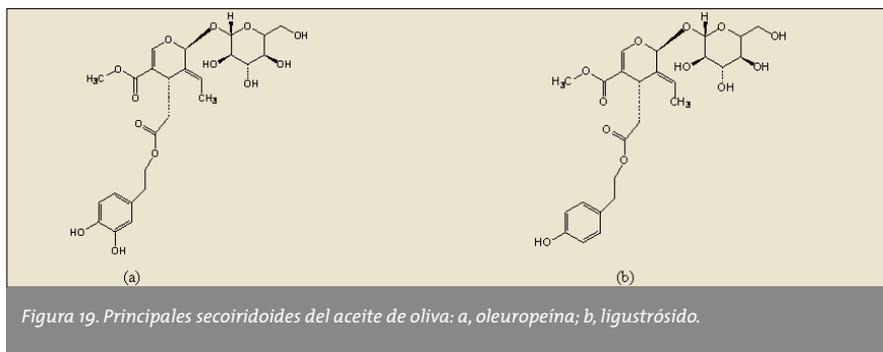


3.2.7.3. SECOIRIDOIDES

Los secoiridoides junto con los lignanos son los más abundantes en el aceite de oliva virgen. Están presentes en cantidades de 27-32 mg/ kg de aceite. Se encuentran sólo en las plantas que pertenecen a la familia *Oleaceae*, que incluye *Olea europea L.* Se caracterizan por la presencia en su estructura de ácido elenólico o sus derivados. Proceden del metabolismo secundario de los terpenos. Están formados por un fenil etil alcohol (hidroxitirosol y tirosol), ácido elenólico y en ocasiones por un residuo glucosídico (generalmente aparecen glicosilados en las plantas). Los secoiridoides sin glicosidar se originan en el tratamiento de la aceituna durante la trituration y malaxación, por acción del enzima β -glucosidasa. Estas últimas, por su naturaleza anfifílica se sitúan entre la capa oleosa y las aguas de vegetación, estando más concentradas en ésta última. Durante el almacenamiento, sufren hidrólisis liberándose los fenoles simples hidroxitirosol y tirosol.

El principal glicósido presente en el aceite de oliva es la oleuropeína. Químicamente es un éster del ácido elenólico, con el 3,4-dihidroxifeniletanol (hidroxitirosol). Es responsable del sabor amargo de las aceitunas inmaduras. Gran parte del tirosol y el hidroxitirosol provienen de su hidrólisis. Las variedades de frutos pequeños se caracterizan por su alto contenido en oleuropeína, mientras que ocurre lo contrario con las variedades de frutos grandes, así los aceites que proceden de las distintas variedades presentarán una composición similar.

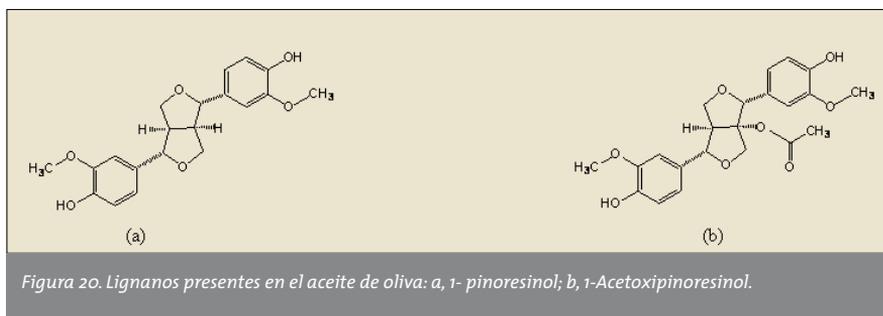
Otro secoiridoide de interés presente en el aceite de oliva es el ligustrósido, que tiene una estructura similar a la de la oleuropeína, pero con tirosol en lugar de hidroxitirosol.



Se ha relacionado a los derivados de los secoiridoides con el amargor del aceite²¹. García y col. estudiaron la reducción del amargor del aceite mediante un tratamiento térmico de las aceitunas y encontraron una buena correlación entre el amargor del aceite y el contenido de derivados secoiridoides del hidroxitirosol²². También se ha relacionado el atributo picante, sensación táctil de picor presente en aceites obtenidos al principio de la campaña, con el contenido en derivados del ligustrósido²³ y el contenido de la forma aldehídica de la oleuropeína aglicona²⁴.

3.2.7.4. LIGNANOS

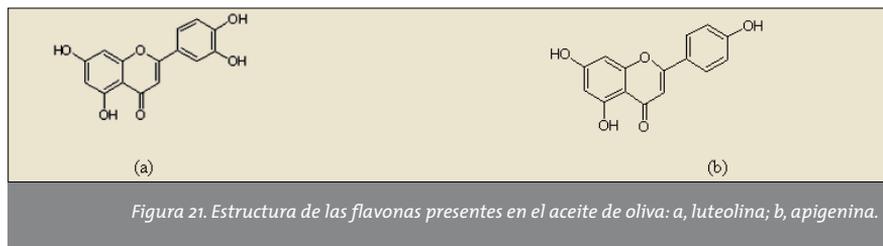
Según Owen *et al.*²⁵, la cantidad de lignanos presentes en el aceite de oliva virgen puede ser hasta de 100 mg/ kg, pero hay variaciones considerables entre distintos aceites. Desde el año 2000, ha sido descrita en diversas muestras de aceites, la presencia de (+)-1-pinoresinol y (+)-1-acetoxipinoresinol, dentro de la fracción fenólica de los lignanos²⁶⁻²⁸. Brenes *et al.*, sugieren que la cantidad de lignanos pueden utilizarse como marcador varietal. Este autor establece que en los aceites españoles, estos compuestos están presentes dentro del rango de 20 a 25 mg/kg para el (+)-1-acetoxipinoresinol, y de 2 a 95 mg/ kg para el (+)-1-pinoresinol²⁹.



3.2.7.5. FLAVONOIDES

Los flavonoides han aparecido, en este último decenio, en un creciente número de publicaciones sobre efectos beneficiosos que ejercen en la salud. Presentan anillos aromáticos en su estructura, uno de ellos y la cadena lateral de tres átomos

de carbono, provienen de la L-fenilalanina, mientras que el resto proviene del acetyl-CoA, por la ruta poliacética. Presentan una variación estructural que proviene, en parte, de la hidroxilación, metoxilación, prenilación o glicosilación. Se subdividen en flavonas, flavonoles, flavanones, y flavanoles. Dentro de las flavonas tenemos la apigenina y luteolina, que podrían proceder de apigenin glucósidos y luteolín-7-glucósido.



Un compuesto cercano a ellos, (+)-taxifolin, un flavanonol, ha sido encontrado recientemente en aceites de oliva españoles³⁰.

3.2.8. COMPUESTOS VOLÁTILES Y AROMÁTICOS.

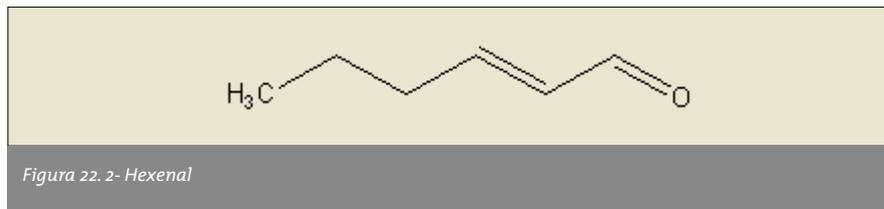
El aceite de oliva presenta un aroma particular entre los aceites alimentarios debido a la gran cantidad de compuestos aromáticos de diversa naturaleza. Se producen por acción de enzimas como el enzima lipoxigenasa que actúa durante el aplastamiento de la fruta del olivo y la pasta de aceitunas en la malaxación y se incorporan a la fase oleosa, dando lugar a aldehídos, o el enzima alcohol deshidrogenasa, dando lugar a alcoholes.

Existen diferencias cuantitativas entre los componentes volátiles de las distintas variedades de aceitunas, debido a que la actividad enzimática está determinada genéticamente en cada cultivar, lo que explicaría la diferencia en el contenido en alcoholes encontrados en aceites distintos: entre Picual y Cornicabra, por ejemplo. Incluso se observan cambios dentro de la misma variedad, en función de la región geográfica de la que estemos hablando. Se ha señalado que estas diferencias van a estar en función de factores como el grado de maduración de la aceituna, la gestión del riego, y el proceso de extracción, en particular, la molienda, malaxación y el tipo de sistema de centrifugación empleados. Por ejemplo, el nivel de compuestos volátiles en el aceite de oliva disminuye en el transcurso de la maduración de los frutos: se ha sugerido que la concentración de los distintos compuestos aromáticos del aceite aumenta con el grado de pigmentación durante la maduración de la aceituna.

Mientras que los compuestos fenólicos contribuyen al amargor del aceite, los compuestos volátiles son los principales responsables del atributo del verdor del aceite de oliva virgen.

El rango de concentraciones de los componentes de la mezcla es muy amplio, y podría ser usado para la identificación de la variedad y origen geográfico. Se han identificado más de cien compuestos como hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, és-

teres, fenoles, terpenos y derivados del furano. En un estudio realizado con aceite de oliva virgen extra Cornicabra, procedente de Castilla la Mancha, (en el que se modificaron las características agronómicas de regadío y estado de maduración en la recolección, para ver la influencia en la composición) los aldehídos son los componentes mayoritarios, y su contenido ha disminuido con la maduración. El compuesto E-2-hexenal, fue el principal compuesto volátil detectado, y se produjo una reducción del 40-60% con respecto al presente inicialmente con la maduración de la aceituna³¹.



Algunos de los compuestos volátiles presentes en el aceite de oliva virgen extra aparecen en la siguiente tabla:

Alcoholes	Cetonas	Aldehídos	Ácidos	Ésteres
Etanol	Acetona	Acetaldehído	Ácido acético	Etilacetato
Butanol	Pectan-3-ona	Butan-1-al	Ácido propanóico	Etil propionato
2-metilpropan-1-ol	Hexan-2-ona	2-metilbutan-1-ol	Ácido butanóico	Metil butanato
Pentan-1-ol	1-octen-3-ona	Pental-1-al	Ácido hexanóico	Etil butanoato
Hexan- 1-ol	Nonan-2-ona	Trans-pental-1-al		Metil hexanoato
Trans-2-hexen-1-ol		Heptan-1-al		Hexil acetato
Cis-3-hexen-1-ol		Octan-1-al		Octil acetato
Heptan-1-ol		Decan-1-al		Etil decanoato
Octen-1-ol		Trans-2-decen-1-al		
Nonan-1-ol		Benzaldehído		
		Fenilacetaldhído		

Tabla 4. Algunos compuestos volátiles presentes en el aceite de oliva.

Bibliografía

1. Ramón Aparicio, John Harwood. “*Manual del Aceite de Oliva*”. 1ª Edición. 2003.
2. J.L. Quiles, M.C. Ramírez-Tortosa, and P.Yaqoob. “Olive Oil & Health”. 2006
3. Paganuzzi, V. “*On the Composition of Iranian Olive Oil*”. J. Amer. Oil Chem Soc. 56: 925 (1979)
4. Gutiérrez, F.; Jiménez, B.; Ruiz, A.; Albi, M. A. “*Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties Picual and Hojiblanca and on the different components involved*”. J. Agric. Food Chem. 1999, 47, 121–127.
5. Kiritsakis, A.; Markakis, P. “*Olive oil: A review*”. Adv. Food Res. 1987, 31, 453–482.
6. J. Sánchez Casas, E. Osorio Bueno, A. M. Montañó García, M. Martínez Cano: “*Contenido en esteroides de siete variedades de aceituna producidas en la región extremeña*”. Foro de la Tecnología Oleícola y la Calidad Instituto Tecnológico Agroalimentario. Badajoz.
7. Pérez-Camino, M. C., Cert, A. “*Quantitative determination of hydroxy pentacyclic triterpene acids in vegetable oils*”. J. Agric. Food Chem. 1999, 47, 1558–1562.
8. Ruiz Gutiérrez, V. “*The unsaponifiable components of olive oil*”. Mesa B. Evidencias científicas de los efectos beneficiosos de los componentes minoritarios del aceite de oliva; Congreso Internacional sobre Aceite de oliva y Salud (CIAS): Jaén, Spain, 2004; pp 39–44.
9. Mínguez Mosquera, M. I., J. Garrido Fernández. “*Composición y evolución de clorofilas y carotenoides durante el desarrollo y maduración de los frutos del olivo*”. Grasas y Aceites 37 (6): 337-342. 1986.
10. Mínguez Mosquera, M. I., J. Garrido Fernández. “*Diferenciación de las variedades de olivo Hojiblanca y Manzanilla según su contenido pigmentario*”. Grasas y Aceites 38 (1): 4-8. 1987.
11. F. Gutiérrez-Rosales, S. Perdiguero, R. Gutiérrez, J. M. Olías. “*Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil*”. J. Am. Oil Chem. Soc. 69 (1992) 394–395.
12. G.F. Montedoro, M. Baldioli, M. Servili. “*I composti fenolici dell'olio di oliva e la loro importanza sensoriale, nutrizionale e merceologica*”. Giornale Ital. Nutriz. Clin. Prev. 1 (1992) 19–32.
13. F. Gutiérrez-Rosales, J. J. Ríos, M. L. Gómez-Rey. “*Main Polyphenols in the Bitter Taste of Virgin Olive Oil. Structural Confirmation by On-Line High-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Mass Spectrometry*.” J. Agric. Food Chem. 2003, 51, 6021–6025.
14. Hrnčirik, K.; Fritsche, S. “*Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil*.” Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2004, 106, 540–549.

15. Angerosa, F.; d'Alessandro, N.; Basti, C.; Vito, R. "Biogeneration of volatile compounds in virgin olive oil: Their evolution in relation to malaxation time". *J. Agric. Food Chem.* 1998, 46, 2940-2944.
16. Di Giovacchino, L.; Costantini, N.; Ferrante, M. L.; Serraiocco, A. "Influence of malaxation time of olive paste on oil extraction yields and chemicals and organoleptic characteristics of virgin olive oil obtained by a centrifugal decanter at water saving". *Grasas Aceites* 2002, 53, 179-186.
17. Olías, J. M.; Pérez, A. G.; Ríos, J. J.; Sanz, L. C. "Aroma of virgin olive oil: Biogenesis of the "green" odour notes". *J. Agric. Food Chem.* 1993, 4, 2368-2373.
18. Morales, M. T.; Angerosa, F.; Aparicio, R. "Effect of the extraction conditions of virgin olive oil on the lipoxygenase cascade: Chemical and sensory implications". *Grasas Aceites* 1999, 50, 114-121.
19. Alessandra Bendini, Lorenzo Cerretani, Alegria Carrasco-Pancorbo, Ana Maria Gómez- Caravaca Antonio Segura-Carretero, Alberto Fernández-Gutiérrez and Giovanni Lercker. "Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: a Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods". *Molecules* 2007, 12, 1679-1719
20. Robbins, R. J. "Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology". *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, 2866-2887.
21. Gomes, C. A.; Girao da Cruz, T.; Andrade, J. L.; Milhazes, N.; Borges, F.; Marques, M. P. M. "Anticancer Activity of Phenolic Acids of Natural or Synthetic Origin: A Structure-Activity Study". *J. Med. Chem.* 2003, 46, 5395-5401.
22. Masaki, H.; Okamoto, N.; Sakaki, S.; Sakurai, H. "Protective effects of hydroxybenzoic acids and their esters on cell damage induced by hydroxyl radicals and hydrogen peroxides". *Biol. Pharm. Bull.* 1997, 20, 304-308.
23. A. K. Kiritsakis. "Flavor components of olive oil - A review". *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1998) 673-681.
24. J. M. García, K. Yousfi, R. Mateos, M. Olmo, A. Cert. "Reduction of oil bitterness by heating of olive (*Olea europaea*) fruits". *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 4231-4235.
25. M. J. Tovar, M. J. Motilva, M. P. Romero. "Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grown under linear irrigation strategies". *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 5502-5508.
26. R. Mateos, A. Cert, M. C. Pérez-Camino, J. M. García. "Evaluation of virgin olive oil bitterness by quantification of secoiridoid derivatives". *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81 (2004) 71-75.
27. Owen, R. W.; Mier, W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Spiegelhalder, B.; Bartsch, H. "Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil". *Clinical Chem.* 2000, 46, 976-988.
28. M. Brenes, F.J. Hidalgo, A. García, J.J. Ríos, P. García, R. Zamora, A. Garrido. "Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil". *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77 (2000) 715-720.

29. R.W. Owen, W. Mier, A. Giacosa, W.E. Hull, B. Spiegelhalder, H. Bartsch. "Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil". *Clin. Chem.* 46 (2000) 976-988.
30. R. Mateos, J.L. Espartero, M. Trujillo, J.J. Ríos, M. León-Camacho, F. Alcuía, A. Cert. "Determination of Phenols, Flavones, and Lignans in Virgin Olive Oils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection". *J. Agric. Food Chem.* 49 (2001) 2185-2192.
31. Brenes, M.; García, A.; Ríos, J. J.; García, P.; Garrido, A. "Use of 1-acetoxypinoresinol to authenticate Picual olive oils". *Int. J. Food Sci. Technol.* 2002, 37, 615-625
32. A. Carrasco Pancorbo, C. Cruces-Blanco, A. Segura Carretero, A. Fernández Gutiérrez. "Sensitive determination of phenolic acids in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis". *J. Agric. Food. Chem.* 52 (2004) 6687-6693.
33. A. Gómez-Rico, M. Desamparados Salvador, M. La Greca, and G. Fregapanè. "Phenolic and Volatile Compounds of Extra Virgin Olive Oil (*Olea europea* L. Cv. *Cornicabra*) with Regard to Fruit Ripening and Irrigation Management". *J. Agric Food Chem.* 2006 Sep 20;54 (19):7130-7136 .