

# Universidad de Huelva

Departamento de Química “Profesor José Carlos Vilchez  
Martín”



**Estudio de la trazabilidad integral de los aceites de oliva  
virgen extra de la provincia de Huelva**

**Memoria para optar al grado de doctora  
presentada por:**

**María Beltrán Muniz**

Fecha de lectura: 16 de diciembre de 2015

Bajo la dirección de los doctores:

Rafael Beltrán Lucena

Ana Sayago Gómez

**Huelva, 2015**



**UNIVERSIDAD DE HUELVA**  
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES  
“PROFESOR JOSÉ CARLOS VÍLCHEZ MARTÍN”



**Universidad  
de Huelva**

**ESTUDIO DE LA TRAZABILIDAD INTEGRAL DE LOS ACEITES  
DE OLIVA VIRGEN EXTRA DE LA  
PROVINCIA DE HUELVA**

PROGRAMA DE DOCTORADO:  
TÉCNICAS INSTRUMENTALES EN QUÍMICA

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA POR:

María Beltrán Muniz

Bajo la dirección de los doctores:

Rafael Beltrán Lucena

Ana Sayago Gómez

Huelva. 2015



**ESTUDIO DE LA TRAZABILIDAD INTEGRAL DE LOS ACEITES  
DE OLIVA VIRGEN EXTRA DE LA  
PROVINCIA DE HUELVA**

**Directores:**

**Fdo.:** Rafael Beltrán Lucena  
CATEDRÁTICO DE ESCUELA UNIVERSITARIA

**Fdo.:** Ana Sayago Gómez  
PROFESORA TITULAR DE UNIVERSIDAD



**Universidad  
de Huelva**

**UNIVERSIDAD DE HUELVA**  
FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA Y CIENCIAS DE LOS MATERIALES  
“PROFESOR JOSÉ CARLOS VÍLCHEZ MARTÍN”

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA POR:

**Fdo.:** María Beltrán Muniz



Al niño de mis ojos,  
mi ahijado Rafa



Es difícil entender la importancia de los agradecimientos de una tesis doctoral hasta que no se ha terminado. En ese momento te das cuenta de cuánto tienes que agradecer a tanta gente.

Desde estas líneas intentaré expresar mi más sincera gratitud a todas aquellas personas que durante estos años de trabajo han estado a mi lado, familia, amigos y compañeros, y que de una u otra forma han hecho posible que hoy deje de ser un sueño para pasar a ser una realidad.

Considero que todo aquel que ha tenido alguna relación conmigo durante el desarrollo de esta tesis merece mi total agradecimiento, ya que estoy segura de que en algún momento ha escuchado estoicamente quejas y lamentaciones, alegrías y satisfacciones, o entusiastas explicaciones acerca del aceite de nuestra provincia.

Voy a empezar agradeciendo el apoyo y ayuda a mis directores de tesis, mi padre, Rafael Beltrán y Ana Sayago, sin ellos no estaría terminado este trabajo. Ha sido especial trabajar con vosotros, a veces difícil por la excesiva confianza pero una gran experiencia que recordaré siempre con muchísimo cariño. Por supuesto, el duro trabajo de mi padre, su tesón y sus ganas de ver a su hija doctorada han sido imprescindibles para que hoy día se pueda leer esta tesis doctoral sobre uno de los productos, el oro líquido le llaman, que entusiasma a tanta gente en la actualidad.

A M<sup>a</sup> Ángeles Fernández por la gran ayuda prestada, por su aporte de conocimientos y experiencias que han resuelto multitud de dudas que me han ido surgiendo a lo largo de todos estos años de trabajo.

Gracias también a Inmaculada Giráldez y a Jesús de la Rosa por la confianza que siempre han tenido en mí, por la preocupación por mi carrera científica y mi vida en general, por su interés y las ganas de ayudarme que siempre han demostrado.

A mis antiguos compañeros en aquel polígono perdido de la mano, en el edificio CIDERTA, alejado del resto del Campus Universitario. A Luisa, Marle, M<sup>a</sup> Jesús, Laura, M<sup>a</sup> José, Carlos, Manuel, Gloria y en especial a mi amiga Vale, gracias por tantos buenos ratos y agradables desayunos compartidos, llenos de complicidad y cotilleos con nuestra revista científica preferida. Valeria, gracias por tu amistad, tus consejos, tu motivación a seguir adelante y tu alegría de vivir tan contagiosa, tu energía positiva, por estar siempre cuando te necesito.

A M<sup>a</sup> Luz, Mercedes y María, gracias por vuestra ayuda incondicional, amistad, por vuestro apoyo, colaboración y dedicación y por todos los momentos en los que a

pesar de estar desesperadas con los dichosos equipos pudimos sacar ratos de risas y evadirnos de los problemas del laboratorio.

A Dolores Hernanz, que aunque hace mucho tiempo que no trabajamos juntas siempre me demostraste mucho cariño y confianza, enseñándome algunas de las técnicas que desempeñé en el desarrollo de este trabajo.

A los compañeros del grupo de investigación Análisis Medioambiental y Bioanálisis, en especial a Miguel Ángel García Sevillano por su colaboración y ayuda en la preparación de las muestras.

A las almazaras de la provincia de Huelva, Olibeas, Oleodiel y Olivar de Huelva, que han hecho posible el desarrollo de la tesis tanto con la prestación de muestras para su análisis como por el interés mostrado en el tema que en ella he tratado.

A los doctores Ramón Aparicio, Diego Luis García y María Teresa Morales Millán por su ayuda y colaboración en el desarrollo de la Tesis.

Al proyecto FQM 6185 de la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía, que ha permitido financiar este trabajo.

Quiero agradecer también a todos mis amigos y amigas, por su escucha, su preocupación y la atención que siempre han demostrado sobre mi investigación a pesar de no ser expertos en el tema, especialmente Vane, Caro y Elena. Gracias chicas por estar siempre pendiente de cómo va mi vida tanto profesional como personalmente y por estar siempre en los momentos bajos.

A mis actuales compis, que aunque empezamos siendo “simplemente coincidentes laborales” he conseguido llegar a entablar una gran amistad con algunos de ellos, Ana, Miguel, Amalia, J. Ramón, gracias por vuestra paciencia al escuchar mis quejas a diario por tener que ir después de allí a la uni, por nuestras conversaciones y grandes momentos que hacen que el trabajo sea mucho más ameno y agradable y por ayudarme a “no olvidar sonreír”.

Jacobo, a ti te tengo que agradecer tantas cosas... Gracias por tu gran apoyo, por las fuerzas que siempre me das a seguir adelante en todos los aspectos de mi vida. Como no agradecerte también tu colaboración en este trabajo, tu llevaste a cabo la toma de muestras que yo no puede hacer por lo que ya sabemos..., por tu compañía en el laboratorio, tantas tardes ayudándome con mis análisis para poder terminar cuanto antes y poder aprovechar más momentos juntos. Por aguantarme y entender la falta de tiempo para dedicar a nuestra casa y en definitiva gracias por quererme tanto.

A mi madre Maty y mis hermanas Rocío e Irene, agradecer que siempre las tenga junto a mí, en las buenas y en las malas, en todo momento conmigo. Por no fallarme nunca, por quererme tal como soy, con mi carácter algunas veces agrio y porque son

con las que primero libero mi estrés y mis momentos de angustia. Grandes como madre y hermanas y mejores amigas y confidentes, siempre unidas. Os necesito y os necesitare siempre. Gracias por confiar en mí y apoyarme en todas las decisiones que he necesitado tomar a lo largo de la vida.

Gracias también al resto de mi familia, cuñados, tíos, primos y familia política. Gracias por estar a mi lado y formar parte de mi vida.





# ÍNDICE



<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
1.1. Contexto histórico y actual del aceite de oliva	3
1.2. El aceite de oliva virgen	10
1.3. El aceite de oliva virgen extra de la provincia de Huelva	11
1.4. Composición del aceite de oliva virgen extra	15
1.5. Trazabilidad del aceite de oliva virgen extra	31
<b>2. OBJETIVOS</b>	39
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL</b>	43
3.1. Muestras	45
3.2. Reactivos, disoluciones y materiales	53
3.2.1. Determinación de la composición elemental de los suelos, alperujos y aceites	53
3.2.2. Determinación del perfil en ácidos grasos	54
3.2.3. Determinación de esteroides	54
3.2.4. Determinación de fenoles	56
3.2.5. Determinación de compuestos volátiles	57
3.3. Instrumentación	59
3.4. Métodos	59
3.4.1. Determinación de la composición elemental de los suelos, alperujos y aceites	60
3.4.2. Determinación del perfil en ácidos grasos	65
3.4.3. Determinación de esteroides y eritrodiool y uvaol	70
3.4.4. Determinación de fenoles mediante HPLC-DAD	71
3.4.5. Determinación de fenoles mediante UHPLC-ESI-MS/MS	78
3.4.6. Determinación de los Compuestos volátiles	81
3.4.7. Métodos estadísticos	82
<b>4. RESULTADOS</b>	85
4.1.- Trazabilidad geográfica	87
4.1.1. Determinación de la trazabilidad geográfica en función de la composición elemental de los suelos, alperujos y aceites	87
4.1.2. Determinación de la trazabilidad geográfica atendiendo al estudio de compuestos minoritarios implicados en el origen geográfico	117
4.2.- Trazabilidad sensorial	131
4.2.1. Análisis de fenoles mediante HPLC-DAD	131
4.2.2. Análisis de fenoles mediante UHPLC-MS y volátiles	139
<b>5. RESUMEN Y CONCLUSIONES FINALES</b>	151
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	157

<b>7. ANEXOS</b>	179
Anexo 1. Índice de tablas	181
Anexo 2. Índice de figuras	183
Anexo 3. Publicación relacionada con la temática de la tesis	185



# **CAPÍTULO 1.**

## ***Introducción***



## **1.1 Contexto histórico y actual del aceite de oliva**

La historia del Olivo hunde sus raíces en el tiempo hasta el mismo origen de la agricultura en las primeras civilizaciones del mediterráneo y el oriente próximo.

El antecesor del olivo, el olivo silvestre o acebuche (*olea sylvestris*), es originario de Asia Menor meridional. Es un árbol de pequeño porte, tipo arbusto, y de ramas espinosas, cuyos frutos son pequeños y poco carnosos. Su cultivo para la obtención de aceite comienza en las épocas paleolítica y neolítica (5000 a 3500 a. C.)

Las tablillas minoicas son los primeros documentos escritos que hablan del aceite de oliva y aparecen en la isla de Creta, durante el reinado del rey Minos, en el año 2500 a. C.

Se cree que la llegada del olivo y de su aceite a Europa fue gracias a los fenicios (siglo VI a. C.), grandes navegantes y comerciantes, que lo utilizaban como elemento de intercambio en sus transacciones comerciales, extendiéndose su cultivo por toda la Cuenca Mediterránea (Uceda y col 2008)

Posteriormente los romanos extenderían el cultivo de óleum por los territorios que ocuparon en las costas mediterráneas. A España, el olivo llega de la mano de los fenicios (1050 a. C.), pueblo de gran tradición olivarera, con una cultura muy avanzada en técnicas de cultivo, y en el procedimiento para extraer el aceite de sus frutos: la molienda. Los árabes introdujeron sus variedades en el sur de España e influyeron en la difusión del cultivo hasta el punto de que muchos vocablos castellanos, como aceite (zeit), aceituna o acebuche tienen raíz árabe.

Los Reyes Católicos favorecen la expansión del olivo hacia zonas del interior de la Península Ibérica. En esta época, el aceite era un ingrediente básico en la zona de Andalucía y Extremadura. Gracias al aumento demográfico en España y al descubrimiento de América en 1492, se incrementan las zonas de cultivo del olivo, ampliando también, la producción y el consumo de aceite de oliva.

Este hito histórico permite la expansión del cultivo del olivo al nuevo mundo. En el archivo de Indias, podemos encontrar numerosas referencias a las plantaciones de olivos y al aceite de oliva de las diferentes expediciones de Cristóbal Colón.

La expansión de este cultivo continúa por Australia y Sudáfrica (siglo XVIII), gracias a la labor de los misioneros españoles e italianos.

Durante los siglos XVIII y XIX, el aceite de oliva que se obtenía en la Península Ibérica, era de mala calidad, atrojado y de gran acidez, procedente de frutos mohosos y rancios, siguiendo una técnica de elaboración pésima. Sin embargo, a lo largo del siglo XIX, gracias al aumento de inmigrantes en tierras hispanoamericanas, continúa la expansión del cultivo del olivo, pero debido a una deficiente infraestructura industrial y comercial, este comercio se desvía a Italia donde el aceite español era refinado, envasado y exportado a América del Sur.

Hoy en día podemos encontrar cultivos de olivos en lugares alejados como la Región Sudafricana, Australia, Japón o China (Uceda y col 2008). Italia y España son los países con mayor número de olivos y los principales productores y exportadores de aceite de oliva, y dentro de España, Andalucía.

El olivo (*olea europaea*), pertenece a la familia de las oleáceas (*Oleaceae*), pero a diferencia de las otras especies de su familia, su fruto es comestible.

Es un árbol centenario, de crecimiento lento, cuya producción en la mayoría de las variedades, comienza a partir del octavo o noveno año de cultivo y puede permanecer vivo y productivo durante cientos de años (Uceda, 2000). Son árboles de copa redondeada y densa, que pueden llegar a alcanzar 15 metros de altura, pudiendo controlarse esta mediante la poda. Su tronco es grueso y tortuoso, con corteza de color verde grisácea, cuya base sirve de almacén del material de reserva.

El olivo es un árbol de hoja perenne, muy resistente a la sequía y a las altas temperaturas, sin embargo, no resiste temperaturas inferiores a 10° C bajo cero.

Es un árbol vecero, aunque unas variedades son más que otras, pudiendo disminuir la vecería adelantando la recogida de la aceituna o bien mediante riego, motivo por el cual actualmente hay una tendencia al cultivo en regadío aunque la mayor parte de los olivos se cultivan en secano

En España se cultivan diversas variedades de aceituna.

Concretamente las variedades que predominan en la provincia de Huelva son: arbequina, picual y verdial.

### **Arbequina**

Esta variedad debe su nombre a un pueblo de la provincia de Lérida llamado Arbeca. Se cultiva principalmente en la zona de Lérida, Tarragona, Huesca, Zaragoza y Teruel, extendiéndose en los últimos años su cultivo a Andalucía.



Es una variedad muy resistente al frío.

Su árbol de tamaño pequeño, permite su cultivo intensivo.

Aunque su fruto es uno de los más pequeños utilizados para producir aceite de oliva, aproximadamente 1,9 gramos, sus aceites son de exquisito flavor, temprana producción, elevadas cosechas y buen rendimiento graso.

Los aceites de esta variedad presentan un elevado contenido en ácido linoleico y un bajo contenido en polifenoles, lo que los hace menos estables a la oxidación, por ello, deben consumirse pronto y mantenerlos resguardados de la luz y el calor. Son aceites ideales para consumir en crudo, debido a su riqueza en compuestos aromáticos.

### **Pical**

Esta variedad debe su nombre a la forma del ápice de su fruto, que termina en pico.

Es el cultivo más importante en extensión, llegando a alcanzar la mitad del olivar nacional y alrededor de un 20% del mundial. Su principal zona de



producción es Andalucía, aunque en los últimos años su cultivo se ha extendido por todo el ámbito nacional, gracias a su gran productividad y precoz producción.

Su árbol es vigoroso y se adapta fácilmente a diferentes condiciones de clima y suelo. Su fruto es de tamaño medio-grande, con un peso medio de unos 3,2 gramos y un buen rendimiento graso. La resistencia al desprendimiento de los frutos es baja, favoreciendo la recolección mecanizada.

Su riqueza en ácido oleico y sustancias antioxidantes naturales, como los polifenoles y tocoferoles, además de su bajo contenido en ácido linoleico, lo convierten en uno de los aceites más estables. Son aceites aptos para el consumo en crudo, aunque también son excelentes para cocinar, debido a su resistencia a la termooxidación.

### **Verdial de Huévar**

Su denominación “Verdial”, se debe a que su fruto, de maduración tardía, no alcanza el color negro que da la madurez de las aceitunas. La denominación "Verdial de Huévar" fue adoptada por Orteganieta (1955) para poder diferenciarlos de otros cultivos de igual denominación genérica.



La principal zona de cultivo es el suroeste de la Península Ibérica, en las provincias de Huelva y Sevilla, encontrándose también en la comarca del Alentejo (Portugal).

Es una variedad muy resistente al frío y a la sequía, adaptándose muy bien a distintos tipos de suelo, aunque vecera y poco productiva.

Su árbol es vigoroso y de copa densa y sus frutos presentan gran resistencia al desprendimiento, dificultando su recolección mecanizada.

El tamaño de su fruto es grande, 5.7 gramos, utilizándose como aceituna de mesa, así como para la producción de aceite, con un buen rendimiento graso.

Sus aceites presentan un contenido en ácido linoleico medio, siendo su estabilidad frente a la oxidación también media. Son aceites tempranos y frutados, con un cierto aroma herbáceo, algo amargos y picantes. Los aceites de oliva de esta variedad, presentan altas concentraciones de eritrodil y fitol, además de compuestos como 24-metilen-24-dihidro lanosterol, citrostadienol y butirospermol. (Aparicio y Harwood, 2003).

La producción del aceite de oliva se ha extendido más allá de las zonas mediterráneas, pero aún son éstas las mayores productoras de dicho producto. La Unión Europea representa más del 70% de la producción mundial, destacando España, dentro del marco Europeo con más del 60%, seguida por Italia, con un 21% y Grecia con una producción del 13,5% tal como se muestra en la figura 1.1. Los datos estadísticos corresponden la base de datos del COI (Consejo Oleícola Internacional), los cuáles son el resultado de recopilar las cifras suministradas regularmente por los estados miembros.

Según los datos medios de producción de las campañas olivareras desde el año 2009 hasta el año 2014 proporcionados por la Agencia para el aceite de oliva (AAO), más del 80% del aceite se produce en Andalucía, correspondiendo a Jaén más de la mitad de su producción. Córdoba, con casi el 23% y Granada con algo más del 10% son,

junto a Jaén, las mayores productoras andaluzas. Entre las minoritarias se encuentra Huelva con tan sólo el 0,5% de la producción del aceite andaluz, como podemos observar en la figura 1.2.

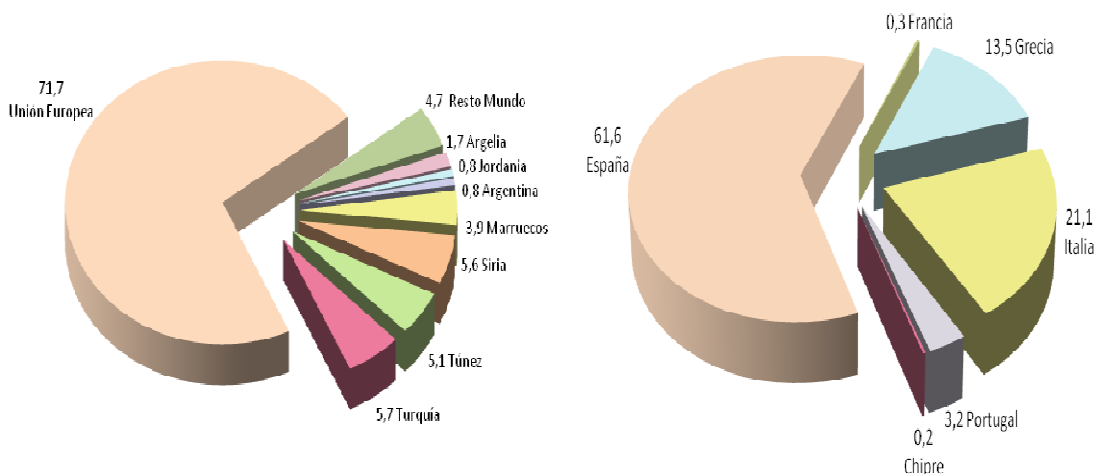


Figura 1.1. Porcentajes a nivel mundial y europeo de los principales productores de aceite de oliva.

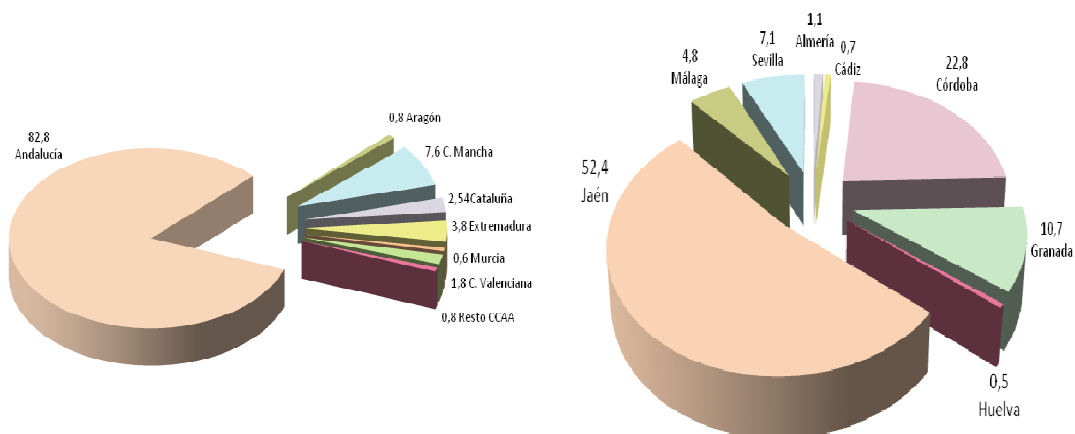


Figura 1.2. Porcentajes por comunidades autónomas y a nivel andaluz de los principales productores de aceite de oliva.

Debido a la producción y al consumo de aceite de oliva en nuestro país, éste se ha convertido en un producto clave en el comercio español. Por ello, la reglamentación

para el mismo está siempre actualizada. Buen ejemplo de ello es el Reglamento de ejecución (UE) n° 299/2013 de la comisión de 26 de marzo de 2013 que modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis; donde se definen las características físicas, químicas y organolépticas de los aceite de oliva y orujo de oliva, así como los métodos de evaluación de tales características.

En dicho Reglamento se hace incapié en que los Estados miembros se cercioren de que los controles de conformidad se lleven a cabo de forma selectiva, sobre la base de un análisis de riesgos, y con la frecuencia apropiada, con el fin de garantizar que el aceite de oliva comercializado se ajuste a la categoría declarada.

Este reglamento establece la siguiente la clasificación de los aceites de oliva:

- ✎ Aceite de oliva virgen extra: aceite de oliva virgen cuya acidez, expresada en ácido oleico, no supera el 0.8%; su conterido en ceras es menor o igual a 250 mg/kg, y cuyas demás características son conformes a las establecidas para la categoría.
- ✎ Aceite de oliva virgen: aceite de oliva virgen cuya acidez, expresada en ácido oleico, no supera el 2%; su conterido en ceras es menor o igual a 250 mg/kg, y cuyas demás características son conformes a las establecidas para la categoría.
- ✎ Aceite de oliva lampante: aceite de oliva virgen cuya acidez, expresada en ácido oleico, es superior al 2%; su conterido en ceras es menor o igual a 300 mg/kg, y cuyas demás características son conformes a las establecidas para la categoría.
- ✎ Aceite de oliva refinado: aceite de oliva virgen cuya acidez, expresada en ácido oleico, no supera el 0.3%, su conterido en ceras es menor o igual a 350 mg/kg, y cuyas demás características son conformes a las establecidas para la categoría.

- ✿ Aceite de oliva (compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes): aceite de oliva virgen cuya acidez, expresada en ácido oleico, no supera el 1%; su contenido en ceras es menor o igual a 350 mg/kg, y cuyas demás características son conformes a las establecidas para la categoría.

## 1.2. El aceite de oliva virgen

El aceite de oliva virgen, es el zumo natural procedente del fruto del olivo, olivas o aceitunas, que durante su elaboración no tiene contacto en ningún momento con productos químicos o disolventes orgánicos.



Es el único aceite vegetal que se puede consumir crudo, sin necesidad de ser refinado. (Olias y col. 1993). Ésta es la razón por la cual la composición del aceite de oliva virgen no se ve alterada, conservando todas sus propiedades nutricionales, sus cualidades organolépticas y sus efectos beneficiosos. Durante el proceso de refinado de un aceite se pierden muchos compuestos, especialmente de la fracción insaponificable, de gran valor biológico, formándose nuevos compuestos (radicales libres, peróxidos, ácidos grasos conjugados, etc...), que pueden tener efectos nocivos para la salud.

Cuando este zumo oleoso procede de frutos sanos, recogidos en su mejor momento, de forma correcta y bajo una elaboración adecuada, da lugar a un aceite de excepcionales características organolépticas: olor, color y sabor.

Una mala técnica de recolección del fruto, una maduración anormal o que haya pasado mucho tiempo el fruto almacenado en las tolvas a la espera de ser molturado, provocan la alteración del aceite de oliva, afectando a sus características organolépticas y aumentando su acidez, siendo necesaria su refinación para que sea apto para el consumo humano.

### 1.3. El aceite de oliva virgen extra de la provincia de Huelva

La zona de estudio “la provincia de Huelva”, es la más occidental de las provincias andaluzas. Se encuentra comprendida entre los 38° 15” y los 36° 45” de latitud. Topográficamente se distinguen cuatro ámbitos geográficos bien definidos, la Costa, El Andévalo y su cuenca minera, la Campiña de El Condado y la Sierra de Aracena.

El clima es mediterráneo, más Continental hacia el Norte y con influencias atlánticas en la costa. Las precipitaciones son de 500 mm anuales, llegando a alcanzar los 1000 mm anuales en la zona montañosa. Goza de inviernos muy suaves con temperaturas por encima de los 10° C. Los veranos son cálidos y secos. La luminosidad es muy elevada, con unas 3000 horas de sol al año. Sus suelos son sueltos, arenosos, permeables y de fertilidad moderada.

La zona de estudio de la elaboración del aceite de oliva virgen extra abarca 4 términos municipales de la provincia de Huelva (Beas, Gibraleón, Niebla y Sanlúcar del Guadiana). La figura 1.3 muestra un mapa de la zona de estudio.

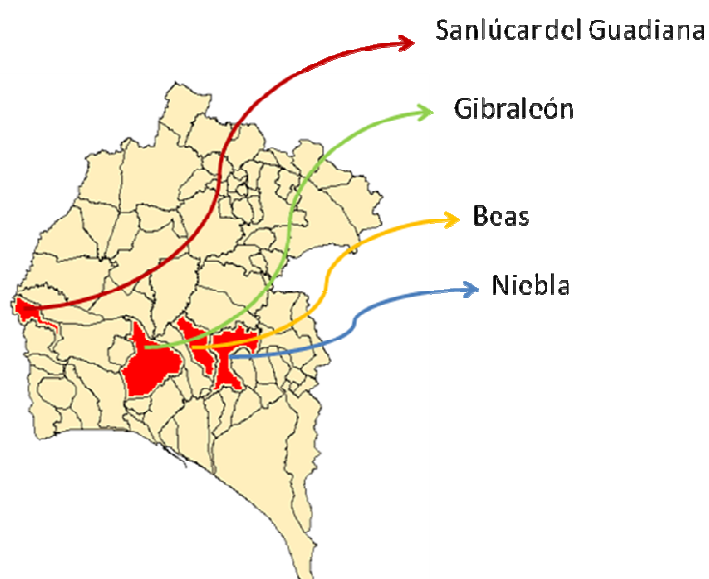


Figura 1.3. Mapa de la zona de estudio.

En 1990 la superficie de olivar era aproximadamente de 40.000 ha, siendo la variedad Verdial de Huévar la más importante, con el 80% de la superficie, y el 20% restante con variedades Manzanilla, Zorzaleña, Bical, etc. Dado el peso específico de la variedad Verdial de Huévar en la olivicultura tradicional onubense, a continuación se exponen algunas de las características agronómicas de la misma:

- Muy sensible a Aceituna jabonosa o Lepra (*Collectotricum gloesporioides*).
- Muy sensible a Mosca del olivo (*Bactrocera oleae*).
- Acentuada vecería o alternancia de cosechas.
- Dificultosa recolección (alta fuerza de retención de frutos y elevado porte del arbolado).
- Elevado contenido en eritrodiool.

Todas estas características, intrínsecas de la variedad, incrementadas por las condiciones de cultivo, inciden negativamente en la producción, en los costes de cultivo y en la calidad de los aceites obtenidos.

En la actualidad la superficie de olivar alcanza aproximadamente 35.000 ha y una producción media anual de aceite de 5.000 tm. La variedad Verdial de Huévar ha quedado reducida a un 40% de la superficie total y un 30% lo constituyen Manzanilla de Sevilla, Manzanilla Serrana, Bical, Gallego y Zorzaleña. El 30% restante lo forma lo que llamamos nuevas variedades para el cultivo intensivo del olivar. Las más generalizadas son Picual y Arbequina, seguida de Manzanilla de Sevilla, y en menor cuantía Hojiblanca y Frantoio. Estas variedades son más precoces, menos veceras o alternantes, elegidas por su fácil recolección o porque poseen algunas características agronómicas y aceiteras específicas. Actualmente el 70% de la producción de aceite provincial procede de ellas, con tendencia a incrementarse a medida que las nuevas plantaciones entren en producción o alcancen el estado adulto.

## Evolución de la calidad de los aceites de oliva obtenidos en la provincia

Para efectuar una adecuada gestión comercial de cualquier sector productivo, es imprescindible la obtención de la máxima calidad del producto.

En el aceite de oliva, las normas de calidad están establecidas en el Reglamento CE nº 2568/91 y en su última modificación CE nº 1989/03, donde se recogen las características que deben reunir los aceites de oliva para su clasificación en las distintas categorías.

Destacar que cada día es más frecuente valorar la calidad de los aceites de oliva desde otras perspectivas no recogidas directamente en el citado reglamento, como son los aspectos nutricionales, culinarios, comerciales, sensoriales, etc. No obstante, sólo nos referiremos a la calidad reglamentada y con el objetivo de facilitar la comprensión de la evolución de dicha calidad se exponen algunos parámetros físicos químicos y las características organolépticas que deben reunir los aceites de oliva obtenidos en las almazaras (Tabla 1.1). Basta con que un solo parámetro no esté en el baremo de la categoría, para clasificar el aceite como de la categoría inferior.

**Tabla 1.1.** Características organolépticas regladas del aceite de oliva.

Categoría	Acidez (g/100ml)	Eritrodiol + uvaol (%)	K270	Índice peróxidos	Análisis sensorial	
					MD Defecto	MF Frutado
Aceite de oliva virgen extra	≤ 0.8	≤ 4.5	≤ 0.22	≤ 20	Md = 0	Mf > 0
Aceite de oliva virgen	≤ 2	≤ 4.5	≤ 0.25	≤ 20	Md ≤ 2,5	Mf > 0
Aceite de oliva lampante	>2	>4.5	----	----	Md > 2,5	

La situación de la calidad de los aceites de Huelva en la Campaña 1994/95 se muestra en la Tabla 1.2. Las muestras de aceite proceden de la variedad Verdial de Huévar, la extracción se efectuó por el sistema de prensa y separación por pozuelos, el aceite estaba almacenado en depósitos de hierro.

Los resultados de los análisis evidenciaron la deficiente calidad de los aceites obtenidos, tanto como consecuencia de los parámetros físico-químicos como organolépticos (aceites lampantes). Estos aceites no son aptos para el consumo

directo, teniendo que pasar por refinería y, por tanto, con pérdidas notables de precios de mercado.

**Tabla 1.2.** Resultado de análisis y valoración organoléptica de aceites. Campaña 1994/95.

Muestra nº	K270	Acidez	Índice Peróxido	Punto organolépticos	Defectos o Atributos
1	0.18	2.9	22.5	2.5	Avinado, atrojado, aceitoso, suciedad
2	0.19	3.6	21.6	3	Atrojado, borra agrio,
3	1	1	16.5	2	Infierno, turbio, aceituna zapatera
4	2	2	17.9	3	Mantequilla, gusano, Avinado, atrojado y rancio
5	1.3	1.3	19.7	4.5	Afrutado muy maduro
6	1.8	1.8	32.4	3.5	Atrojado, agrio, aceite viejo
7	2.9	2.9	34.7	3.5	Esparto, viejo, tierra, jabón, olor, orujo

Desde estos momentos, comienza una intensa labor formativa de los olivares y almazaras, con el objetivo de mejorar la calidad de los aceites. Dicha formación consistió fundamentalmente en la realización de cursos y jornadas, demostraciones, etc. analizando los factores agronómicos, transporte, clasificación de aceitunas, molturación, sistemas de extracción de aceites, almacenamiento, cursos de almazareros y catas de aceite, todos relacionados con la calidad de los aceites.

Es de destacar el gran esfuerzo, en cuanto a inversión y gestión, realizado por las almazaras de la provincia para la renovación de las instalaciones lo que, junto con el establecimiento de las normas de recolección, transporte y entrega adoptadas por los socios, permitieron la obtención de aceites con extraordinarios resultados. La Tabla 1.3. recoge los resultados obtenidos por los aceites de la campaña 2012. Los aceites analizados son todos clasificados como aceites de oliva virgen extra, avalando la excelente calidad de nuestros aceites y confirmando el elevado nivel de mejora alcanzado.

Como se desprende de los cuadros de análisis, se ha pasado de obtener aceites de mala calidad procedentes de una sola variedad de aceituna (Verdial de Huévar) a obtener una gama importante, de aceites procedentes de distintas variedades (aceite

“Estudio de la Trazabilidad Integral de los aceites de oliva virgen extra de la provincia de Huelva”  
 de Picual, Arbequina, Verdial de Huévar, Hojiblanca, etc.) con categoría de virgen extra.

**Tabla 1.3.** Análisis de aceites de Huelva. Campaña 2011/12.

Depósito	Variedad	Acidez (g/100ml)	K <sub>270</sub>	Índice peróxido	Análisis sensorial		Clasificación
					MF Frutado	MD Defecto	
Cooperativa San Bartolomé (Beas)							
2	Picual	0.2	0.10	2.8	5.8	0.0	Virgen extra
1	Arbequina	0.1	0.10	4.4	6.0	0.0	Virgen extra
Cooperativa San Antonio Abad (Trigueros)							
1	Arbequina	0.1	0.10	5.7	4.6	0.0	Virgen extra
3	Picual	0.2	0.12	4.9	4.7	0.0	Virgen extra
3	Arbequina	0.1	0.11	9.2	3.6	0.0	Virgen extra
6	Picual	0.2	0.12	8.5	4.6	0.0	Virgen extra
Cooperativa Olivarera Bartolina (San Bartolomé de la Torre)							
5	Picual	0.1	0.13	5.1	4.1	0.0	Virgen extra
0	Verdial	0.3	0.15	9.1	4.0	0.0	Virgen extra
Molino Olivar de Huelva							
G-7	Arbequina	0.1	0.10	4.4	5.9	0.0	Virgen extra
B-3	Hojiblanca	0.1	0.12	4.1	5.3	0.0	Virgen extra

#### 1.4. Composición química del aceite de oliva virgen

El aceite de oliva presenta una composición bastante compleja. Para el estudio de la misma, los compuestos químicos del aceite pueden dividirse en dos grandes grupos a los que se denomina fracción saponificable y fracción insaponificable. (Aparicio y Harwood, 2003).

En el siguiente esquema (Figura 1.4) se muestran los compuestos presentes en ambas fracciones.

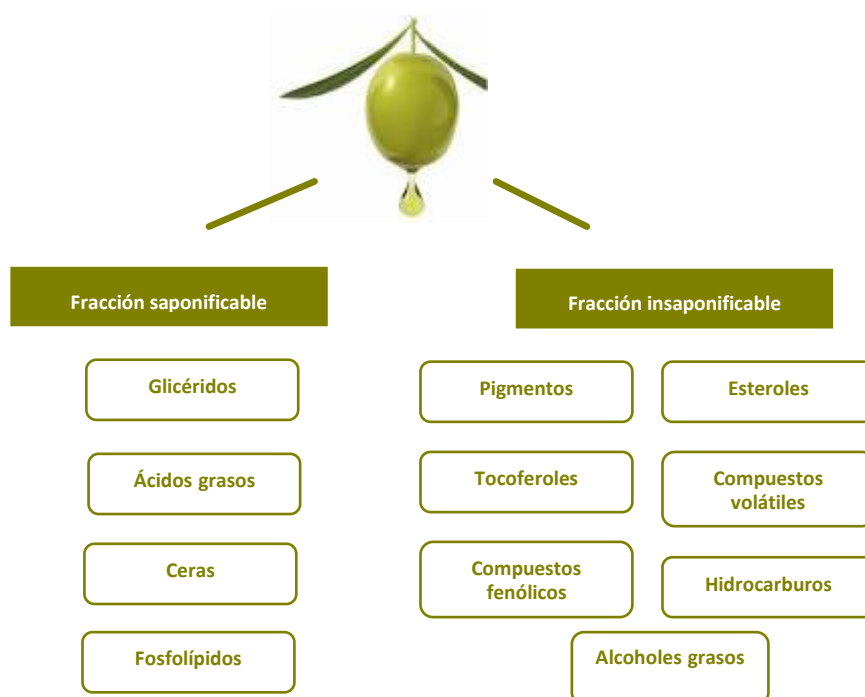


Figura 1.4. Esquema de la composición química del aceite de oliva virgen.

### Fracción saponificable

La fracción saponificable representa entre el 98 y el 99,5% del peso del aceite. Está constituida por glicéridos (ésteres de ácidos grasos con la glicerina), ácidos grasos libres, ceras (ésteres de ácidos grasos y alcoholes alifáticos), ésteres de esteroides y fosfolípidos.

#### Glicéridos

Los glicéridos son los responsables de las características físicas de un aceite de oliva. Su función es de almacenamiento de energía, gracias a su alto contenido energético.

La glicerina se esterifica con uno, dos o tres ácidos grasos, para formar los mono, di y triglicéridos, respectivamente. Basándonos en su composición en ácidos grasos, en el aceite de oliva, se pueden detectar más de 70 triglicéridos, muchos de ellos en cantidades despreciables. El componente principal de los triglicéridos en el aceite de oliva es el ácido oleico. Los triglicéridos mayoritarios en el aceite de oliva son: OOO

(40-59%), POO (12-20%), OOL (12.5-20%), POL (5,5-7%) y OOE (3-7%), (Boskou, 1998), donde O: Oleico, P: Palmítico, L: Linoleico y E: Esteárico. La composición de los triglicéridos sirve para detectar adulteraciones del aceite de oliva con otros aceites (Casadei y col., 1978). Los monoglicéridos y diglicéridos son productos intermedios de la síntesis de los triglicéridos o el resultado de la hidrólisis de los triglicéridos debido a la alteración del aceite (Cert y col., 1997). La concentración de diglicéridos en el aceite de oliva varía entre 1 y 2.8 % y los monoglicéridos están presentes en cantidades menores al 0.25% (Boskou, 1998).

### Ácidos grasos

Los principales factores que influyen en el contenido final de los ácidos grasos son la latitud, las condiciones climáticas, la variedad y el grado de madurez de las aceitunas en el momento de su recolección (Boskou, 1998; Murillo y col., 1997).

Normalmente los ácidos grasos no se encuentran libres, sino formando ésteres. La proporción de ácidos grasos libres en el aceite de oliva es muy pequeña y depende de la calidad de éste, ya que la presencia de este tipo de compuestos, al igual que ocurre con los mono y diglicéridos, se debe a un proceso de hidrólisis. Estos ácidos grasos libres le confieren acidez al aceite.

Dependiendo de la naturaleza química de los ácidos grasos, al número de dobles enlaces, se clasifican en saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, cuyos porcentajes en el aceite de oliva suelen oscilar en torno al 14,72 y 14%, respectivamente (Aparicio y Harwood, 2003). La presencia de estos dobles enlaces, le proporcionan al aceite una mayor fluidez. La Tabla 1.4 recoge la composición de ácidos grasos en el aceite de oliva.

El aceite de oliva es el principal aporte de ácido oleico en la dieta mediterránea. (Pérez-Jiménez y col. 2005). El ácido oleico es un ácido graso monoinsaturado, lo que le confiere al aceite una mayor estabilidad cuanto mayor es el contenido de éste frente al de ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico y ácido linolénico), que son

fácilmente oxidables. Gracias a la riqueza del aceite de oliva en ácido oleico y a su bajo contenido en ácidos linoleico y linolénico, es el aceite de origen vegetal más resistente a la oxidación. (Aparicio y col.1999, O’Brien Richard D. 2004). Esta es la razón por la que aceites con mayor contenido en ácidos grasos poliinsaturados, son más susceptibles a la oxidación, por la presencia de un mayor número de dobles enlaces, que se oxidan con mayor facilidad, dando lugar a compuestos como alcoholes, aldehídos, cetonas, etc., responsables del enranciamiento del aceite, confiriéndole mal olor y sabor. (Civantos y col. 1992).

**Tabla 1.4.** Composición de ácidos grasos en el aceite de oliva (%), indicando su acrónimo, el número de dobles enlaces y su rango de concentración.

Ácidos grasos	Acrónimos	Nº de carbonos	Límites (%)
Enlaces dobles			
<b>Saturados</b>			
Ac.Mirístico	C 14:0	0	≤0.05
Ac.Palmítico	C 16:0	0	7,5-20
Ac.Heptadecanoico o Margárico	C 17:0	0	≤0.3
Ac.Esteárico	C18:0	0	0,5-5,0
Ac.Araquídico	C20:0	0	≤0.6
Ac.Behénico	C22:0	0	≤0.2
Ac.Lignocérico	C24:0	0	≤0.2
<b>Monoinsaturados</b>			
Ac.Palmitoleico	C 16:1 (ω7)	1	0,3-3,5
Ac.Margaroleico	C 17:1	1	≤0.3
Ac.Oleico	C18:1 ( ω9)	1	55-83
Ac.Eicosenoico o Gadoleico	C20:1	1	≤0.4
<b>Poliinsaturados</b>			
Ac.Linoleico	C18:2 (ω6)	2	3,5-21.0
Ac.Linolénico	C18:3 (ω3)	3	≤1.0

Fuente: Reglamento (CE) N° 2205/2003.

Los ácidos grasos saturados en el aceite de oliva, se encuentran en cantidades parecidas o menores a las de otros aceites vegetales, exceptuando el aceite de girasol, colza, cártamo y pepita de uva. (Porrás Piedra y col. pag. 280).

### Ceras

Las ceras son ésteres de alcoholes alifáticos con los ácidos grasos libres, de elevado número de átomos de carbono. La hidrólisis de los triglicéridos aumenta la proporción de ácidos grasos libres, acelerando la reacción.

La determinación de las ceras tiene como objeto evitar fraudes, ya que el contenido en ceras para el aceite de oliva (350 mg/kg) y para el aceite de orujo ( $\geq 350$  mg/kg), es superior al aceite de oliva virgen (250 mg/kg). Sin embargo, no son perjudiciales desde el punto de vista nutricional.

Sus pérdidas durante el proceso de blanqueo son reducidas si lo comparamos con otros componentes menores. (Mariani C. y col. 1992).

### Ésteres de esteroides

Los esteroides también pueden estar presentes en el aceite de oliva en su forma esterificada. Son los ésteres de ácidos grasos con los desmetilesteroides, los 4-metilesteroides y los 4,4-dimetilesteroides con ácidos grasos. (Boskou D., 1998).

### Fosfolípidos

Los fosfolípidos son un tipo de lípidos formados por una molécula de glicerina a la que se le unen dos ácidos grasos (1,2-diacilglicerol) y un grupo fosfato. En el aceite de oliva están presentes en pequeñas cantidades. Estos compuestos son más inestables que los triglicéridos y se oxidan con mayor facilidad.

Los principales fosfolípidos encontrados en el aceite de oliva son: fosfadilcolina, fosfadiletanolamina, fosfatidi-inositol y fosfadilserina. (Boskou D., 1998).

### Fracción insaponificable

Esta fracción representa una pequeña parte de la composición del aceite de oliva (0.5-2%). Los compuestos que la forman son muy importantes para la estabilidad, el

aroma y el sabor del aceite de oliva (Boskou, 1998). La componen hidrocarburos, esteroides, tocoferoles y tocotrienoles (vitamina E), pigmentos (carotenoides y clorofílicos), compuestos fenólicos, compuestos aromáticos y alcoholes alifáticos. La Tabla 1.5 muestra los principales componentes de la fracción del insaponificable, sus concentraciones medias, así como la función asociada a los mismos.

**Tabla 1.5.** Componentes principales de la fracción del insaponificable, sus concentraciones medias y la función asociada a los mismos.

Compuestos	Proporción	Función
<b>Hidrocarburos</b>	32-50% fracción insaponificable.	
Escualeno	1250-7500 mg/kg	Antioxidante
$\beta$ -caroteno	0. 3 y 5 mg/Kg	Antioxidante y coloración Provitamina A
<b>Pigmentos</b>		Coloración
Pigmentos clorofilicos:	1-20 mg/kg	Autooxidación
-clorofilas	0.2-24 mg/kg	y coloración
-feofitinas		
Pigmentos carotenoides	0.5-10 mg/kg expresado como $\beta$ -caroteno.	Antioxidante y coloración
Luteína	>50% del total	Evita la formación de radicales libres
$\beta$ -caroteno	10-20% del total	Provitamina A
Xantofilas	20-30% del total	
<b>Tocoferoles</b>	150-430 mg/kg	Antioxidantes
$\alpha$ -tocoferol	90-95 % del total de tocoferoles	Vitamina E
$\beta$ -tocoferol y	10%	
$\gamma$ -tocoferol		
$\delta$ -tocoferol	Trazas	
<b>Tocotrienoles</b>	Trazas	Antioxidantes
<b>Alcoholes alifáticos</b>	100-200 mg/kg	
<b>Esteroles</b>	800 y 2650 mg/kg	
<u>4<math>\alpha</math>-desmetilesteroles:</u>		
$\beta$ -sitosterol	90-95 % del total	Actividad hipocolesteromiente
Campesterol		
Stigmasterol		
<u>Alcoholes triterpénicos</u>	1000-1500 mg/kg	
<u>Dialcoholes triterpénicos</u> (eritrodiol y uvaol)	100-2000 mg/kg	
<u>4<math>\alpha</math>-metilesteroles</u>	Pequeñas cantidades	
<b>Compuestos fenólicos</b>	50-1000 mg/kg (Expresado como ácido cafeico).	Antioxidante. Influyen en las características organolépticas
<b>Compuestos aromáticos</b>		Aroma. Influyen en las características organolépticas
Alcoholes		
Cetonas		
Ésteres		
Éteres		
Derivados furánicos		
Derivados tiofeno		

### Hidrocarburos

Representan entre un 32 y un 50 % de la fracción insaponificable. Los hidrocarburos mayoritarios en el aceite de oliva son el escualeno y el  $\beta$ -caroteno.

El escualeno es el principal constituyente de la fracción insaponificable, llegando a alcanzar el 40 % del peso total de esta fracción (Boskou, 1998), en concentraciones entre 1250-7500 mg/Kg (Smith, 2000). Pertenece al grupo de los terpenos, es un hidrocarburo poliinsaturado con 6 grupos isoprenoides (sustancias antioxidantes naturales). Es un producto intermedio en la biosíntesis del colesterol, con capacidad para inhibir la actividad de la enzima relacionada en la síntesis del colesterol. El escualeno, se encuentra en mayor proporción en el aceite de oliva que en otros aceites de semilla (Porras, 1995; Mataix y col., 1988).

Se han identificado otros hidrocarburos presentes en el aceite de oliva que contribuyen a conferir sabor y aroma al aceite, pero que no participan de sus cualidades nutritivas (Fedelim, 1977) como parafinas con número par e impar de carbonos, hidrocarburos de cadena ramificada, iso o anteiso, hidrocarburos aromáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (naftaleno, fenantreno, pireno, fluorantreno, etc.), siendo estos últimos, productos de una contaminación.

### Esteroles

Los esteroles son importantes constituyentes no glicéricos, relacionados con la calidad del aceite de oliva, detectando posibles fraudes por la adulteración del aceite de oliva con otros aceites (Cert y col., 1997). La composición de esteroles puede variar dependiendo del grado de maduración de la aceituna en el momento de la recolección (Gutiérrez y col., 1999), de la climatología y el tipo de suelo (Stefanoudaki y col., 2001), de la conservación de la aceituna, de su tratamiento, del almacenamiento del aceite de oliva (Koutsaftakis y col., 2000), y de su localización geográfica (Christopoulou y col., 1996). Estos esteroles se pueden presentar libres o esterificados con ácidos grasos, identificándose en el aceite de oliva más de 40, cuya concentración varía entre 800 y

2650 mg/kg (Jiménez y col., 2001, Kiritsakis y Markakis, 1997). El contenido total de esteroides totales se relaciona con la acidez libre, así, aceites con un alto porcentaje de ácidos grasos libres, presentan alto valor de esteroides totales (Boskou, 1998, Morchio y col., 1987). En el aceite de oliva estos esteroides se clasifican en cuatro grupos: esteroides comunes ( $4\alpha$ -desmetilesteroides),  $4\alpha$ -metilesteroides,  $4,4$ -dimetilesteroides (alcoholes triterpénicos) y dialcoholes triterpénicos.

#### *$4\alpha$ -desmetilesteroides (esteroides comunes)*

Los principales esteroides presentes en este grupo son: el  $\beta$ -sitosterol,  $\Delta$ -5-avenasterol y campesterol. En menor cantidad encontramos: el estignasterol, colesterol,  $24$ -metilen-colesterol,  $\Delta$ -7-campesterol,  $\Delta$ -5,  $23$ -estigmastadienol, clerosterol, sitostanol,  $\Delta$ -5,  $24$ -estigmastadienol,  $\Delta$ -7-estigmastenol y  $7$ -avenastenol. (Boskou D., 1998, Morchio G. R. y col. 1987). El esteroide más abundante en el aceite de oliva, es el  $\beta$ -sitosterol, que constituye el 90-95% del total de los esteroides del aceite con concentraciones que varían entre 200 y 800 mg/kg.

#### *$4\alpha$ -metilesteroides*

Los esteroides  $4$ -monometil son productos intermedios en la biosíntesis del esteroide y en el aceite de oliva se encuentran en pequeñas cantidades. Los principales en el aceite de oliva son el obtusifoliol, gramisterol, cicloeucalenol y citrostadienol. (Boskou D., 1998).

#### *$4,4$ -dimetilesteroides. (Alcoholes triterpénicos)*

Los principales alcoholes triterpénicos presentes en el aceite de oliva son: la  $\beta$ -amirina, butirospermol, cicloartenol y  $24$ -metilencicloartanol. Su concentración varía de 1000 a 1500 mg/100 Kg., siendo su concentración mucho mayor en los aceites de orujo (Boskou, 1998).

### *Dialcoholes triterpénicos*

Los principales dialcoholes triterpénicos del aceite de oliva son eritrodiol y uvaol, con concentraciones que varían de 1 a 20 mg/100g de aceite (Boskou, 1998). Estos compuestos se utilizan para comprobar la autenticidad del aceite de oliva, ya que su contenido es mayor en los aceites de orujo. No obstante, en determinadas variedades como la Verdial de Huelva, son característicos elevados valores de estos parámetros (Aparicio y Harwood, 2003).

El sistema de extracción utilizado influye en el contenido final de alcoholes y dioles triterpénicos, obteniéndose mayores concentraciones en aceites extraídos por presión que en aquellos aceites extraídos por centrifugación en sistemas de tres fases.

### Tocoferoles y tocotrienoles

Lípidos que contienen un anillo aromático sustituido y una cadena lateral hidrocarbonada larga. Existen dos grupos: tocoferoles y tocotrienoles y genéricamente se conocen como vitamina E. Los tocotrienoles presentan un doble enlace más que los tocoferoles en la cadena lateral hidrocarbonada. Estos compuestos están presentes en el aceite de oliva en cantidades muy bajas. Los tocoferoles tienen una gran actividad antioxidante, confiriéndole estabilidad a los aceites frente al proceso de enranciamiento. Existen 4 isómeros:  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y  $\delta$ -tocoferol.

El tocoferol mayoritario, el  $\alpha$ -tocoferol, supone el 90-95% del total de los tocoferoles y el más activo biológicamente como vitamina E. El 10% restante lo constituyen el  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol y en niveles trazas el  $\delta$ -tocoferol (Speek y col., 1985, Fedelli y col., 1993). El  $\gamma$ -tocoferol es el que presenta mayor actividad antioxidante, seguido del  $\beta$ -tocoferol y el  $\alpha$ -tocoferol (Porrás y col., 1995).

La concentración de tocoferoles en el aceite de oliva varía en función de diversos factores como la variedad de la aceituna, el grado de madurez del fruto en el momento de la recolección, (siendo mayor la concentración de tocoferoles en los aceites

obtenidos a principio de campaña), y las condiciones del almacenamiento de la aceituna (Fedelli y Conesi, 1993). Por esta razón, se han obtenido diversas cifras en el contenido de tocoferoles del aceite de oliva virgen que varían entre 150-200 mg/kg (Jiménez y col., 2001), aunque algunos autores han publicado valores de concentraciones entre 240-430 mg/kg (Smith y col., 2000; Owen y col., 2000a).

Al igual que sucede con otros compuestos de la fracción insaponificable, el contenido en tocoferoles se ve notablemente reducido en el proceso de refinado del aceite, sobre todo por evaporación durante la etapa de desodorización. (Fernández y Boatella, 1987), así como en el calentamiento durante la preparación de alimentos (Bonilla y col., 1999).

#### Alcoholes alifáticos

Son alcoholes de cadena lineal con un número de carbonos que oscila entre 18 y 30. Los mayoritarios en el aceite de oliva son docosanol, tetracosanol, hexacosanol, octacosanol. (Boskou D., 1998, Alarcón de la Lastra C. y col. 2001). Su rango de concentración en el aceite de oliva oscila entre 100 y 200 mg/kg, mientras que el tricosenol, el pentacosanol y heptacosanol, se encuentran en el aceite de oliva en trazas. (Tiscornia E. y col. 1982).

Su determinación permite diferenciar los aceites de oliva virgen de los aceites de orujo, ya que la concentración es mayor en aceites extraídos con disolventes. (Civantos L. y col. 1992).

#### Pigmentos

Este grupo de compuestos es el responsable de la tonalidad final del aceite. Está constituido fundamentalmente por pigmentos clorofílicos y carotenoides.

##### *Pigmentos clorofílicos*

Son los responsables del color verde del aceite, formando parte de estos compuestos la clorofila a (color verde-azulado), la clorofila b (color verde-amarillo), así

como las feofitinas a y b (color marrón), procedentes de la degradación de las anteriores. Predomina la feofitina a, cuya concentración puede alcanzar un 70-80% del total. El contenido de clorofilas oscila entre 1 y 10 ppm y feofitinas puede oscilar entre 0.2 y 24 ppm.

El contenido de clorofilas en un aceite obtenido por centrifugación directa es entre un 20-40% mayor que el aceite obtenido por prensas. (De Felice M. y col. 1979). El contenido en clorofilas disminuye con la maduración del fruto.

Las clorofilas pueden producir la fotooxidación del aceite si se expone a la luz, pero actúan como antioxidantes en la oscuridad (Gutiérrez Rosales F. y col. 1992), por esta razón deben protegerse los aceites de la exposición a la luz.

#### *Pigmentos carotenoides*

Los carotenoides son hidrocarburos triterpénicos con propiedades antioxidantes y son responsables de la coloración amarilla de los aceites.

Los carotenoides presentes en el aceite de oliva son: luteína,  $\beta$ -caroteno, violaxantina y neoxantina. (Ranalli A. y col. 1992, Boskou D.1998), con una concentración que puede oscilar entre 0.5 y 10 mg/kg, expresada como  $\beta$ -caroteno. (Porras Piedra A. y col. 1995). La luteína es el carotenoide mayoritario (más del 50 % de la fracción amarilla), seguida del  $\beta$ -caroteno (entre el 10-20%). El resto violaxantina y neoxantina, pertenecen a la fracción minoritaria de xantofilas. (Graciani Constante E. 2006, pp. 153).

El  $\beta$ -caroteno es el único carotenoide del aceite de oliva que pertenece al grupo de los provitamínicos, siendo precursor de la vitamina A (retinol). La concentración de  $\beta$ -caroteno en el aceite de oliva es muy baja y varía entre 0.3 y 5 mg/Kg. (Jiménez J. y col. 2001, Kiritsakis A. y Markakis P. 1987). El contenido del  $\beta$ -caroteno depende de diversos factores como la variedad, las características del cultivo, el manejo de la aceituna desde la recolección, su conservación y los sistemas de extracción. (Porras P. y col. 1995). Al final del periodo de recolección, cuando la aceituna está más madura,

aumenta la concentración de luteína, disminuyendo el contenido en clorofilas. (Minguez-Mosquera M.L. y col. 1991).

### Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos son compuestos orgánicos, en cuyas estructuras moleculares hay al menos un grupo fenol.

Los polifenoles son sustancias solubles en agua, que se encuentran en el mesocarpio de las aceitunas y se transfieren al aceite de oliva virgen durante el proceso de extracción. De todos los aceites de oliva, es en el aceite de oliva virgen, dónde hay un mayor contenido de polifenoles, ya que el proceso de refinado reduce drásticamente su contenido, mostrando importantes pérdidas en sustancias fenólicas simples, en compuestos como la oleuropeína y el ligtrósido, y en lignanos (Owen y col., 2000a). La cantidad de estos compuestos fenólicos en el aceite de oliva virgen varía entre 50 y 500 mg/kg (expresado en ácido cafeico), encontrándose aceites con hasta 1000 mg/Kg (Montedoro y col., 1992). La determinación cuantitativa de los compuestos fenólicos ha sido objeto de diversos estudios (Vázquez y col., 1973 y 1975). Hay diversos factores que influyen en el contenido final de estos compuestos, principalmente la variedad de la aceituna, aunque también va a depender de la procedencia de la aceituna, de las condiciones climatológicas, el tipo de suelo, el estado de maduración de la aceituna en el momento de su recolección, el tipo de almacenamiento y de extracción (Gutfinger y col., 1981; Gimeno y col., 2002).

Los polifenoles son sustancias con gran valor biológico y nutricional, gracias a su actividad antioxidante. Estos compuestos afectan a la estabilidad, a las cualidades organolépticas, confiriéndole un cierto amargor, pungencia y astringencia, así como a las propiedades nutricionales del aceite de oliva, influyendo en su calidad final. Se ha comprobado que aceites con un mayor contenido en polifenoles, tienen mayor estabilidad frente a la oxidación y una mejor calidad (Vázquez y col., 1973 y 1975).

Dentro de los compuestos fenólicos se pueden encontrar diversas formas químicas que dan origen a las distintas familias, entre las que se encuentran:

#### *Ácidos fenólicos*

Como el ácido cafeico, ácido vainílico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido protocatéquico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido ferúlico, ácido cinámico, ácido p-hidroxifenilacético, ácido hidroxicafeico, ácido sinápico, vainillina, ácido o-cumárico (Liberatore y col., 2001).

#### *Alcoholes fenólicos*

Entre los que destacan el tirosol (p-hidroxifeniletanol) y el hidroxitirosol ( $\beta$ -(3,4-dihidroxifenil)-etanol) que son productos derivados de la hidrólisis de la oleuropeína. Se ha observado que las concentraciones de hidroxitirosol y tirosol aumentan proporcionalmente con el grado de madurez de la aceituna (Brenes y col., 1999; Gutiérrez y col., 1999). Otros alcoholes encontrados en el aceite de oliva virgen son el acetato de hidroxitirosol (Mateos y col., 2001), el acetato de tirosol (Brenes y col., 1999) y una forma glucosídica del hidroxitirosol (Carrasco-Pancorbo y col., 2005).

#### *Flavonoides*

Se han encontrado compuestos pertenecientes al grupo de las flavonas como la apigenina, la luteolina (Rovellini y col., 1997; Vázquez y col., 1976; Artajo y col., 2006) y la metoxiluteolina (Rovellini y col., 1997). También se ha demostrado la presencia de un flavonoide perteneciente al grupo de los flavonoles, el (+)-Taxofolin (Carrasco y col., 2004).

#### *Secoroides*

Como la oleuropeína y el ligstrósido. La oleuropeína es el principal glucósido en el aceite de oliva. Es un éster heterosídico del ácido eleanólico con hidroxitirosol (Robards y col., 1999; Vázquez y col., 1961). Es un compuesto hidrosoluble, que se encuentra en la pulpa de la aceituna y es el responsable de su sabor amargo. El

contenido de oleuropeína disminuye al madurar el fruto, convirtiéndose en sus derivados secoiridoideos. Las variedades de frutos pequeños presentan un contenido alto de oleuropeína y bajo de verbascósido, al contrario que las variedades de frutos grandes (Boskou, 1998).

Los secoiridoideos encontrados en el aceite de oliva virgen son: glucósido de la oleuropeína, formas aldehicas y dialdehicas del ácido eleanólico, agliconas de la oleuropeína y el ligstrósido, forma agliconas del ácido elenólico, oleuropeína (Caruso y col., 2000), deacetoxiligstrosido, ligstrosido (Romero y col., 2004; Ríos y col., 2005), forma dialdehídica del ácido elenólico descarboximetilo unido al hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EDA), forma dialdehídica del ácido elenólico descarboximetilo unido al tirosol (p-HPEA-EDA) (Gómez-Alonso y col., 2002; Carrasco y col., 2005).

### ***Lignanos***

Encontramos en el aceite de oliva virgen el (+)-1-acetoxipinoresinol, (+)-pinoresinol, y (+)-1-hidroxipinoresinol (Brenes y col., 2000; Carrasco y col., 2005; Owen, 2000c).

### ***Hidroxi-isocromanos***

Compuestos fenólicos encontrados en el aceite de oliva por Bianco en el año 2002. Los principales son: 1-fenil-6,7-dihidroxi-isocromano y 1-(3´metoxi-4´hidroxi)-fenil-6,7-dihidroxi-isocromano (Bianco y col., 2002; Carrasco y col., 2005).

La tabla 1.6, muestra los principales compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva agrupados por familias.

**Tabla 1.6.** Compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva agrupados por familias.

<b>Fenoles simples:</b>	
Ácido hidroxibenzoico y derivados:	Ácido vainílico, Ácido protocatéquico, Ácido 3,4-dihidroxibenzoico, Ácido 3-hidroxibenzoico, Ácido benzoico, Ácido siríngico, Ácido p- hidroxibenzoico.
ácido hidroxicinámico y derivados:	Ácido o-cumárico, Ácido p-cumárico, Ácido cinámico, Ácido ferúlico, Ácido cafeico, Ácido sinápico.
-otros ácidos:	Ácido 3,4-dihidroxifenilacético, Ácido p-hidroxifenilacético.
<b>Alcoholes fenólicos:</b>	
	Hidroxitirosol, Tirosol, Hidroxitirosol acetato
<b>Aldehidos:</b>	
	Vainillina
<b>Flavonoides:</b>	
Flavonas:	Apigenina, Luteolina, Metoxiluteolina
Flavonoles:	(+)-Taxofolin
<b>Secoroides:</b>	
	Glucósido de la oleuropeína, Forma aldehídica del ácido elenólico, Forma dialdehídica del ácido elenólico, Forma aldehídica del ligstrosido, Forma dialdehídica de la aglucona del ligstrosido, Forma aldehídica de la oleuropeinaaglucona, Dimetiloleuropeina, Oleuropeina, Deacetoxioleuropeina, 10-hidroxioluropeina, ácido elenólico, Ligstrosido, Diacetoxiligstrosido, Forma dialdehídica del ácido elenólicodescarboximetilo unido al hidroxitirosol (3,4-DHPEA-EDA), Forma dialdehídica del ácido elenólico, Descarboximetilo unido al tirosol(P-HPEA-EDA).
<b>Lignanós:</b>	
	(+)-1- acetoxipinoresinol, (+)-pinoresinol, (+)-1-hidroxipinoresinol
<b>Hidroxi- isocromanos:</b>	
	1-fenil-6,7-dihidroxi-isocromano 1-(3´ metoxi-4´hidroxi)fenil-6,7-dihidroxi-isocromano

### Compuestos volátiles

Los compuestos volátiles son los responsables del aroma del aceite de oliva, por lo tanto, están muy relacionados con sus características sensoriales, afectando a su calidad final.

En el aceite de oliva se han identificado un gran número de compuestos químicos: hidrocarburos alifáticos y aromáticos, alcoholes alifáticos y triterpénicos,

aldehídos, cetonas, ésteres, éteres, fenoles y sus derivados furanos y tiofenos, responsables del flavor (sabor y olor) de ese aceite. (Kiritsakis A. K. 1993, Boskou, D. 1998, Pp 67-103), siendo los compuestos alifáticos C6 (aldehídos, alcoholes y ésteres) los más abundantes en el aceite de oliva virgen, influyendo tanto en la percepción de aromas agradables (aromas a fruta de aceituna, manzana, fruta madura, fruta verde, hoja o hierba verde, higuera, la almendra, el tomate...), como el 2-hexenal y 2-hexenal-Z, (Skizas T. y col. 2001), así como en los aromas relacionados con los defectos sensoriales (atrojado, áspero, avinado, rancio, avinagrado, agrio, capacho, mohoso, pepino, tierra o viejo, metálico) destacando los aldehidos 2-hexenal-E, 2-heptenal-Z, 2-decenal-Z, octanal, nonanal y pentanal

Son muchos los factores que intervienen en el sabor y el aroma final de un aceite como la variedad, el grado de madurez del fruto (a mayor madurez, menor contenido de compuestos aromáticos, especialmente la fracción aldehídica C6), el tiempo de almacenamiento, las condiciones climatológicas y del cultivo, (Morales M.T. y col. 1996), el riego (la cantidad de aldehídos C6 y alcoholes C6 disminuyen, incrementando las notas sensoriales verdes y frutadas en detrimento de las notas amargas), el tiempo y la temperatura de batido, (se pierden compuestos si la temperatura es superior a los 30°, especialmente de la fracción aldehídica C6) (Gómez-Rico y col. 2008). En los procesos de refinación del aceite, estos compuestos se pierden de forma drástica, especialmente durante la etapa de desodorización (Civantos L. y col. 1999).

### **1.5. Trazabilidad del aceite de oliva**

La trazabilidad alimentaria se define como la capacidad de rastrear un alimento desde su origen hasta el consumidor, y es, por tanto, una herramienta fundamental al servicio de la calidad alimentaria. Muchos de los compuestos y elementos que forman parte de un alimento son, en consecuencia, susceptibles de ser sometidos a un proceso de trazabilidad mediante diversas técnicas analíticas y pueden ser utilizados como marcadores de trazabilidad. El concepto de trazabilidad es, desde 2005, una necesidad ya que las empresas tienen que identificar y rastrear todos sus productos a

través de la cadena alimentaria con una legislación y control que se aplica estrictamente. La metodología analítica, sin embargo, va retrasada respecto a la trazabilidad administrativa y es necesario desarrollar sistemas que garanticen que los marcadores de los diversos estadios en el vida de un alimento puedan ser rastreados de forma sencilla y eficaz. El objetivo fundamental es, obviamente, la protección al consumidor en materia de seguridad alimentaria.

Las reiteradas peticiones de los consumidores respecto a la identificación geográfica de los alimentos ha dado fruto en una normativa de la Comunidad Europea (U.E, 2006) que regula el etiquetado de productos alimentarios, el aceite de oliva entre ellos, basados en indicaciones geográficas como la Designación de Origen Protegida (DOP). Esta normativa está ciertamente relacionada con la trazabilidad geográfica ya que asegura las expectativas de los consumidores y genera una mejor protección del aceite de oliva virgen de diversas zonas oleícolas con particularidades organolépticas frente a falsificaciones o etiquetados confusos. Los aceites de oliva dentro del régimen de una DOP alcanzan un alto precio en el mercado y están, por tanto, expuestos a fraudes (Cosio y col., 2006). Esta regulación no sugiere, sin embargo, procedimientos analíticos que permitan verificar la información descrita en la etiqueta. En consecuencia, la declaración geográfica del aceite de oliva virgen no es controlada con parámetros físico-químicos y, en la mayoría de los casos el control es exclusivamente administrativo.

La importancia que tiene el aceite de oliva desde un punto de vista económico y de cara al consumidor – el aceite de oliva constituye la fuente de ingresos básica de aproximadamente 2,7 millones de familias, de las cuales unos 2 millones viven en el sur de Europa – explica que la investigación en temas relacionados con la caracterización y autenticación geográfica haya sido un tema recurrente en grupos de investigación de los principales países productores desde los años 80 (Forina y Tiscornia, 1982; Tsimidou y Macrae, 1987; Aparicio, 1988; Aparicio y col., 1994; Aparicio 2000; Vlavo y col., 2001; Salvador y col., 2001; Zunin y col., 2005; López Feria y col., 2008; Tena y col., 2007; Oueslati y col., 2009; Ocakoglu y col., 2009).

El creciente número de solicitudes de DOPs (Rui Alves y col., 2005; García-González y col., 2006; Olivier y col., 2006) - por un lado - y el previsto incremento exponencial de la producción mundial debido a los cultivos superintensivos - por otro - han disparado el interés por la protección de las zonas oleícolas con especiales peculiaridades de excelencia. Los controles burocráticos para conceder DOPs se han endurecido, hasta el punto que recientemente se ha rechazado dos solicitudes españolas (aún en fase de alegaciones), y los aceites provenientes de cultivos superintensivos (“aceites industriales”) amenazan con expulsar del mercado a los “aceites tradicionales” y a las zonas oleícolas de pequeña producción que, generalmente, poseen una limitada capacidad de competencia en precio (Aparicio, 2007). La respuesta a esta pinza formada por la avalancha de una producción de bajo precio y homogéneo perfil organoléptico, y la necesidad de buscar un nicho comercial para aceites típicos de zonas oleícolas tradicionales sólo se puede encontrar en la búsqueda de la excelencia a través del estudio de la zona productora y la composición química de su aceite.

La composición química del aceite de oliva es bien conocida desde hace tiempo y han sido numerosos los estudios enfocados a estudiar los componentes mayoritarios y minoritarios que lo forman. El soporte necesario para conseguir el rastreo de un alimento sólo se consigue basándose en tres puntos fundamentales:

- Conocimiento completo y exhaustivo de todo el proceso.
- Conocimiento de los factores que afectan a su alteración, almacenamiento y distribución.
- Conocimiento de las metodologías analíticas y quimiométricas necesarias para llevar a cabo la determinación de aquellos analitos que puedan servir como marcadores.

Todo ello abordado desde un punto de vista pluridisciplinar con participación de diferentes técnicas analíticas, información de diferentes compuestos, y aplicación de

procedimientos quimiométricos capaces de extraer la información adecuada y de combinarla de forma precisa para poder realizar el seguimiento de la trazabilidad integral del producto final.

Diversas técnicas para análisis de aceite, en combinación con análisis estadístico multivariante (MSA), se han utilizado para asegurar la trazabilidad y la autenticidad de los aceites de oliva que determinan los parámetros físico – químicos tales como ácidos grasos (Alonso Garcia y Aparicio Lopez , 1993 ; Bucci, Magri , Magri , Marini, y Marini, 2002 ; Forina y Tiscornia, 1982 ; Stefanoudaki, Kotsifaki, y Koutsaftakis , 1999; Tsimidou, Macrae , y Wilson, 1987, esteroides ( Leardi Y Paganuzzi , 1987 ), composición fenólica (Petrakis PV y col, 2008; Lerma-García MJ y col, 2009; Ocakoglu D, Tokatli F, Ozen B, Korel F, 2009; Ouni Y y col, 2011; Allalout y col., 2009; Andejelkovic y col., 2008; Ocakoglu y col., 2009; Ana F. Vinha y col, 2005; Derya Alkan, Figen Tokatli, Banu Ozen, 2012) , compuestos volátiles (Eirini Pouliarekoua y col, 2011; C. Pizarro y col, 2011; Nooshin Araghypour y col, 2008; Concepción Cerrato Oliveros el al, 2011; Debora Tura y col, 2013; Z. Haddia 2008; Ouni Youssef y col, 2011; Paola Zunin el al 2005), técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (F. Longobardi y col, 2012; Marco D’Imperio y col, 2007; Serge Rezzi y col, 2005).

Los aceites crudos fabricados sin refinar, tales como los aceites de oliva virgen extra, podrían contener cantidades relativamente altas de metales traza. De hecho, uno de los criterios de calidad más importantes de aceite de oliva virgen extra es su contenido de metal. Es importante supervisar y controlar la presencia de estos elementos para preservar el alto valor nutricional y la alta calidad organoléptica de este producto. La presencia de elementos traza en los aceites vegetales comestibles puede ser debido a la composición del suelo y la contaminación del medio ambiente y la contaminación durante los procesos de extracción y de conservación (Benincasa, Lewis, Perri, Sindona, y Tagarelli, 2007; Matos & Campos, 2006).

La concentración de estos elementos es un criterio importante para la evaluación de su calidad en lo que se refiere a la frescura, mantenimiento de sus propiedades y

almacenamiento (Matos & Campos, 2006). Las trazas de metales, entre otros factores como la presencia de oxígeno, la exposición a la luz y el tiempo de almacenamiento, deben estar bajo control para reducir la oxidación del aceite. El proceso de oxidación cambia tanto los componentes mayoritarios como los minoritarios del aceite de oliva virgen. Muchos informes han descrito los efectos deletéreos que ciertos elementos traza tales como Fe, Cu, Mn y Ni, tienen en el sabor y la estabilidad oxidativa de los aceites, con un efecto catalítico sobre el mecanismo de autooxidación (Choe y Min, 2006; Matos & Campos, 2006; Paz y Molero, 2000).

Se puede suponer que la distribución de elementos traza en los aceites de oliva vírgenes varía en función de su origen geográfico y, a continuación, se puede suponer que un tratamiento estadístico adecuado de los datos de elementos traza podría permitir una caracterización geográfica de los diferentes aceites de oliva vírgenes (Benincasa y col., 2007; Zeiner, Juranovic-Cindric, y Skevin, 2010). El Análisis de elementos traza también juega un papel importante como base para la detección de la adulteración de aceite y control de calidad del aceite (Marfil y col, 2008; Llorent-Martínez, Ortega-Barrales, Fernándezde Córdoba, Domínguez-Vidal, y Ruiz-Medina, 2011).

Los métodos de espectrometría atómica de llama y espectrometría de absorción atómica en horno de grafito (F-AAS y GF-AAS), así como acoplado inductivamente de emisión óptica de plasma y espectrometría de masas (ICP-OES e ICP-MS), se pueden utilizar para las determinaciones de metales en muestras de aceites (Ieggli, Bohrer, Do Nascimento, y de Carvalho, 2011; Mendil, Uluözlü, Tüzen, y Soylak, 2009; Zhu, Ventilador, Wang, Qu, y Yao, 2011; Anthemidis, Arvanitidis, y Stratis, 2005).

Sin embargo, la determinación de elementos traza en aceites comestibles es difícil debido a su baja concentración en la muestra, requiriendo métodos instrumentales sensibles. Además, su alta viscosidad hace que sea difícil introducir la muestra en el instrumento, y el alto contenido orgánico de la matriz de aceite aumenta la posibilidad de interferencias durante el análisis. Por ejemplo el método de

determinación directa por dilución con un disolvente orgánico apropiado, seguido por aspiración directa en una absorción atómica de llama o una unidad de excitación espectrometría ICP a veces no es lo suficientemente sensible. En la mayoría de los casos, el método de análisis muestra los cambios en la potencia de excitación por medios orgánicos en comparación con disoluciones acuosas (Tserovsky, y Arpadjan, 1991). Además, la calibración es más difícil en medios orgánicos (Boumans, 1987). Para superar estas dificultades, se usan diferentes procedimientos de preparación de muestras: digestión húmeda o seca, digestión por microondas, y se requieren algunos métodos de extracción y dilución, a fin de eliminar el contenido orgánico de la muestra antes de su análisis (Juranovic y col, 2003; Mendil. y col., 2009; Sahan, Basoglu, y Gucer, 2007; Ansari y col, 2009).

La composición de esteroides del aceite de oliva puede considerarse similar a una huella dactilar, por lo que es una herramienta muy útil para detectar la adulteración o para determinar la autenticidad.

Entre los componentes menores de los aceite de oliva virgen extra, los fitoesteroides (esteroides vegetales) constituyen la mayor proporción de la fracción no saponificable (Lagarda, Garca Llatas, y Farre, 2006). Estos compuestos son componentes bioactivos que ocurren en todas las grasas y aceites vegetales, que pertenecen a la "triterpeno" familia de compuestos naturales. Los esteroides son productos de la ruta de biosíntesis de isoprenoides, siendo los desmetilesteroides predominantes en aceites vegetales (Martínez-Vidal, Garrido-Frenich, Escobar- García, y Romero-González, 2007).

Su cuantía total depende de las especies de plantas (Segura-Carretero y col., 2008) y puede variar según las condiciones agronómicas y climáticas, los procedimientos de extracción y refinación, condiciones de almacenamiento, tipo de aceite de oliva (virgen extra, virgen, refinado, etc.) y diferente variedad genética de las aceitunas utilizadas para producir el aceite (Lerma-García, Concha-Herrera, Herrero-Martínez, y Simó-Alfonso, 2009). En aceites de oliva virgen extra,  $\beta$ -sitosterol es el

principal esteroles; otros esteroles menores incluyen  $\Delta^5$ -avenasterol, campesterol y estigmasterol. El eritrodiol dialcoholes triterpénicos y uvaol también están presentes en EVOOs (Blanch, Villén, y Herraiz, 1998; Alarcón de la Lastra, Barranco, Motilva, y Herrerías, 2001).





## **CAPÍTULO 2.**

### **Objetivos**



El objetivo de este trabajo es implementar el concepto de trazabilidad integral en una región productora de aceite de oliva, a través del estudio de la trazabilidad geográfica y sensorial de los aceites de oliva virgen extra producidos en esta provincia.

Para llevar a cabo este trabajo, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- ✿ Caracterizar la composición elemental de todas las muestras de suelos, alperujos y aceites por ICP-MS e ICP-OES recogidas en la zona de trabajo.
- ✿ Establecer la correlación entre la composición elemental de los aceites, orujos y suelos con su origen geográfico.
- ✿ Caracterizar el contenido en ácidos grasos, esteroides, eritrodol y uvaol de todas las muestras de aceite de la zona de estudio elegidas para este fin, por cromatografía de gases.
- ✿ Correlacionar los contenidos de ácidos grasos, esteroides, eritrodol y uvaol de los aceites estudiados con su origen geográfico.
- ✿ Caracterizar el contenido de los compuestos volátiles y fenólicos de los distintos aceites mediante cromatografía de gases y cromatografía de líquida de alta resolución.
- ✿ Relacionar el contenido de los compuestos volátiles y fenólicos con el origen geográfico de cada muestra.





# **CAPÍTULO 3.**

***Parte Experimental***



### 3.1.- Muestras

El Plan de Muestreo consistió en la localización, caracterización y distribución de muestras, lo que concluyó con la toma de muestras de suelos, aceites y alperujos de cuatro zonas de la provincia de Huelva: Beas, Gibraleón, Niebla y Sanlúcar del Guadiana, como se muestra en la Figura 3.1.



Figura 3.1. Zona de muestreo.

Se tomaron un total de 216 muestras, 91 de aceites de las tres variedades predominantes en la zona (Verdial, Picual y Arbequina), 91 muestra de sus alperujos respectivos y 34 de suelos de las distintas parcelas seleccionadas en las zonas de trabajo. La procedencia, variedad así como el código de identificación de las muestras se recogen en las Tablas 3.1, 3.2 y 3.3. La Figura 3.2. muestra un resumen del muestreo realizado en cada zona.

Una vez recogidas las muestras y almacenadas convenientemente a la espera de su análisis, se procedió a la puesta a punto de distintos procedimientos para el tratamiento de las mismas, atendiendo al tipo de análisis al que serían sometidas en su momento.

### MUESTREO ACEITES Y ORUJOS

			Total muestras
Sanlúcar de Gadiana	Picual	→ 8 A + 8 O + 4 S	20
	Arbequina	→ 11 A + 11 O + 4 S	26
Niebla	Picual	→ 6 A + 6 O + 4 S	16
	Arbequina	→ 21 A + 21 O + 4 S	46
Beas	Picual	→ 10 A + 10 O + 4 S	24
	Arbequina	→ 10 A + 10 O + 4 S	24
	Verdial	→ 10 A + 10 O + 4 S	24
Gibraleón	Picual	→ 5 A + 5 O + 2 S	12
	Arbequina	→ 5 A + 5 O + 2 S	12
	Verdial	→ 5 A + 5 O + 2 S	12

A: Aceites; O: Orujos; S: Suelos

**TOTAL MUESTRAS = 216 (91 Aceites + 91 Orujos + 34 suelos)**

Figura 3.2. Distribución del muestreo general.

Tabla 3.1.- Características de la muestras de aceites.

Nº de muestra	Procedencia	Variedad	Código interno
1	Niebla	Arbequina	A-1
2	Niebla	Arbequina	A-2
3	Niebla	Arbequina	A-3
4	Niebla	Arbequina	A-4
5	Niebla	Arbequina	A-5
6	Niebla	Arbequina	A-6
7	Niebla	Arbequina	A-7
8	Niebla	Arbequina	A-8
9	Niebla	Arbequina	A-9
10	Niebla	Arbequina	A-10
11	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	A-11
12	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	A-12
13	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	A-13
14	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	A-14
15	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	A-15
16	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	A-16
17	Beas	Arbequina	A-17
18	Beas	Arbequina	A-18
19	Beas	Arbequina	A-19
20	Beas	Arbequina	A-20
21	Beas	Arbequina	A-21
22	Beas	Arbequina	A-22
23	Beas	Arbequina	A-23
24	Beas	Arbequina	A-24
25	Beas	Arbequina	A-25
26	Beas	Arbequina	A-26
27	Beas	Picual	A-27
28	Beas	Picual	A-28
29	Beas	Picual	A-29
30	Beas	Picual	A-30
31	Beas	Picual	A-31
32	Beas	Picual	A-32

**Tabla 3.1.-** (Continuación) Características de la muestras de aceites.

<b>Nº de muestra</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Variedad</b>	<b>Código interno</b>
33	Beas	Picual	A-33
34	Beas	Picual	A-34
35	Beas	Picual	A-35
36	Beas	Picual	A-36
37	Niebla	Arbequina	A-37
38	Niebla	Arbequina	A-38
39	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	A-39
40	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	A-40
41	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	A-41
42	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	A-42
43	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	A-43
44	Niebla	Arbequina	A-44
45	Niebla	Arbequina	A-45
46	Niebla	Arbequina	A-46
47	Niebla	Arbequina	A-47
48	Niebla	Arbequina	A-48
49	Niebla	Arbequina	A-49
50	Niebla	Arbequina	A-50
51	Niebla	Arbequina	A-51
52	Niebla	Arbequina	A-52
53	Sanlúcar de Guadiana	Picual	A-53
54	Sanlúcar de Guadiana	Picual	A-54
55	Sanlúcar de Guadiana	Picual	A-55
56	Sanlúcar de Guadiana	Picual	A-56
57	Sanlúcar de Guadiana	Picual	A-57
58	Sanlúcar de Guadiana	Picual	A-58
59	Sanlúcar de Guadiana	Picual	A-59
60	Sanlúcar de Guadiana	Picual	A-60
61	Niebla	Picual	A-61
62	Niebla	Picual	A-62
63	Niebla	Picual	A-63
64	Niebla	Picual	A-64
65	Niebla	Picual	A-65

Tabla 3.1.- (Continuación) Características de la muestras de aceites.

<b>Nº de muestra</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Variedad</b>	<b>Código interno</b>
66	Niebla	Picual	A-66
67	Gibraleón	Verdial	A-67
68	Gibraleón	Verdial	A-68
69	Gibraleón	Verdial	A-69
70	Gibraleón	Verdial	A-70
71	Gibraleón	Verdial	A-71
72	Gibraleón	Arbequina	A-72
73	Gibraleón	Arbequina	A-73
74	Gibraleón	Arbequina	A-74
75	Gibraleón	Arbequina	A-75
76	Gibraleón	Arbequina	A-76
77	Gibraleón	Picual	A-77
78	Gibraleón	Picual	A-78
79	Gibraleón	Picual	A-79
80	Gibraleón	Picual	A-80
81	Gibraleón	Picual	A-81
82	Beas	Verdial	A-88
83	Beas	Verdial	A-89
84	Beas	Verdial	A-90
85	Beas	Verdial	A-91
86	Beas	Verdial	A-92
87	Beas	Verdial	A-93
88	Beas	Verdial	A-94
89	Beas	Verdial	A-95
90	Beas	Verdial	A-96
91	Beas	Verdial	A-97

Tabla 3.2.- Características de la muestras de orujos.

<b>Nº de Muestras</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Variedad</b>	<b>Código interno</b>
1	Niebla	Arbequina	O-1
2	Niebla	Arbequina	O-2
3	Niebla	Arbequina	O-3
4	Niebla	Arbequina	O-4
5	Niebla	Arbequina	O-5
6	Niebla	Arbequina	O-6
7	Niebla	Arbequina	O-7
8	Niebla	Arbequina	O-8
9	Niebla	Arbequina	O-9
10	Niebla	Arbequina	O-10
11	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	O-11
12	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	O-12
13	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	O-13
14	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	O-14
15	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	O-15
16	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	O-16
17	Beas	Arbequina	O-17
18	Beas	Arbequina	O-18
19	Beas	Arbequina	O-19
20	Beas	Arbequina	O-20
21	Beas	Arbequina	O-21
22	Beas	Arbequina	O-22
23	Beas	Arbequina	O-23
24	Beas	Arbequina	O-24
25	Beas	Arbequina	O-25
26	Beas	Arbequina	O-26
27	Beas	Picual	O-27
28	Beas	Picual	O-28
29	Beas	Picual	O-29
30	Beas	Picual	O-30
31	Beas	Picual	O-31
32	Beas	Picual	O-32

Tabla 3.2.- (Continuación) Características de la muestras de orujos.

<b>Nº de Muestras</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Variedad</b>	<b>Código interno</b>
33	Beas	Picual	O-33
34	Beas	Picual	O-34
35	Beas	Picual	O-35
36	Beas	Picual	O-36
37	Niebla	Arbequina	O-37
38	Niebla	Arbequina	O-38
39	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	O-39
40	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	O-40
41	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	O-41
42	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	O-42
43	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	O-43
44	Niebla	Arbequina	O-44
45	Niebla	Arbequina	O-45
46	Niebla	Arbequina	O-46
47	Niebla	Arbequina	O-47
48	Niebla	Arbequina	O-48
49	Niebla	Arbequina	O-49
50	Niebla	Arbequina	O-50
51	Niebla	Arbequina	O-51
52	Niebla	Arbequina	O-52
53	Sanlúcar de Guadiana	Picual	O-53
54	Sanlúcar de Guadiana	Picual	O-54
55	Sanlúcar de Guadiana	Picual	O-55
56	Sanlúcar de Guadiana	Picual	O-56
57	Sanlúcar de Guadiana	Picual	O-57
58	Sanlúcar de Guadiana	Picual	O-58
59	Sanlúcar de Guadiana	Picual	O-59
60	Sanlúcar de Guadiana	Picual	O-60
61	Niebla	Picual	O-61
62	Niebla	Picual	O-62

Tabla 3.2.- (Continuación) Características de la muestras de orujos.

<b>Nº de Muestras</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Variedad</b>	<b>Código interno</b>
63	Niebla	Picual	O-63
64	Niebla	Picual	O-64
65	Niebla	Picual	O-65
66	Niebla	Picual	O-66
67	Gibraleón	Verdial	O-67
68	Gibraleón	Verdial	O-68
69	Gibraleón	Verdial	O-69
70	Gibraleón	Verdial	O-70
71	Gibraleón	Verdial	O-71
72	Gibraleón	Arbequina	O-72
73	Gibraleón	Arbequina	O-73
74	Gibraleón	Arbequina	O-74
75	Gibraleón	Arbequina	O-75
76	Gibraleón	Arbequina	O-76
77	Gibraleón	Picual	O-77
78	Gibraleón	Picual	O-78
79	Gibraleón	Picual	O-79
80	Gibraleón	Picual	O-80
81	Gibraleón	Picual	O-81
82	Beas	Verdial	O-82
83	Beas	Verdial	O-83
84	Beas	Verdial	O-84
85	Beas	Verdial	O-85
86	Beas	Verdial	O-86
87	Beas	Verdial	O-87
88	Beas	Verdial	O-88
89	Beas	Verdial	O-89
90	Beas	Verdial	O-90
91	Beas	Verdial	O-91

Tabla 3.3.-Características de la muestras de suelos.

Nº de Muestra	Procedencia	Variedad	Muestreo a	Código de Muestreo
1	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	30 cm	T1
2	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	60 cm	T2
3	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	30 cm	T3
4	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	60 cm	T4
5	Sanlúcar de Guadiana	Picual	30 cm	T5
6	Sanlúcar de Guadiana	Picual	60 cm	T6
7	Sanlúcar de Guadiana	Picual	30 cm	T7
8	Sanlúcar de Guadiana	Picual	60 cm	T8
9	Niebla	Arbequina	30 cm	T9
10	Niebla	Arbequina	60 cm	T10
11	Niebla	Arbequina	30 cm	T11
12	Niebla	Arbequina	60cm	T12
13	Niebla	Picual	30 cm	T13
14	Niebla	Picual	60 cm	T14
15	Niebla	Picual	30 cm	T15
16	Niebla	Picual	60 cm	T16
17	Beas	Arbequina	30 cm	T17
18	Beas	Arbequina	60 cm	T18
19	Beas	Arbequina	30 cm	T19
20	Beas	Arbequina	60 cm	T20
21	Beas	Picual	30 cm	T21
22	Beas	Picual	60 cm	T22
23	Beas	Picual	30 cm	T23
24	Beas	Picual	60 cm	T24
25	Beas	Verdial	30 cm	T25
26	Beas	Verdial	60 cm	T26
27	Beas	Verdial	30 cm	T27
28	Beas	Verdial	60 cm	T28
29	Gibraleón	Arbequina y verdial	30 cm	T29
30	Gibraleón	Arbequina y verdial	60 cm	T30
31	Gibraleón	Picual	30 cm	T31
32	Gibraleón	Picual	60 cm	T32

### 3.2.- Reactivos, disoluciones y materiales

#### 3.2.1.- Determinación de la composición elemental de los suelos, alperujos y aceites

- 🌿 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> traceSelect (for trace analysis) FLUKA ref. 16911.
- 🌿 HCl 30% Suprapur (Merck).
- 🌿 HNO<sub>3</sub> 65% Suprapur (Merck).
- 🌿 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> Suprapur (Merck).
- 🌿 HF 40% Suprapur (Merck).
- 🌿 Reactor de PTFE/PFA, 60 mL (Saville, Eden Prairie, MN).

#### 3.2.2.- Determinación del perfil en ácidos grasos

- 🌿 Tubos con tapón de rosca.
- 🌿 Filtros PVDF de 25 mm de diámetro y 0,45 µm de poro.
- 🌿 Nitrógeno, hidrógeno y aire. Air Liquid. AlphaGaz.
- 🌿 Metanol (Merck).
- 🌿 Hexano (Panreac).
- 🌿 Hidróxido potásico: KOH >85% (Sigma Aldrich).
- 🌿 Disolución metanólica de hidróxido potásico 2 N.
- 🌿 El patrón de referencia es una mezcla de ésteres metílicos de una grasa de composición conocida (Panreac).

Todos los reactivos utilizados fueron de calidad cromatográfica.

#### 3.2.3.- Determinación de esteroides

- 🌿 Balanza analítica Gram Precisión modelo ST-100.

- ✿ Rotavapor Büchi R-200.
- ✿ Matraz de 250 mL provisto con refrigerante de reflujo con juntas esmeriladas.
- ✿ Embudos de decantación de 500 mL.
- ✿ Matraces 250 mL.
- ✿ Matraz cónico para vacío de 50 mL.
- ✿ Cubeta de desarrollo ranurada con tapa (Panreac).
- ✿ Batería de placas calefactoras (P-Selecta<sup>®</sup>).
- ✿ Placa 25 TLC Platex 20 x 20 cm, silicagel 60 (Merck).
- ✿ Pulverizador eléctrico para revelar las placas.
- ✿ Estufa de desecación con regulación automática de temperatura (P-Selecta<sup>®</sup>).
- ✿ Lámpara ultravioleta con una longitud de onda de 366 o 254 nm. (Panreac).
- ✿ Microjeringa de 10  $\mu$ L para cromatografía de gases (Hamilton).
- ✿ Nitrógeno, hidrógeno y aire (Air Liquid. AlphaGaz).
- ✿ 5 $\alpha$ -colestano-3 $\beta$ -ol (SigmaAldrich).
- ✿ Patrón interno: Se preparó una disolución de 2000 ppm de 5 $\alpha$ -colestano-3 $\beta$ -ol (sigma), pesando, 2 g del mismo y llevándolo a hasta 200 mL con cloroformo.
- ✿ Acetona para cromatografía (Panreac).
- ✿ Cloroformo (Panreac).
- ✿ Etanol 96% (v/v) (Panreac).
- ✿ Éter etílico (Panreac).

- ✿ Éter isopropílico (Panreac).
- ✿ Colesterol.
- ✿ Eritrodiol.
- ✿ n-Hexano (Panreac).
- ✿ Rodamina 6G (Sigma-Aldrich) al 0.001% en alcohol etílico del 90%.
- ✿ Reactivo silanzante: silan-sterol-1-CG (Panreac).
- ✿ Disolución etanólica de hidróxido potásico 2 N: se disuelven a la vez que se enfrían 130 gramos de hidróxido potásico en 20 mL de agua destilada y 800 mL de metanol.

#### **3.2.4.- Determinación de fenoles**

- ✿ Balanza analítica de Gram Precisión modelo ST-100.
- ✿ Filtros nylon de 13 mm de diámetro y 0,45  $\mu\text{m}$  de poro.
- ✿ Vortex (HeidolphReax top, modelo AC-230).
- ✿ Metanol (Panreac).
- ✿ Ácido acético glacial (Panreac).
- ✿ Ácido gálico (riqueza~ 99%). (Riedel de Hæn).
- ✿ Hidroxitirosol (riqueza~98%). Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica de la Universidad de Sevilla.
- ✿ Tirosol (riqueza  $\geq$  97%). (Fluka).
- ✿ Ácido vainílico (riqueza $\geq$ 97%). (Fluka).
- ✿ Ácido cafeico (riqueza ~ 97%). (Fluka).
- ✿ Vainillina (riqueza  $\geq$  98%). (Fluka).

- 🌿 Ácido p-cumárico (riqueza  $\geq$  98%). (Fluka).
- 🌿 Ácido o-cumárico (riqueza  $\geq$  97%). (Fluka).
- 🌿 Oleuropeína. (Extrasyntese).
- 🌿 Ácido sinápico (riqueza  $\geq$ 99%). (Fluka).
- 🌿 Rutina (riqueza  $\geq$  95%). (Sigma-Aldrich).
- 🌿 Luteolina (riqueza  $\geq$ 99%). (Extransyntese).
- 🌿 Apigenina (riqueza  $\geq$  99%). (Extransyntese).

### 3.2.5.- Determinación de compuestos volátiles

- 🌿 Octano (Dr. Ehrenstrofer).
- 🌿 Acetato de metilo (Fluka).
- 🌿 E-2-octeno (Sigma Aldrich).
- 🌿 Butanal (Sigma Aldrich).
- 🌿 Acetato de etilo (Dr. Ehrenstrofer).
- 🌿 2-butanona (Dr. Ehrenstrofer).
- 🌿 3-metilbutanal (Dr. Ehrenstrofer).
- 🌿 Etanol (Merck).
- 🌿 3-pentanona (Fluka).
- 🌿 Pentanal (Sigma Aldrich).
- 🌿 4-metil-2-pentanona (Dr. Ehrenstrofer).
- 🌿 1-penten-3-ona (Fluka).
- 🌿 2-butanol (Fluka).
- 🌿 Tolueno (Sigma Aldrich).

- ✿ Hexanal (Fluka).
- ✿ 2-metil-1-propanol (Dr. Ehrenstrofer).
- ✿ E-2-pentenal (Sigma Aldrich).
- ✿ 1-butanol (Sigma Aldrich).
- ✿ 1-pentel-3-ol (Alfa Aesar).
- ✿ Heptanal (Sigma Aldrich).
- ✿ Limoneno (Fluka).
- ✿ 2-metil-1-butanol (Sigma Aldrich).
- ✿ E-2-hexenal (TCI Europenv).
- ✿ 3-octanona (Dr. Ehrenstrofer).
- ✿ Acetato de hexilo (Fuka).
- ✿ 2-octanona (Dr. Ehrenstrofer).
- ✿ Octanal (Sigma Aldrich).
- ✿ E-2-heptenal (TCI Europenv).
- ✿ 6-metil-5-hepten-2-ona (TCI Europenv).
- ✿ 1-hexanol (Dr. Ehrenstrofer).
- ✿ Z-3-hexen-1-ol (Alfa Aesar).
- ✿ Ac. Acético (Sigma Aldrich).
- ✿ Ac. Propiónico (Sigma Aldrich).
- ✿ Ac. Butanoico (TCI Europenv).
- ✿ Ac. Pentanoico (Fluka).
- ✿ Ac. Hexanoico (Fluka).

🌿 Ac. Heptanoico (Sigma Aldrich).

🌿 Ac. Octanoico (Fluka).

🌿 Ac. Nonanoico (Fluka).

### 3.3.- Instrumentación

🌿 Microondas AntonParr Multiwave 3000 SOLV (AntonPaar, Austria, Europa).

🌿 ICP-OES HoribaJobinYvon Ultima 2 (HORIBA Scientific, Kyoto, Japan).

🌿 ICP-MS Agilent 7700X Model G3281A (Agilent Technologies, Ca, USA).

🌿 Cromatógrafo de gases Agilent 6890N (Agilent Technologies, Ca, USA), equipado con un inyector split-splitless y un detector de ionización de llama (FID).

🌿 Cromatógrafo de líquidos Agilent serie 1100 (Agilent Technologies, Ca, USA), equipado con una columna Ultrabase C18 2.5 $\mu$ m, (100 mm  $\times$  mm de diámetro interno), un inyector automático y un detector de diodo array (DAD).

🌿 Cromatógrafo de gases Varian 3900 (Varian, Walnut Creek, CA) equipado con una columna DB (J&W Scientific, Folsom, CA; 60 m x 0.25 mm de diámetro x 0.25  $\mu$ m de espesor), con un detector de ionización de llama (FID).

🌿 Cromatógrafo de gases GC8000 (Carlo Erba, Milano, Italia) acoplado a un detector de ionización de llama (FID).

### 3.4.- Métodos

Se han determinado los siguientes parámetros:

🌿 La composición elemental de los suelos, alperujos y aceites mediante ICP-OES e ICP-MS.

🌿 El perfil fenólico por cromatografía líquida de alta resolución, HPLC-DAD y porUHPLC-ESI-MS/MS

✿ La composición de los ácidos grasos, esteroides totales y dialcoholes triterpénicos: eritrodol y uvaol, siguiendo la metodología descrita en el Reglamento nº 2568/91 de la CEE del 11 de julio de 1991, y en sus posteriores modificaciones.

✿ La determinación de los compuestos volátiles por cromatografía de gases.

### **3.4.1.- Determinación de la composición elemental de los suelos, alperujos y aceites**

#### **Digestión de los suelos**

Se pesó 0.1 g de cada muestra en reactores de teflón y se le añadieron 8 mL de HF y 3 mL de HNO<sub>3</sub>, se cerraron los reactores y se calentaron a 90°C en una placa calefactora durante 24 h. A continuación, se evaporaron los ácidos calentando a 130°C a presión atmosférica, se le añadieron nuevamente 3 mL de HNO<sub>3</sub> y se volvieron a colocarlos reactores cerrados en la placa a 90°C durante 12 h. Una vez transcurrido este tiempo, se evaporó el ácido y se añadieron 3 mL de HCl, se cerraron las bombas y se volvieron a poner en la placa a 90°C, dejándolas durante 12 h. Por último, una vez evaporado el ácido, se recuperó el digerido al 2% HNO<sub>3</sub> con agua ultrapura en matraces de 100 mL, añadiéndole previamente 5 µg/L de Rh como patrón interno.

#### **Preparación y digestión de los alperujos**

Las muestras de alperujo se congelaron y se liofilizaron en un equipo liofilizador Cryodos 80 (Telstar, Tarrasa, España) a -80 °C. Posteriormente se realizaron dos digestiones sucesivas mediante microondas, para disolver los alperujos liofilizados.

Para la primera digestión se pesaron 0.20g de alperujo liofilizado y se le añadieron 5 mL de ácido nítrico al 65%, 1 mL de peróxido de hidrógeno al 30%, 1 mL de ácido fluorhídrico al 40% y 1 mL de ácido clorhídrico al 30%. Se realizó una rampa de temperatura durante 12 minutos hasta alcanzar 210°C y 40 bares de presión, manteniendo estas condiciones durante 20 min.

En la segunda digestión, al residuo de la digestión anterior, se le añadieron 6 mL de ácido bórico y en este caso se realizó una rampa de temperatura de 5 minutos hasta llegar a 210°C y 40 bares de presión, manteniéndose estas condiciones durante 15 minutos con un nivel ventilación mínimo. Finalmente, la muestra se ventiló durante 15 minutos.

Una vez digeridas las muestras se diluyeron en 25 mL con agua ultrapura, añadiéndole previamente 5 µg/L de Rh como patrón interno.

### **Preparación y digestión de los aceites**

Para el análisis elemental, se realizó una digestión ácida asistida por microondas. La digestión se llevó a cabo con 0,5 g de la muestra, añadiéndole 5 mL de ácido nítrico al 65% v/v, 3 mL de peróxido de hidrógeno al 30% v/v, y 1 mL de ácido clorhídrico. Los parámetros de operación del microondas AntonPaar fueron en primer lugar, una rampa de 15 minutos hasta alcanzar 280 °C y 80 bares de presión que se mantuvo durante 20 minutos con nivel mínimo de ventilación, y a continuación, las muestras fueron ventiladas durante 15 minutos.

Finalmente, se añadió 5 µg/L de Rh, como estándar interno, y se diluyeron a 25 mL con agua ultrapura.

### **Análisis elemental de suelos, alperujos y aceites.**

Se utilizaron dos técnicas instrumentales para la determinación de la composición elemental.

El análisis de Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ti se realizó mediante espectroscopía de emisión atómica con plasma de acoplamiento Inductivo (ICP-OES HoribaJobinYvon Ultima 2).

Las condiciones de funcionamiento del equipo se detallan en la Tabla 3.4.

**Tabla 3.4.** Condiciones de funcionamiento para el espectrómetro ICP –OES

<b>Condiciones del Plasma</b>	
Potencia de RF	1.0 kW
Flujo de Ar (Plasma)	12 L/min
Flujo de Ar (Auxiliar)	0.0 L/min
Flujo del gas coetina	0.2 L/min
Flujo del gas de nebulización	0.76 L/min
Flujo de entrada de muestra	1mL/min
Presión del gas de nebulización	3.0 bar
Tiempo de estabilización	10 s
Calibraciónmultinivel	Linear 1-50 mg/L

Mediante espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) se determinaron los elementos Sb, As, Ba, Be, Bi, Cs, Zn, Co, Cu, Cr, Sc, Sn, Sr, Ga, Ge, Hf, Li, Mo, Nb, Ni, Pb, Rb, Se, Tl, Ta, Th, U, V, W, Y, y Zr, empleándose un equipo de Agilent TechnologiesG3281A, series 7700 X, con las condiciones de funcionamientos recogidas en la tabla 3.5.

**Tabla3.5.** Condiciones de funcionamiento para el espectrómetro ICP -MS

<b>Condiciones del Plasma</b>	
Potencia de RF	1.5 kW
Flujo de Ar (Plasma)	15 L/min
Flujo de Ar (Auxiliar)	0.9 L/min
Flujo de Ar (Portador))	1.1 L/min
Profundidad de la muestra	9.0 mm
Temperatura de la Interfase	2 °C
Flujo de de la muestra	400 µL/min
<b>Instrumento</b>	
Cono de muestreo	Niquel
ConoSkimmer	Niquel
Calibraciónmultinivel	Linear 1-200 µg/L

## Validación del Método

La validación constituye el proceso a partir del cual se pone de manifiesto que un método analítico posee unas características de funcionamiento adecuadas a una aplicación determinada.

La validación del método analítico incluye la estimación de parámetros tales como la precisión, linealidad, límite de detección y límite de cuantificación.

La precisión del método, expresada como repetitividad (en el mismo día) y reproducibilidad (entre días) en términos de desviación estándar relativa (%RSD) se evaluó para cada elemento en la disolución estándar a concentraciones de 10 µg/L para el ICP-MS y de 10 mg/L para el ICP-OES.

Como se muestra en la Tabla 3.6, los valores de %RSD para la repetitividad y la reproducibilidad fueron menores al 0.6% para el ICP-MS.

Los valores de repetitividad para el ICP-OES estuvieron comprendidos fundamentalmente en el intervalo del 0.7 al 6.5%, mientras que para la reproducibilidad el intervalo estuvo entre el 1.5 y 5.7%, como se recoge en la Tabla 3.7.

La linealidad de los métodos se estudió mediante la medida de disoluciones estándar a nueve niveles de concentración. El intervalo lineal (µg/L), el coeficiente de correlación ( $r^2$ ), las ecuaciones de las rectas, los valores de repetitividad y reproducibilidad, y los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para cada elemento se detallan en la Tabla 3.4. Para calcular los LOD y LOQ, se utilizó un método estadístico (Anderson, 1989; Armbruster et al., 1994) basado en las siguientes ecuaciones:

$$\text{LOD} = 3 \times S_b / m \quad (\text{eq. 1})$$

$$\text{LOQ} = 10 \times S_b / m \quad (\text{eq. 2})$$

Donde  $S_b$  es la desviación estándar de la recta de calibrado y  $m$  es la pendiente de la misma.

Los límites de detección fueron consistentemente por debajo de 0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la mayor parte de los elementos, que van desde 0.0002 del Manganeso hasta 0.6292  $\mu\text{g}/\text{ml}$  del Zinc, mientras que los límites de cuantificación fueron de 0.0028 del aluminio al 2.0952  $\mu\text{g}/\text{m}$  del Zinc.

**Tabla 3.6.-** Curva de regresión lineal, coeficiente de correlación, repetitividad, reproducibilidad, límite de detección y límite de cuantificación de los elementos determinados por ICP-MS

Elementos	Recta de calibrado	%RSD, 10 $\mu\text{g}/\text{L}$			LOD ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )
		$d^a$	$R^b$	$r^2$		
Arsénico (As)	$y=4,02\text{E-}03x+5,84\text{E-}04$	0,24	0,37	1,0000	0,0475	0,1581
Bario (Ba)	$y=7,87\text{E-}03x+8,20\text{E-}04$	0,36	0,54	0,9999	0,1123	0,3739
Cesio (Cs)	$y=5,82\text{E-}02x+4,48\text{E-}04$	0,32	0,21	0,9998	0,0217	0,0721
Cobalto (Co)	$y=5,57\text{E-}02x+7,85\text{E-}04$	0,16	0,18	0,9999	0,0175	0,0583
Cobre (Cu)	$y=2,98\text{E-}02x+3,87\text{E-}03$	0,25	0,21	0,9998	0,0709	0,2362
Cromo (Cr)	$y=4,84\text{E-}03x+4,68\text{E-}04$	0,31	0,28	1,0000	0,0487	0,1622
Escandio (Sc)	$y=2,93\text{E-}02x+ 2,57\text{E-}03$	0,29	0,27	0,9999	0,0131	0,0436
Estaño (Sn)	$y=2,09\text{E-}02x+3,34\text{E-}04$	0,3	0,2	1,0000	0,0239	0,0990
Galio (Ga)	$y=2,11\text{E-}02x+3,75\text{E-}04$	0,28	0,23	0,9997	0,0233	0,0777
Hafnio (Hf)	$y=3,68\text{E-}02x+2,05\text{E-}04$	0,4	0,33	1,0000	0,0187	0,0621
Litio (Li)	$y=2,60\text{E-}04x+5,13\text{E-}06$	0,41	0,4	1,0000	0,0171	0,0569
Molibdeno (Mo)	$y=1,41\text{E-}02x+3,24\text{E-}03$	0,41	0,39	0,9997	0,1450	0,4828
Niobio (Nb)	$y=6,81\text{E-}02x-6,88\text{E-}05$	0,23	0,22	1,0000	0,0198	0,0658
Níquel (Ni)	$y=1,26\text{E-}02x+5,94\text{E-}02$	0,18	0,34	0,9997	0,4078	1,3581
Plomo (Pb)	$y=4,95\text{E-}02x+1,07\text{E-}02$	0,29	0,33	0,9999	0,0358	0,1192
Rubidio (Rb)	$y=3,46\text{E-}02x+4,94\text{E-}04$	0,25	0,22	0,9999	0,0187	0,0624
Selenio (Se)	$y=5,63\text{E-}04x+2,82\text{E-}04$	0,34	0,36	0,9999	0,1797	0,5985
Tántalo (Ta)	$y=1,39\text{E-}01x+6,95\text{E-}04$	0,37	0,45	0,9997	0,0121	0,0402
Torio (Th)	$y=8,61\text{E-}02x+5,85\text{E-}04$	0,25	0,24	1,0000	0,0202	0,0671
Uranio (U)	$y=9,73\text{E-}02x+1,03\text{E-}03$	0,2	0,26	1,0000	0,0224	0,0746
Vanadio (V)	$y=3,69\text{E-}02x+7,63\text{E-}04$	0,31	0,26	0,9999	0,0327	0,1088
Wolframio (W)	$y=3,41\text{E-}02x+2,83\text{E-}03$	0,46	0,41	1,0000	0,021	0,0724
Ytrio (Y)	$y=7,03\text{E-}02x+5,49\text{E-}04$	0,26	0,18	0,9999	0,0240	0,0800
Zinc (Zn)	$y=6,36\text{E-}03x+1,12\text{E-}02$	0,21	0,4	0,9997	0,6292	2,0952
Zirconio (Zr)	$y=4,54\text{E-}02x+1,59\text{E-}03$	0,54	0,36	0,9999	0,0387	0,1290

**Tabla 3.7.-** Curva de regresión lineal, coeficiente de correlación, repetitividad, reproducibilidad, límite de detección y límite de cuantificación de los elementos determinados por ICP-OES.

Elementos	Recta de calibrado	%RSD, 10 µg/L			LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)
		d <sup>a</sup>	R <sup>b</sup>	r <sup>2</sup>		
Aluminio (Al)	y = 101882,2x + 26049,5	1,91	1,78	0,9999	0,0008	0,0028
Calcio (Ca)	y = 1926218,2x + 181289,4	6,44	5,47	0,9998	0,0028	0,0092
Hierro (Fe)	y = 85005x + 20850,5	0,67	4,11	0,9996	0,0009	0,0030
Potasio (K)	y = 8520,6x - 867,2	2,79	5,70	0,9999	0,0048	0,0161
Magnesio (Mg)	y = 569346,1x + 56499,6	2,65	3,60	0,9997	0,0017	0,0055
Manganeso (Mn)	y = 483689,2x + 79760,5	1,49	4,06	0,9998	0,0002	0,0007
Sodio (Na)	y = 2260848,7x + 178404,8	5,16	4,90	0,9998	0,0088	0,0293
Titanio (Ti)	y = 6730568,2x + 1074519,4	1,31	1,46	0,9996	0,0037	0,0124

### 3.4.2.- Determinación del perfil en ácidos grasos

La determinación analítica de los ácidos grasos se realizó mediante cromatografía de gases, previa transformación de los mismos a ésteres metílicos, utilizando una columna capilar polar para separar estos ésteres metílicos, en función de su temperatura de ebullición y polaridad (Myher y Kuksis, 1995). La determinación analítica de los ácidos grasos se realizó siguiendo el Anexo X del Reglamento CEE 2568/91.

La esterificación se llevó a cabo en un tubo provisto con tapón de rosca, se pesó aproximadamente 0.1 g de muestra de aceite, se añadió 2 mL de hexano y se agitó en el vórtex durante 1 minuto. A continuación se añadió 0.2 mL de la disolución metanólica 2 N de hidróxido potásico, se tapó y se agitó durante 30 s. Se dejó reposar hasta que la disolución quedó clara, separándose la fase acuosa de la orgánica. Se recuperó 1mL de la fase hexanólica en un vial de 1.5 mL, que posteriormente fue analizada mediante cromatografía de gases. Los esteres metílicos (0.1 mL) fueron inyectados en un cromatógrafo de gases (Cromatógrafo de gases Agilent 6890 N) equipado con un inyector split- splitless y un detector de ionización de llama (FID). La separación de los componentes se realizó utilizando una columna RTX-2330de 60 metros x, 0.25 mm x 0.2 µm de tamaño de poro. La temperatura del inyector y

detector se fijó en 250°C. La temperatura inicial del horno mantenida durante 19 minutos fue de 165 °C. Se aplicó una rampa de temperatura de 5 °C/min durante 25 minutos, hasta alcanzar 200 °C. Para la limpieza de la columna entre muestras, se elevó la temperatura a 210°C. Se utilizó helio como gas portador a una velocidad de flujo de 45 mL/min.

### ***Validación del método cromatográfico***

El material de referencia utilizado para la validación del método está compuesto por aceite de oliva virgen con pequeñas cantidades de otros aceites vegetales (Anexo I). Los valores de incertidumbre son fijados para un intervalo de confianza del 95%.

### ***Exactitud***

Para la estimación de la exactitud, como se puede observar en la Tabla 3.8, se compara la composición de ácidos grasos del material de referencia certificado con los resultados obtenidos en el laboratorio después de realizar 6 replicados de dicho material. Cuando se aplica el test t Student a la composición de ácidos grasos, se cumple la hipótesis nula (no hay diferencia estadísticamente significativa entre la composición de los ácidos grasos), al nivel de significancia del 5%.

Tabla 3.8. Exactitud del método utilizando un material de referencia.

Ácidos grasos	Media±desviación estándar <sup>(a)</sup>	Media± desviación estándar <sup>(b)</sup>	t calculada	t tabulada
Ácido Palmítico	11± 0.16	10.96± 0.15	0.72	2.45
Ácido Palmitoleico	0.8± 0.02	0.84± 0.07	1.50	2.45
Ácido Margárico	0.1± 0.001	0.08± 0.03	2.17	2.45
Ácido Margaroleico	0.12± 0.003	0.12± 0.01	0.43	2.45
Ácido Esteárico	3.2± 0.04	3.19± 0.04	0.75	2.45
Ácido Oleico	77.2± 0.19	77.4± 0.19	2.04	2.45
Ácido Linoleico	6.1± 0.03	5.92± 0.10	2.19	2.45
Ácido Araquídico	0.4± 0.02	0.49± 0.09	2.29	2.45
Ácido Linolénico	0.6± 0.03	0.55± 0.06	2.08	2.45
Ácido Gadoleico	0.3± 0.02	0.27± 0.04	2.12	2.45
Ácido Behénico	0.1± 0.009	0.12± 0.03	1.82	2.45
Ácido Lignocérico	0.06± 0.005	0.06± 0.01	0.31	2.45

<sup>(a)</sup> Media± desviación estándar del material de referencia certificado (Panreac).

<sup>(b)</sup> Media± desviación estándar, obtenidos tras aplicar la metodología propuesta al aplicarlo al material de referencia.

### Precisión

Para evaluar la repetitividad y reproducibilidad del método se realizaron seis determinaciones en un mismo día y tres determinaciones durante cinco días respectivamente, utilizando el material de referencia. Los resultados expresados como % de desviación estándar relativa (%RSD) para áreas de los picos cromatográficos se muestran en la Tabla 3.9. Como se puede observar, se obtiene una alta repetitividad con valores de RSD en las áreas inferiores al 1.74% (ácido mirístico), mientras que para la reproducibilidad se observa una mayor dispersión en las áreas, presentando unos valores entre el 0.03% del ácido oleico y el 5.55% del ácido margárico.

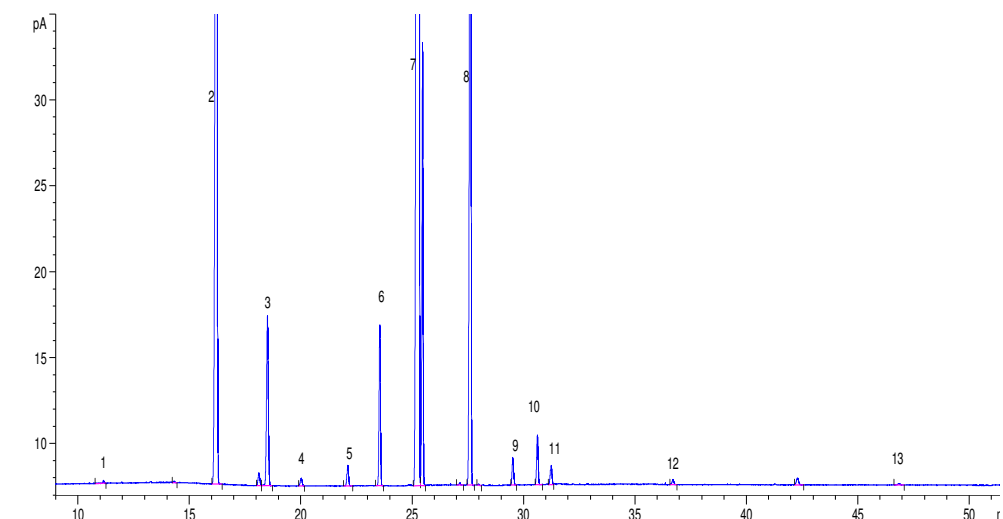
Tabla 3.9. Precisión del método expresada como %RSD.

Ácidos grasos	Repetitividad (n=6)	Reproducibilidad (n=15)
Ácido Palmítico	0.27	0.48
Ácido Palmitoleico	0.81	1.03
Ácido Margárico	0.70	5.55
Ácido Margaroleico	1.25	1.36
Ácido Esteárico	0.14	0.44
Ácido Oleico	0.03	0.06
Ácido Linoleico	0.26	0.56
Ácido Araquídico	0.93	0.87
Ácido Linolénico	0.21	1.58
Ácido Gadoleico	0.34	5.02
Ácido Behénico	0.52	1.64
Ácido Lignocérico	0.88	1.49

#### ***Aplicación del método cromatográfico a un material de referencia***

Con las condiciones cromatográficas descritas en el apartado 3.4.2., se logra una buena resolución de los compuestos estudiados (Tabla 3.7).

En la Figura 3.3 se muestra el cromatograma correspondiente al material de referencia obtenido con las condiciones cromatográficas elegidas, siendo el orden de elución de los esteres metílicos de los ácidos grasos, de menor a mayor peso molecular. La Tabla 3.10 señala los tiempos de retención obtenidos para los distintos compuestos.



**Figura 3.3.** -Cromatograma correspondiente al material de referencia.  
Identificación de los picos en la Tabla 3.10.

**Tabla 3.10.-** Características cromatográficas de los ácidos grasos separados.

Ácidos grasos	Pico	$t_R$ (minutos)
Ac. Mirístico	1	11.0
Ac. Palmítico	2	16.2
Ac. Palmitoleico	3	18.5
Ac. Margárico	4	20.1
Ac. Margaroleico	5	22.1
Ac. Esteárico	6	23.6
Ac. Oleico	7	25.4
Ac. Linoleico	8	27.6
Ac. Araquídico	9	29.6
Ac. Linolénico	10	30.7
Ac. Gadoleico	11	31.3
Ac. Behénico	12	36.8
Ac. Lignocérico	13	46.9

### 3.4.3.- Determinación de esteroides y eritrodiol y uvaol

La determinación de los esteroides, del eritrodiol y uvaol se realiza siguiendo los procedimientos del anexo V del Reglamento CEE/2568/91 de la Comisión de las Comunidades Europeas.

La determinación de los esteroides se realiza por cromatografía de gases, utilizando una columna capilar para la separación de los trimetilsililéter obtenidos a partir de los ésteres por pretratamiento de la muestra.

Los esteroides, el eritrodiol y el uvaol fueron determinados después de la saponificación en caliente de 5 g de muestra de aceite con una disolución de hidróxido de potasio en etanol. Después de la ebullición, se añadió agua y la fracción insaponificable se extrajo con tres porciones de éter dietílico y las fracciones de éter dietílico fueron lavadas con agua de 3 a 5 veces hasta que la solución de lavado fue neutra. La fase de éter dietílico fue posteriormente secada con sulfato de sodio anhidro, y el residuo evaporado y redisolto en 2 mL de cloroformo. La banda correspondiente a la fracción esteróica fue separada del extracto por TLC (ALUGRAM® SIL G/UV234, 0,20 mm, 20 x 20 cm). La banda correspondiente a los esteroides se visualizó bajo luz UV, después de ser rociada con una disolución etanólica de 2,7-diclorofluoresceína al 0,2%, la banda fue raspada con una espátula, y los esteroides fueron extraídos con éter dietílico. El extracto se evaporó hasta sequedad y los esteroides fueron derivatizados a sus trimetilsililéteres (TMS) con 200 µL de una mezcla de hexametildisilazano, y dimetilclorosilano en piridina (3:1:9) (Supelco, Bellefonte, USA), que se dejó reaccionar durante 15 minutos y posteriormente fue centrifugado. La separación de los TMS se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases con detector de ionización de llama (Agilent 6890 N), equipado con una columna capilar HP-5MS (5% fenil 95% dimetilpolisiloxano), 25 m x 0.25 mm x 0.25 µm (Agilent Technology). La inyección se realizó con una relación de división de flujo (split ratio) 1:50 y a flujo constante de 1,0 mL/min (usando helio como gas portador). Las temperaturas del inyector y detector fueron 300 y 290°C, respectivamente. La temperatura de la columna fue de 270°C y se mantuvo en isoterma durante 30 minutos. Bajo las condiciones empleadas, el 5 $\alpha$ -colestano-3 $\beta$ -ol (P.I) eluyó a 9,85 minutos y el  $\beta$ -

sitosterol a 14,55 minutos. La identificación de los picos se llevó a cabo mediante el cálculo de los tiempos de retención relativos a  $\beta$ -sitosterol, el esteroles mayoritario en el aceite de oliva y la cuantificación utilizando 5 $\alpha$ -colestano-3 $\beta$ -ol como patrón interno siguiendo el procedimiento descrito por el Reglamento de la Comunidad Europea (2011), para el análisis de esteroides en el aceite de oliva.

#### 3.4.4.- Determinación de fenoles mediante HPLC-DAD

##### Extracción de la fracción fenólica

500 miligramos de aceite se extrajeron con 0.5 mL de mezcla de metanol/agua (80:20, v / v) en un tubo de reacción Eppendorf de 2 mL. La mezcla resultante se agitó en un vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a 13400 rpm durante 5 minutos. La fase metanólica se pasó por un filtro de nylon de 0.45  $\mu$ m de tamaño de poro y 13 mm de diámetro. Se tomaron 150  $\mu$ L del extracto y se diluyeron hasta 500  $\mu$ L de agua ultrapura. Se agitó en el vórtex para homogeneizar la extracción metanólica (30:70 v,v, MeOH:H<sub>2</sub>O) y se inyecta en el HPLC. (Pizarro et al, 2012).

La Figura 3.4 muestra el esquema de este método para facilitar la comprensión del mismo.

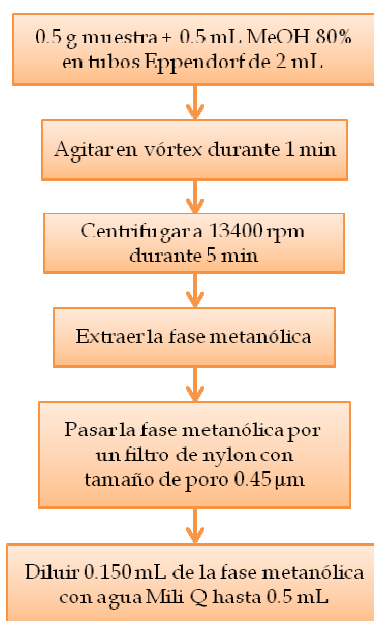


Figura 3.4.-Esquema del método de micro extracción líquido-líquido de fenoles individuales.

### Análisis cromatográfico de fenoles

Para obtener una óptima separación de los compuestos fenólicos, se aplicó un gradiente de fases a una columna Ultrabase C18 2.5 $\mu$ m, (100 mm  $\times$  mm de diámetro interno). El gradiente utilizado con la fase A (agua/metanol/ácido acético, 93:5:2, v/v/v) y la fase B (agua/metanol/ácido acético, 17:81.3:1.7, v/v/v) se muestra en la Tabla 3.11.

Tabla 3.11. Gradiente de fases móviles del HPLC-DAD.

Tiempo (min)	% A	% B
0	100	0
2	100	0
13	60	40
17	60	40
19	30	70
20	0	100
22	0	100
24	100	0

El flujo fue de 1 mL/min y la columna se mantuvo a 20 °C. El volumen inyectado fue de 100  $\mu$ L. La detección se realizó mediante un escaneo en el rango de 190 a 700 nm. La cuantificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo utilizando los valores de las áreas obtenidas a 280 nm para el ácido gálico, hidroxitirosol, tirosol, ácido vainílico, ácido cafeico, vainillina, ácido o-cumárico y oleuropeína, a 320 nm para el ácido p-cumárico y ácido sinápico, y a 360 nm para la rutina, luteolina y apigenina.

Los ensayos cuantitativos fueron obtenidos usando curvas de calibración externas para todos los estándares fenólicos. Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se expresaron como valores medios.

### Separación cromatográfica

El principio para la elección de las condiciones de trabajo es mejorar la separación así como acortar el tiempo de análisis. Usando el programa de gradiente descrito en el

apartado anterior, se logra una buena separación de los 12 compuestos fenólicos estudiados, con un tiempo de análisis de 24 minutos. Las Figuras 3.5, 6 y 7, muestran los cromatogramas correspondientes a una mezcla de patrones obtenidos con estas condiciones cromatográficas a 280, 320 y 360 nm. Como se observa, el perfil de elución es el típico de un sistema de fase reversa donde los compuestos más polares (ejemplo, los ácidos fenólicos) eluyen primero seguidos por aquellos de polaridad decreciente. Así, el orden de elución sería ácidos benzoicos < ácidos cinámicos < flavonoides. Los resultados muestran que los ácidos eluyen en los primeros 15 minutos, mientras que los flavonoides debido a su mayor hidrofobicidad requieren mayor concentración de metanol para su elución y eluyen después de 15 minutos.

La Tabla 3.12 muestra los tiempos de retención, la longitud de onda seleccionada para la detección y cuantificación de los compuestos fenólicos separados.

**Tabla 3.12.-**Características cromatográficas de los compuestos fenólicos separados.

Compuestos fenólicos	Pico	$\lambda$ (nm)	$t_R$ (minutos)
Ác. Gálico	1	280	2,3
Hidroxitirosol	2	280	4,0
Tirosol	3	280	6,5
Ác. Vainílico	4	280	8,2
Vainillina	6	280	10,0
p-cumárico	7	320	11,5
o-cumárico	8	280	15,0
Rutina	9	360	15,5
Oleuropeina	10	280	17,3
Luteolina	11	360	21,1
Apigenina	12	360	21,7

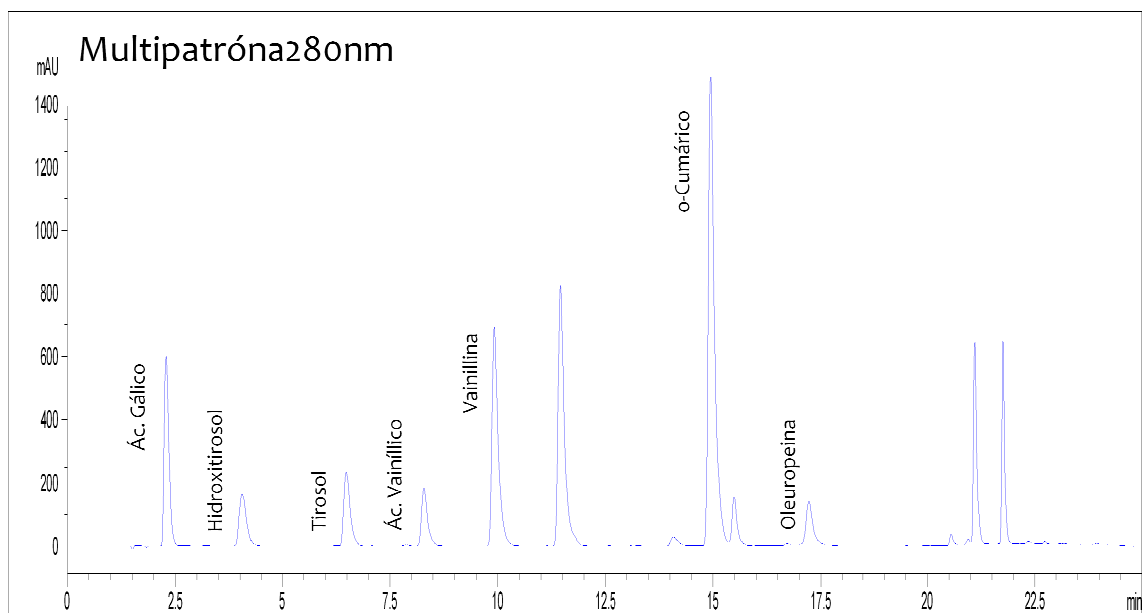


Figura 3.5.- Cromatograma de la mezcla de patrones a 280 nm.

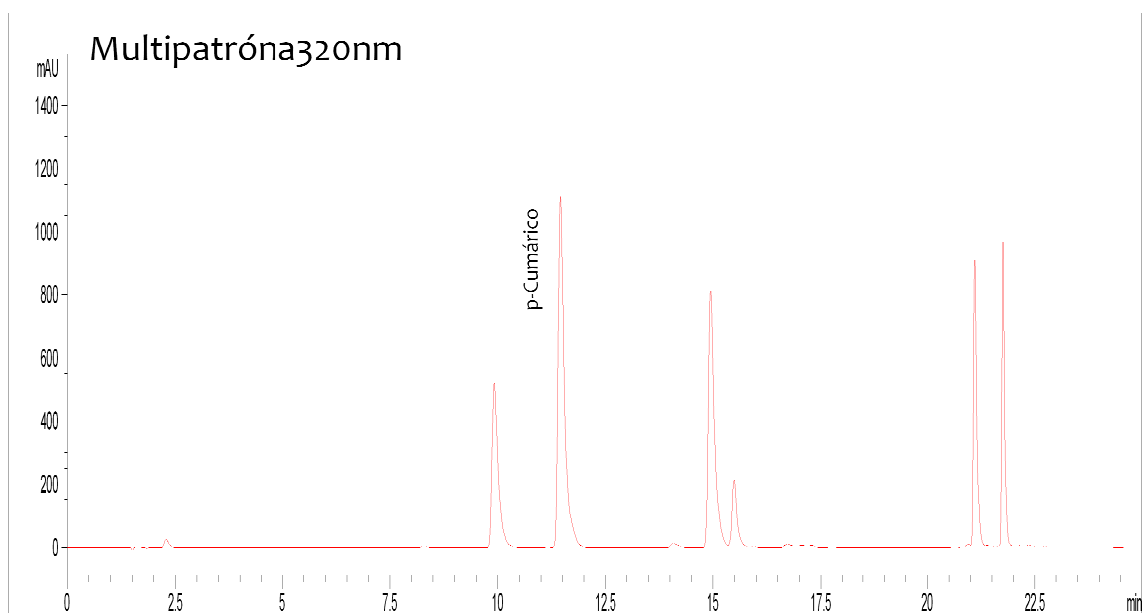


Figura 3.6.- Cromatograma de la mezcla de patrones a 320 nm.

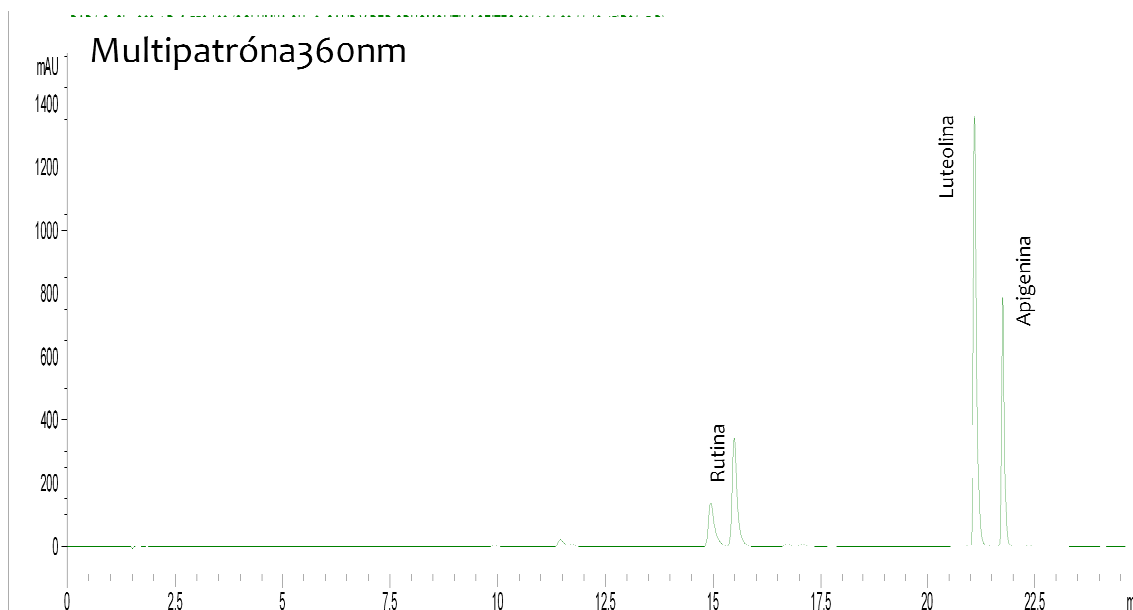


Figura 3.7.- Cromatograma de la mezcla de patrones a 360nm.

### Método cromatográfico.

#### Precisión

La precisión evalúa la dispersión de los resultados que se obtienen al realizar medidas replicadas sobre una misma muestra.

Para evaluar la repetitividad y reproducibilidad del método se realizaron seis determinaciones en un mismo día y tres determinaciones en cinco días diferentes, respectivamente, utilizando muestras de aceite de oliva refinado dopado a dos concentraciones.

Los resultados expresados como desviación estándar relativa (RSD) para áreas de los picos cromatográficos se muestran en la Tablas 3.13-14, obteniéndose unos valores que oscilan entre 0.06% para p-cumárico y 2.24% para la oleuropeina, en el caso de la repetitividad, y entre el 2.31% de la oleuropeina y el 3.50% del ácido cafeico, para la reproducibilidad, para la concentraciones altas y entre 0.14% para p-cumárico y 2.60% para ácido gálico, en el caso de la repetitividad, y entre el 1.80% del ácido cafeico y el 4.56% del ácido gálico, para la reproducibilidad, para la concentraciones bajas.

**Tabla 3.13.**-Precisión del método expresada como % RSD para altas concentraciones.

Compuestos fenólicos	Repetitividad (n=5)	Reproducibilidad (n=5)
Ác. Gálico	0,12	2,91
Hidroxitirosol	0,40	2,87
Tirosol	0,17	3,27
Ác. Vainílico	0,92	3,24
Vainillina	0,42	3,30
Ác. p-cumárico	0,06	2,82
Ác. o-cumárico	0,71	2,71
Oleuropeina	2,24	2,31
Rutina	0,09	2,34
Luteolina	1,34	2,31
Apigenina	1,06	3,33

**Tabla 3.14.**-Precisión del método expresada como % RSD para bajas concentraciones.

Compuestosfenólicos	Repetitividad (n=5)	Reproducibilidad (n=5)
Ác. Gálico	2,60	4,56
Hidroxitirosol	0,32	2,98
Tirosol	0,29	4,75
Ác. Vainílico	0,73	5,31
Vainillina	0,23	3,63
Ác. p-cumárico	0,14	4,00
Ác. o-cumárico	1,03	2,33
Oleuropeina	1,18	2,98
Rutina	0,33	4,35
Luteolina	0,90	3,14
Apigenina	0,28	2,79

### Linealidad

La representación gráfica de las áreas de los picos frente a la concentración, da lugar a la obtención de respuestas lineales en el rango de trabajo estudiado. La Tabla 3.15 muestra los resultados obtenidos para 8 niveles distintos de concentración de cada patrón de los compuestos fenólicos estudiados. La linealidad es buena para todos los analitos, con unos ajustes superiores a 0.9992.

Los límites de detección (LOD) y de cuantificación (LQD) se calcularon a partir de los datos de regresión lineal como aquellas concentraciones que conducen a respuestas que difieren tres y diez veces, respectivamente de la señal del blanco, divididos por la pendiente de la recta de calibrado (Skoog y Leary, 1994). La Tabla 3.12 muestra los valores de LOD y LQD obtenidos para cada uno de los compuestos fenólicos.

Tabla 3.15.- Curvas de regresión, rango lineal, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LQD).

Compuestos fenólicos	Ecuación de regresión	R <sup>2</sup>	Rango de concentración (ppm)	LD (ppm)	LQ (ppm)
Ác. Gálico	$y=59.66857x-0.33803$	0.99976	0.09-35	0.04	0.15
Hidroxitirosol	$y=14.7056x+0.15323$	0.99979	0.08-50	0.06	0.20
Tirosol	$y=16.69993x+1.22989$	0.99957	0.2-80	0.13	0.45
Ác. Vainíllico	$y=51.86514x-1.44756$	0.99928	0.09-35	0.08	0.26
Vainillina	$y=125.64862x-7.18113$	0.99926	0.09-35	0.08	0.26
Ác.p-cumárico	$y=179.50698x+1.76607$	0.99931	0.09-35	0.08	0.26
Ác.o-cumárico	$y=175.39619x-10.44677$	0.99902	0.09-35	0.09	0.30
Oleuropeina	$y=6.86123x-0.31464$	0.99980	0.2-80	0.09	0.31
Rutina	$y=47.99358x-3.91517$	0.99932	0.09-35	0.08	0.26
Luteolina	$y=116.16467x-4.70774$	0.99914	0.09-35	0.08	0.27
Apigenina	$y=83.16533x-2.28821$	0.99920	0.09-35	0.08	0.27

### 3.4.5.- Determinación de fenoles mediante UHPLC-ESI-MS/MS

La rapidez del análisis y mejora de la eficiencia, así como la reducción de los costes del mismo siempre es deseable en cualquier aplicación de la cromatografía líquida. Estas características han sido mejoradas en la nueva generación de Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC), así como su capacidad para proporcionar información tanto cualitativa como cuantitativa.

El uso de UHPLC acoplado a fuentes de ionización por electrospray (ESI) y espectrometría de masas (MS/MS) se ha presentado como la posibilidad analítica de alcanzar una elevadísima sensibilidad. Presenta la capacidad de medir los iones con masa exacta, proporcionando información de la composición elemental, permitiendo establecer las rutas de fragmentación. Incluso, ha sido posible aplicar todas esas cualidades en muestras de alta complejidad, alcanzando niveles de resolución inimaginables hace unos años con instrumentos considerados de alto/medio rendimiento.

En este estudio se describe un rápido, específico, fiable y sensible método analítico para la determinación simultánea de compuestos fenólicos presentes frecuentemente en el AOV.

Los análisis cromatográficos se realizaron en un UHPLC Agilent serie 1200 (Agilent, EE.UU.) con un sistema de bomba binaria, un desgasificador de vacío, un inyector automático refrigerado y un compartimento termostatzado para la columna.

La separación se llevó a cabo utilizando una columna analítica Zorbax SB-C18 (2.1 mm×50 mm, 1.8 µm) (Agilent).

Una óptima separación de los analitos se consiguió utilizando un gradiente de fase móvil binario a una velocidad de flujo de 0.4 mL/min, la temperatura de la columna se mantuvo a 30 °C y el volumen de inyección fue de 10 µL. Las fases móviles empleadas fueron (A) agua/ácido acético (0.2%), con un pH 3.10 y (B) acetonitrilo. El gradiente utilizado se muestra en la Tabla 3.16, siendo necesarios 5 minutos para volver a las condiciones iniciales.

Tabla 3.16.- Gradiente de fases móviles del UHPLC-ESI-MS/MS.

Tiempo (min)	% A	% B
0	95	5
3	95	5
15	60	40
15.5	0	100

La identificación y cuantificación de los compuestos fenólicos se obtuvo usando un 6410 Triple Cuádruplo LC/MS equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI) y controlado por el software MassHunter Workstation (Agilent, EE.UU.). Las condiciones de trabajo fueron:

Voltaje del capilar: 4000 V

Flujo de gas: 10 L/min

Temperatura del gas: 300 °C

Presión del nebulizador: 35 psi

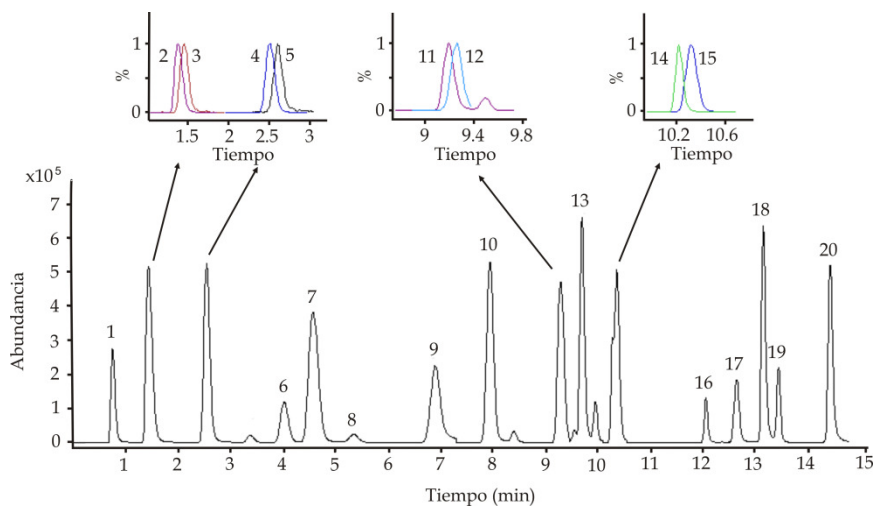
La detección se realizó en modo: Reacción Múltiple Dinámica Monitorizada (DMRM) (Agilent 6400 triple cuádruplo). La mejora de este modo respecto al modo Reacción Múltiple Monitorizada (MRM) convencional es el uso de tiempos específicos con un intervalo de tiempo para cada compuesto en lugar de un segmento de tiempo. Para identificar correctamente los diferentes compuestos se utilizaron las dos transiciones más sensibles. La transición más sensible de las dos fue utilizada para la cuantificación y la siguiente se usó para la confirmación del compuesto (Tabla 3.17).

Tabla 3.17.-Tiempos de retención y parámetros del MS/MS para los compuestos fenólicos.

Compuestos fenólicos	Ion precursor m/z	DMRM 1 (cuantificación)		DMRM 2 (confirmación)		Fragmentador (V)	Tiempo de retención (min)
		Ion producto (AR,%)	EC (V)	Ion producto	EC (V)		
Ácido gálico	169	125 (100)	12	79,1	24	128	0,7
Ácido protocatéquico	153	109 (100)	12	123,1	12	104	1,4
Hidrotirosol	153,2	125,1 (100)	12	123,1	8	128	1,5
Ácido p-hidroxibenzoico	137	93,1 (100)	12	65,1	32	104	2,5
Tirosol	137,2	119,1 (100)	12	106,1	12	110	2,6
Ácido p-hidroxifenilacético	151	107(100)	0	79,1	16	80	3,3
Ácido vanílico	167,2	152 (100)	8	108	28	104	3,9
Ácido caféico	179,2	135 (99,7)	12	107,1	24	104	4,5
Vainillina	151,1	136,1(100)	8	92	20	80	6,8
Ácido p-cumárico	163,2	119,1 (104,9)	12	93	32	104	7,8
Ácido ferúlico	193,1	134 (100)	12	178	8	104	9,2
Ácido m-cumárico	163,2	119 (38,6)	12	93,1	32	104	9,3
3,4-DHPEA-AC	195,1	59,1 (100)	8	135	0	128	9,6
Ácido sinápico	223,1	208 (100)	8	93,1	32	104	9,6
Rutina	609,2	300,1 (100)	36	301	32	216	10,2
Ácido o-cumárico	163,2	119,1 (59,5)	12	93,1	36	128	10,3
Oleuropeína	539,5	275,1 (100)	16	307,1	16	152	12
3,4-DHPEA-EDA	319,1	59 (100)	4	69,1	32	104	12,1
3,4-DHPEA-EA	377,1	275,1 (100)	0	95,1	12	104	12,4
Ácido Cinámico	147	103,1 (100)	4	77	20	80	12,6
Luteolina	285,2	133 (100)	32	175,1	20	182	13
Pinoresinol	357,1	136 (100)	28	151,1	16	128	13,3
1-Acetoxipinoresinol	415,1	239 (100)	40			128	13,6
Ácido Homovanílico	181	137,1 (100)	8	109,1	12	200	13,7
Metil 3,4-DHPEA-EA	409	95 (100)	20			104	13,7
p-3,4-DHPEA-EA	361,1	291,1 (100)	0	101	8	104	13,7
p-3,4-DHPEA-EdA	303,1	59,1 (100)	8	285	0	128	13,8
Apigenina	269,2	117 (100)	32	107,2	24	152	14,3

La cuantificación de los compuestos fenólicos se realizó, cuando era posible, utilizando los estándares comerciales disponibles. En el caso de los compuestos derivados de compuestos fenólicos que no eran comerciales, la estimación de sus valores fue lograda mediante equivalentes. De acuerdo con esto, la concentración estimada del ácido homovainílico fue expresada como equivalente del ácido vainílico ( $\mu\text{g/mL}$ ); la del 3,4-DHPEA-EA y 3,4-DHPEA-EDA como equivalente de la oleuropeína ( $\mu\text{g/mL}$ ); y la del 1-acetoxipinoresinol como equivalente del pinoresinol ( $\mu\text{g/mL}$ ). Los siguientes compuestos: 3,4-DHPEA-AC, metil 3,4-DHPEA-EA, p-HPEA-EA y p-HPEA-EDA fueron identificados pero no pudieron ser cuantificados debido a que no existen estándares comerciales y tampoco estándares de compuestos fenólicos equivalentes para ellos. Para la identificación se utilizaron los datos disponibles en la literatura publicada contrastados con los valores obtenidos por el Software MassHunterOptimizer. (Mercedes Becerra-Herrera, et al. 2014).

La Figura 3.8 muestra un cromatograma UHPLC-MS/MS obtenido de la mezcla de disolución estándar a concentración de 20 µg/mL empleando las condiciones previamente descritas.



**Figura 3.8.**-Cromatograma total de iones (TIC) obtenido en modo DMRM en el análisis UHPLC-MS/MS de compuestos fenólicos en la disolución multiestándar. La designación de los picos fue: (1) ácido gálico, (2) ácido protocatéquico, (3) hidroxitirosol, (4) ácido p-hidroxibenzoico, (5) tirosol, (6) ácido p-hidroxifenilacético, (7) ácido vanílico, (8) ácido cafeico, (9) vainillina, (10) ácido p-cumárico, (11) ácido ferúlico, (12) ácido m-cumárico, (13) ácido sinápico, (14) rutina, (15) ácido o-cumárico, (16) oleuropeína, (17) ácido cinámico, (18) luteolina, (19) pinosresinol, (20) apigenina.

### 3.4. 6. Determinación de los Compuestos volátiles

La determinación de compuestos volátiles, se realizó mediante el procedimiento de micro-extracción en fase sólida (SPME) consiguiéndose el aislamiento de compuestos volátiles del espacio de cabeza por adsorción sobre una fibra de material adsorbente, que posteriormente es desorbida, siendo los analitos volátiles analizados mediante cromatografía de gases de alta resolución y cuantificados con la utilización de patrón interno (Tena et al. 2007)

Los compuestos volátiles adsorbidos por la fibra fueron desorbidos en el puerto de inyección del CG durante 5 min a 260°C con la válvula de la purga cerrada (modo sin fraccionamiento). Los compuestos fueron separados en una columna DB (J&W Scientific, Folsom, CA; 60 m x 0.25 mm de diámetro x 0.25 µm de espesor) instalada en un cromatógrafo de gases Varian 3900 (Varian, Walnut Creek, CA) con un detector de ionización de llama (FID). El gas portador fue hidrógeno. La temperatura del horno fue

mantenida a 40°C durante 4 min y programada para ir incrementándose 1°C/min hasta alcanzar una temperatura de 91°C y posteriormente 10 °C/min hasta alcanzar una temperatura final de 201°C, la cual se mantuvo durante 10 min hasta eliminar el efecto memoria. Cada muestra fue analizada 3 veces.

La identificación de los compuestos volátiles fue llevada a cabo en un cromatógrafo de gases GC8000 (Carlo Erba, Milano, Italia) acoplado a un detector selectivo de masas MSD-800 (Fisons, Manchester, Reino Unido). La columna y las condiciones analíticas fueron idénticas a las descritas para la cromatografía de gases a excepción del gas portador que fue sustituido por helio (presión 15 psi). Los compuestos volátiles identificados por la librería MassLab v.1.3. (VG MassLab, Altrincham, Reino Unido), fueron confirmados posteriormente mediante el uso de patrones.

La cantidad de cada compuesto volátil fue calculada a partir del área proporcionada por el FID y fue expresada en unidades de área. Se usó una disolución de 4-methyl-2-pentanol (1.2 mg/kg) como patrón externo con el fin de estandarizar los resultados obtenidos tras la realización de los correspondientes análisis. Por lo tanto, la cuantificación (mg / kg) de cada compuesto volátil fue llevada a cabo relacionando la intensidad de pico de cada compuesto con la intensidad de pico del patrón externo, y teniendo en cuenta el peso de la muestra.

### **3. 4. 7.- Métodos estadísticos**

Para la construcción de la base de datos y llevar a cabo el análisis estadístico se utilizaron Microsoft Excel 2003 (Microsoft Corporation) y Statistica (StatSoft®, Inc.), respectivamente.

#### **Manova**

El propósito general de un análisis de varianza es comprobar la existencia de diferencias significativas entre las medidas para diversos grupos o clases. El análisis de la varianza es una técnica de análisis estadístico que permite superar la ambigüedad que representa la estimación de diferencias significativas cuando se hace más de una

comparación. Mediante él, podemos comprobar la significación estadística de la diferencia entre medias de más de dos muestras, llegando a determinar si las diferencias observadas pueden o no asignarse a fluctuaciones de muestreo o la presencia de errores aleatorios.

### **Análisis de componentes principales**

Es un método multivariante cuyo objetivo principal es la reducción de la dimensionalidad de la matriz de datos que se aplica cuando se dispone de un conjunto elevado de variables con datos cuantitativos correlacionados entre sí. Persiguiendo obtener un número de variables, que se denominan componentes principales o factores, que resuman lo mejor posible a las variables iniciales con la mínima pérdida de información. Esta reducción puede simplificar la aplicación sobre estas últimas de otras técnicas multivariantes (regresión, clusters, LDA, etc.), además facilitaría que la visualización de estructuras y relaciones entre las muestras que permitirían su diferenciación en clases.

Como medida de la cantidad de información incorporada en un componente se utiliza la varianza. Cuanto mayor sea su varianza mayor es la información que lleva incorporado dicho componente. Por esta razón se selecciona como primer componente aquel que tenga mayor varianza, mientras que el último es el de menor varianza.

Cuando las variables originales están muy correlacionadas entre sí, la mayor parte de su variabilidad se puede explicar con muy pocos componentes. Si las variables originales no estuvieran relacionadas entre sí, entonces el análisis de componentes principales carecería por completo de interés

### **Análisis discriminante**

El análisis discriminante es uno de los métodos estadísticos más aplicado, que consiste en obtener unas funciones discriminantes o clasificadoras, que separen las clases o los tipos de muestras. Para realizar el cálculo de las funciones discriminantes, previamente se seleccionan las variables con mayor poder discriminatorio. Para ello se

utilizan criterios de selección sucesiva, de forma que se incluyan sólo aquellos descriptores que son, verdaderamente, relevantes de la discriminación.

El análisis por pasos hacia delante (“forward stepwise”) se usa para construir el modelo de discriminación paso a paso. En cada paso, se evalúan las variables no seleccionadas, para determinar cuál es la que más contribuye a la discriminación entre grupos, que es entonces incluida en el modelo. El control de las variables, incluidas o excluidas del modelo, se lleva a cabo según el valor F de las variables en cada paso del proceso. El valor F es una medida de la importancia que una variable tiene a la hora de contribuir a la predicción del grupo de pertenencia. El proceso finaliza cuando no hay variables que posean valores por encima del valor F de entrada, o por debajo de F de eliminación, fijado a priori, o la inclusión, o rechazo, de nuevas variables no mejora el resultado previo. Estos valores (F de entrada y F de eliminación) se fijan de manera muy estricta para evitar la sobreestimación de los resultados.



# **CAPÍTULO 4.**

**Resultados**



## **4.1.- Trazabilidad geográfica**

El estudio de la Trazabilidad Geográfica del aceite de oliva virgen extra de la provincia de Huelva se ha basado, de una parte en la diferenciación de los distintos tipos de aceites producidos en función de su composición elemental y de otra en sus diferencias atendiendo al estudio de compuestos minoritarios implicados en el origen geográfico del aceite de oliva como son el contenido en ácidos grasos y en esteroides.

### **4.1.1.-Determinación de la trazabilidad geográfica en función de la composición elemental de los suelos, alperujos y aceites.**

Los elementos traza que se incorporan al olivo desde la tierra se transfieren parcialmente a las aceitunas (Bakircioglu, Kurtulus, Yurtsever, 2013). En consecuencia, los elementos traza pueden determinarse en muestras de aceite y / o de orujo de oliva, los dos únicos productos que resultan del procesamiento de las aceitunas. La provincia de Huelva, es una zona geográfica excelente para estudiar la importancia de la composición del suelo en la trazabilidad geográfica, ya que ofrece diferentes variedades plantadas en el mismo terreno. Las explotaciones de la variedad Verdial de Huévar, que significaba más del 90% de toda la producción de hace sólo unos años, poco a poco se han sustituido por las variedades Arbequina y Picual cultivadas en plantaciones intensivas de regadío. Por lo tanto, en esta área, es posible analizar la concentración de elementos en el aceite de oliva y en el orujo de oliva de varias variedades con respecto a su disponibilidad en los suelos.

La profundidad de las raíces del olivo varía de acuerdo con la edad de este y con las características del suelo (Fernández, Moreno, Cabrera, Arrue, Martín-Aranda, 1991). Para el estudio se recogieron las muestras de suelo a 30 cm y 60 cm de profundidad, porque las plantaciones se encuentran en su etapa juvenil -con la excepción de la variedad Verdial de Huévar - y las raíces de los árboles se estima que se encuentren alrededor de 40-50 cm de profundidad.

Como se indica en el capítulo 3, se tomaron un total de 216 muestras, 91 de aceites de las tres variedades predominantes en la zona (Verdial, Picual y Arbequina),

91 muestras de sus alperujos respectivos y 34 de suelos de las distintas parcelas seleccionadas en las zonas de trabajo las cuales se recogen en las Tablas 3.1 - 3.3 y en la Figura 3.2.

Para el análisis cuantitativo de los distintos elementos tanto en suelo como en los aceites y sus respectivos alperujos se han seguido los métodos descritos en el apartado 3.4.1 del capítulo 3. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 4.1 - 4.2.

La Tabla 4.4 muestra las medias y la desviaciones estándar de las concentraciones de los 34 elementos en las dos profundidades. La mitad de ellos se cuantificaron en concentraciones superiores a 10 mg / kg. En lo que respecta a los elementos cuantificados en bajas concentraciones, es de destacar la baja concentración de Mn que fue inferior a 1 mg / kg en todos los casos.

Dieciocho elementos mostraron concentraciones más elevadas ( $p < 0,05$ ) en las muestras de suelos recogidos a 60 cm de profundidad (Tabla 4.4), mientras que trece de ellos (As, Ga, Hf, Mn, Na, Nb, Pb, Sc, Th, Ti, U, Y, Zn) no mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las dos profundidades cuando se aplica la prueba de Brown-Forsythe. Sólo tres elementos (Cu, Sn, Mo) se encontraron en concentraciones más elevadas en las muestras recogidas a 30 cm. La acumulación de cobre en los suelos podría ser consecuencia de la amplia aplicación de fungicidas compuestos por una mezcla sulfato de cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) e hidróxido de calcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) (por ejemplo, mezcla de Burdeos).

Tabla 4.1.- Contenido metálico en las muestras de suelo expresado en ng Kg<sup>-1</sup>

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11
ALUMINIO	47628121,8	59555590,4	51041515,6	55063942,7	50855936,1	55981803,0	51778551,8	52771469,8	23557521,7	28710667,5	21229418,2
ARSÉNICO	10937,21	12171,37	9300,49	11079,07	12092,17	13908,83	10436,05	11835,75	9368,21	9185,39	11714,56
BARIO	284067,48	340019,47	325221,67	331069,77	313364,06	334917,56	320833,33	319903,38	155774,93	164887,64	221072,80
CALCIO	1692705,8	1239120,4	1324304,7	1448309,0	1657161,4	1649200,2	2301797,2	2078009,1	1195549,8	1313446,1	43545335,2
CESIO	3345,83	2911,39	3339,90	3646,51	2995,39	3520,85	2771,32	2772,95	2349,46	2397,00	2423,37
CINC	45164,01	44693,28	54975,37	73841,86	43907,83	39078,56	56705,43	53806,76	32912,14	25852,06	22777,78
COBALTO	12286,79	13972,74	14364,53	15609,30	11990,78	12754,61	13875,97	13980,68	7028,63	8754,68	4856,32
COBRE	19400,19	20954,24	24236,45	24418,60	21373,27	21328,81	23187,98	24637,68	23849,95	19831,46	16216,48
CROMO	59981,26	68198,64	65990,15	71255,81	65336,41	64898,16	67267,44	73758,45	48548,86	42968,16	34272,03
ESCANDIO	5745,08	5764,36	5881,77	6037,21	5096,77	5577,11	5406,98	5748,79	2517,28	2556,18	2337,16
ESTAÑO	18097,47	5637,78	9241,38	5237,21	5493,09	5557,71	7083,33	7062,80	4175,72	4269,66	4137,93
ESTRONCIO	89090,91	77166,50	76098,52	79413,95	74258,06	78477,21	60949,61	76125,60	29111,55	27893,26	45689,66
GALIO	23851,92	27614,41	28108,37	29227,91	25843,32	27681,86	26250,00	29487,92	14708,79	15777,15	17931,03
HAFNIO	3636,36	3661,15	3566,50	3572,09	3539,17	3656,64	3691,86	3681,16	2892,40	3080,52	1934,87
HERRO	53220014,5	66204340,5	57121236,8	61604737,6	56275044,1	62478147,3	58488438,4	59664418,1	25120705,6	32153235,7	22885984,2
LITIO	34367,39	39483,93	53280,79	59265,12	37050,69	39214,35	51027,13	54676,33	25419,55	25833,33	18802,68
MAGNESIO	6762336,2	7533009,4	6407499,6	6311441,8	6630863,6	7225116,1	7708238,8	7930751,8	1466494,7	1604198,5	2217174,2
MANGANESO	1412854,6	2195246,5	1463922,1	1520803,8	964799,3	1007893,4	1698846,1	1599734,6	622732,4	992543,3	415677,0
MOLIBDENO	6907,22	3339,82	2827,59	2753,49	2709,68	2851,60	2538,76	2531,40	2339,59	2415,73	2030,65
NIOBIO	11743,21	12112,95	12266,01	13227,91	12046,08	12512,12	13323,64	13285,02	10473,84	12518,73	7835,25
NÍQUEL	24526,71	28558,91	31428,57	32948,84	30304,15	26023,28	30436,05	33352,66	13346,50	13670,41	11570,88
PLOMO	20852,86	18636,81	19566,50	20381,40	17548,39	18292,92	18672,48	18618,36	19822,31	19953,18	12279,69
POTASIO	22083754,2	27933942,5	29507066,5	31852689,9	22866221,8	24306771,1	26522932,7	28014672,0	11161576,7	12532113,2	21978117,3
RUBIDIO	66897,84	64790,65	78049,26	74948,84	67437,79	76508,24	52412,79	77207,73	47305,03	48483,15	61599,62
SELENIO	1865,04	1217,14	1428,57	1479,07	829,49	872,94	1395,35	1584,54	888,45	842,70	862,07
SODIO	12346270,6	10362021,3	6991345,4	6350120,0	10769273,2	11746131,1	9303491,7	8174815,3	2130967,8	2314623,2	5541020,5
TÁNTALO	8706,65	8500,49	8798,03	7972,09	7723,50	8137,73	8197,67	8173,91	7769,00	7631,09	7586,21
TITANIO	5517854,2	5803726,6	5362395,7	5762409,2	5538703,2	5709300,8	5723983,2	5541896,8	3700068,3	4242363,6	3379806,1
TORIO	8341,14	7224,93	8768,47	8465,12	7373,27	8283,22	7325,58	7826,09	6386,97	6048,69	3247,13
URANIO	4151,83	4177,22	4285,71	4213,95	4193,55	4238,60	4127,91	4115,94	3267,52	3155,43	2461,69
VANADIO	86326,15	99805,26	110246,31	122883,72	101013,82	103879,73	106686,05	116714,98	52734,45	53174,16	52883,14
WOLFRAMIO	6935,33	6183,06	5994,09	5581,40	5364,06	5596,51	5649,22	5623,19	5439,29	7284,64	4837,16
YTRIO	7535,15	7974,68	8098,52	8000,00	7281,11	7623,67	7296,51	7536,23	5320,83	5327,72	4291,19
ZIRCONIO	99812,56	104868,55	98916,26	105953,49	108479,26	111348,21	113565,89	113236,71	78509,38	79850,19	45249,04

Tabla 4.1.- (Continuación). Contenido metálico en las muestras de suelo expresado en ng Kg<sup>-1</sup>

	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18	T19	T20	T21	T22
ALUMINIO	26722156,1	16329668,8	19209558,9	35021792,5	20715232,4	26259550,0	28792877,6	23437097,6	27927639,9	25272137,7	24845304,3
ARSÉNICO	12117,20	7239,73	6843,16	10019,38	7121,07	6542,61	5557,77	5948,62	6640,78	6762,52	5610,00
BARIO	253024,57	88901,62	99350,65	125484,50	113060,06	186777,67	183266,93	171146,25	144854,37	224675,32	213600,00
CALCIO	24017012,8	849938,8	591668,3	1198349,5	852263,5	159342735,5	166295711,3	46149102,7	157311834,7	177768655,7	209484113,9
CESIO	3241,97	1404,01	1578,42	3653,10	2783,60	3359,45	3446,22	1788,54	2058,25	3367,35	3280,00
CINC	29499,05	26160,46	17792,21	26579,46	21039,08	32399,61	38625,50	26017,79	22912,62	31512,06	31150,00
COBALTO	6975,43	3295,13	3546,45	7519,38	8265,01	6356,51	5458,17	6077,08	4941,75	6270,87	5800,00
COBRE	16710,78	21833,81	10719,28	15368,22	11877,98	23565,13	9223,11	9239,13	7330,10	36122,45	13510,00
CROMO	50765,60	40869,15	44295,70	60717,05	42449,95	54035,26	54272,91	35177,87	42106,80	54925,79	57070,00
ESCANDIO	3241,97	1413,56	1578,42	3042,64	2326,02	3486,78	3446,22	2104,74	2553,40	4063,08	4200,00
ESTAÑO	5122,87	4412,61	5204,80	8236,43	4184,94	4240,94	10687,25	4920,95	5436,89	9183,67	3510,00
ESTRONCIO	50699,43	20477,55	19340,66	23178,29	20629,17	161704,21	180976,10	35800,40	54223,30	217346,94	248400,00
GALIO	22712,67	9197,71	9440,56	15872,09	12802,67	17473,07	17001,99	16284,58	13718,45	23191,09	25170,00
HAFNIO	2372,40	2693,41	2897,10	2984,50	2993,33	2948,09	2679,28	2539,53	2097,09	2541,74	2200,00
HERRO	29051103,8	17463987,6	20766117,6	38524916,3	22021130,8	28383438,8	30585040,5	25500803,1	30652960,8	27430090,9	26779335,9
LITIO	27258,98	17936,96	18941,06	30591,09	24747,38	24789,42	24790,84	16600,79	16407,77	28580,71	32440,00
MAGNESIO	2637860,4	953365,5	1014392,2	1314983,6	950920,4	6218907,5	6545985,3	2306617,5	3281485,1	6101901,0	6365983,5
MANGANESO	498345,6	347387,4	357003,3	489681,0	588160,9	253019,0	206896,2	449954,7	369220,0	209721,0	202247,0
MOLIBDENO	2051,04	2244,51	2287,71	2441,86	2163,97	2037,22	2021,91	2015,81	2029,13	834,88	900,00
NIOBIO	9319,47	9808,98	10759,24	12054,26	11382,27	11645,45	11125,50	7638,34	7514,56	10732,84	10510,00
NÍQUEL	16219,28	7449,86	8111,89	19069,77	14251,67	18374,14	17649,40	11699,60	12184,47	20120,59	21140,00
PLOMO	13043,48	13829,99	12427,57	18546,51	16434,70	10626,84	7669,32	8754,94	8640,78	12838,59	9900,00
POTASIO	23359800,2	5870961,2	6601615,7	10315684,7	7717353,4	17212417,0	16857256,5	16136290,7	13920028,2	16437924,1	16664028,4
RUBIDIO	74933,84	28634,19	32107,89	48943,80	40743,57	57904,02	54980,08	57282,61	48834,95	58330,24	58210,00
SELENIO	1039,70	859,60	899,10	872,09	857,96	881,49	896,41	889,33	873,79	1521,34	2270,00
SODIO	5749372,7	906858,7	873700,0	1136841,6	1080015,2	4594450,5	4002633,8	4347456,3	4196090,7	4618344,3	4600468,1
TÁNTALO	7542,53	7325,69	7852,15	7771,32	7645,38	8109,70	8167,33	7707,51	8009,71	3627,09	5050,00
TITANIO	3964313,4	3340540,1	4131676,6	4568258,8	3864947,6	3691142,7	3514558,7	2877787,3	2536703,7	3605597,4	3485008,5
TORIO	4413,99	5262,66	6023,98	7548,45	6920,88	5014,69	4760,96	3527,67	3854,37	6400,74	5320,00
URANIO	2589,79	3008,60	3136,86	3207,36	3126,79	2830,56	2828,69	2569,17	2592,23	1706,86	1240,00
VANADIO	71209,83	38414,52	41938,06	70038,76	50943,76	73604,31	75428,29	52144,27	63349,51	75009,28	78650,00
WOLFRAMIO	5037,81	4985,67	5284,72	5503,88	5233,56	5151,81	5059,76	4713,44	4660,19	2959,18	2790,00
YTRIO	5293,01	3677,17	4065,93	5697,67	5309,82	5171,40	4910,36	3843,87	4495,15	5306,12	5240,00
ZIRCONIO	64517,96	75214,90	77522,48	82451,55	79027,65	89089,13	74402,39	47964,43	50203,88	99628,94	102700,00

Tabla 4.1.- (Continuación). Contenido metálico en las muestras de suelo expresado en ng Kg

	T23	T24	T25	T26	T27	T28	T29	T30	T31	T32
<b>ALUMINIO</b>	16735182,0	29824829,2	25371537,5	25753039,2	21942880,5	25441784,1	19521423,4	19552626,7	14991221,9	16546229,1
<b>ARSÉNICO</b>	6610,17	9382,24	8060,43	7069,81	7791,47	7052,63	5890,91	5846,61	4926,11	5127,00
<b>BARIO</b>	237587,24	243629,34	214619,88	215240,90	233933,65	220478,47	227090,91	218625,50	203842,36	209031,04
<b>CALCIO</b>	1051652,6	1567414,3	152100460,1	160992136,5	33245314,9	67836683,6	30770853,6	32749660,0	2425168,1	2507322,8
<b>CESIO</b>	1365,90	2171,81	2894,74	3146,51	1905,21	2095,69	2209,09	1972,11	1862,07	2041,39
<b>CINC</b>	26540,38	29198,84	37251,46	35142,58	24132,70	24708,13	20863,64	26005,98	22275,86	19162,75
<b>COBALTO</b>	7956,13	10666,02	6384,02	6519,17	4796,21	5550,24	5072,73	4452,19	3773,40	3941,67
<b>COBRE</b>	12063,81	12982,63	28713,45	22173,06	23469,19	9033,49	23445,45	19591,63	18837,44	12634,05
<b>CROMO</b>	25024,93	40714,29	5477,58	60629,30	40710,90	48028,71	41854,55	36454,18	31822,66	40602,07
<b>ESCANDIO</b>	4187,44	2673,75	3937,62	4247,79	2578,20	3043,06	2881,82	2918,33	2630,54	2737,54
<b>ESTAÑO</b>	6331,01	7123,55	3460,04	5309,73	2796,21	2889,95	3072,73	4422,31	6423,65	3396,05
<b>ESTRONCIO</b>	24047,86	30202,70	161208,58	152999,02	48028,44	61454,55	55463,64	55388,45	42709,36	40131,70
<b>GALIO</b>	30827,52	31293,44	26647,17	27059,98	28976,30	25751,20	26654,55	25727,09	25024,63	24778,93
<b>HAFNIO</b>	1296,11	1418,92	1578,95	1612,59	1023,70	1186,60	1963,64	2051,79	1901,48	1693,32
<b>HERRO</b>	18236294,0	32489342,0	27000311,3	27359492,0	23372650,2	27772483,3	21054919,4	20885255,9	16272993,5	17770668,3
<b>LITIO</b>	17058,82	26061,78	28927,88	33795,48	21298,58	23406,70	25572,73	22659,36	22177,34	24214,49
<b>MAGNESIO</b>	1156599,2	2174927,8	6040377,5	6186229,7	2795859,8	3401071,7	3438813,2	3420194,2	2293681,7	2712384,8
<b>MANGANESO</b>	738257,3	1157910,3	241898,9	234781,6	255552,7	283646,9	209967,2	204653,1	173908,3	163694,0
<b>MOLIBDENO</b>	1106,68	868,73	877,19	884,96	853,08	861,24	818,18	896,41	886,70	846,66
<b>NIOBIO</b>	6560,32	1054,05	9454,19	10481,81	6360,19	7138,76	10390,91	9591,63	9064,04	7864,53
<b>NÍQUEL</b>	12711,86	16525,10	9142,30	20629,30	12843,60	13578,95	13300,00	12091,63	9221,67	9952,96
<b>PLOMO</b>	35792,62	30279,92	12066,28	10442,48	12511,85	10114,83	10354,55	10886,45	11133,00	10225,78
<b>POTASIO</b>	18041352,2	18408208,2	17807080,1	17687633,2	21553511,5	19298093,6	15388507,7	16034316,3	14126149,1	14636324,6
<b>RUBIDIO</b>	69611,17	72036,68	63099,42	60589,97	63687,20	52181,82	47072,73	45478,09	45448,28	46792,10
<b>SELENIO</b>	2263,21	3059,85	2826,51	2595,87	1981,04	2086,12	3290,91	2360,56	2768,47	4430,86
<b>SODIO</b>	3214903,6	4215337,1	5225762,3	5104578,4	6393585,9	6633423,0	7726898,1	8383479,0	6954718,3	7047793,8
<b>TÁNTALO</b>	3020,94	2866,80	3693,96	4001,97	2511,85	2794,26	818,18	3695,22	2630,54	2690,50
<b>TITANIO</b>	3095216,9	4183894,8	3381048,7	3628847,4	2536856,6	2921469,9	4379258,5	4315653,0	4157382,8	3637608,1
<b>TORIO</b>	5304,09	5000,00	4902,53	4523,11	3819,91	3732,06	5463,64	5478,09	6305,42	5691,44
<b>URANIO</b>	1784,65	2084,94	1228,07	1317,60	853,08	861,24	1400,00	1523,90	1596,06	1476,95
<b>VANADIO</b>	37906,28	64121,62	78362,57	83982,30	53668,25	63789,47	60281,82	53665,34	47674,88	49905,93
<b>WOLFRAMIO</b>	3778,66	2451,74	2504,87	2635,20	2284,36	2220,10	2918,18	3247,01	2364,53	3085,61
<b>YTRIO</b>	5224,33	4102,32	5282,65	5349,07	4094,79	4612,44	4881,82	4551,79	4147,78	3725,31
<b>ZIRCONIO</b>	42691,92	54488,42	76403,51	80285,15	54151,66	59090,91	87045,45	84701,20	82541,87	73104,42

Tabla 4.2.- Contenido metálico en las muestras de orujo expresado en ng Kg<sup>-1</sup>

	O-1	O-2	O-3	O-4	O-5	O-6	O-7	O-10	O-11	O-12
ALUMINIO	274919,87	4345012,98	3065229,77	2469107,85	1721242,58	330316,36	421594,17	1223005,68	539671,72	901702,06
ARSENICO	17,90	16,13	20,41	10,48	6,75	6,24	12,97	11,01	16,60	26,68
BARIO	1008,03	1062,78	606,22	648,42	447,96	447,27	235,01	713,08	1453,36	4170,68
CALCIO	5411310,45	4995404,59	5284312,94	4519166,87	4492349,05	6226794,01	5543382,68	6172267,88	4403496,72	5309603,02
CESIO	43,55	37,29	14,41	14,90	21,10	20,10	8,83	14,25	24,90	45,58
CINC	467,85	440,14	481,33	613,70	403,14	308,01	326,76	395,88	349,57	300,29
COBALTO	36,05	174,58	117,99	131,98	84,60	43,23	26,21	19,58	36,59	29,57
COBRE	1209,85	759,64	688,27	957,35	770,30	896,12	912,10	967,37	1124,79	974,95
CROMO	10709,84	7195,88	4623,82	4835,92	1847,00	1098,62	917,63	120,53	155,24	153,88
ESCANDIO	238,52	286,82	172,39	208,11	265,79	273,92	246,36	171,68	394,17	511,03
ESTAÑO	8,03	7,46	36,82	4,76	3,85	3,60	19,95	4,76	8,22	11,58
ESTRONCIO	272,69	603,51	565,27	610,29	509,53	206,88	159,83	451,66	652,66	1001,20
GALIO	169,94	152,84	93,04	113,12	68,21	68,69	38,04	106,05	160,74	223,09
HAFNIO	47,12	44,16	17,36	23,62	21,47	27,20	7,75	28,27	64,31	108,59
HIERRO	294388,73	4387073,24	3077457,00	2379963,02	1631334,34	354776,98	412684,30	1187912,28	560952,55	976628,18
LITIO	307,13	334,35	147,81	188,66	212,80	248,94	202,11	309,77	695,82	1212,19
MAGNESIO	1178896,11	28207103,64	17815588,02	14943465,38	10045119,14	1274994,67	1917272,26	2293562,73	1740185,70	1992254,37
MANGANESO	23842,26	53138,97	47434,62	34291,54	32322,76	34804,67	24131,74	58084,62	51295,95	55842,60
MOLIBDENO	16,24	21,90	28,52	31,92	25,07	27,80	31,06	39,38	77,63	132,45
NIOBIO	73,77	11,59	5,13	5,16	6,34	7,63	5,54	7,38	14,28	22,15
NIQUEL	4324,72	5838,37	3382,63	3797,57	1842,78	3038,06	3316,16	116,92	125,47	86,28
PLOMO	85,37	121,85	55,96	65,54	22,56	24,46	31,93	81,08	281,98	615,86
POTASIO	35611363,96	35631161,63	43898287,86	41774327,16	41884973,76	40570645,64	33009728,51	48066869,99	42926334,98	50608802,88
RUBIDIO	1233,82	2091,34	2311,58	2644,26	2244,60	1675,96	1356,02	1135,86	938,91	743,45
SELENIO	6,87	5,64	2,86	3,35	3,14	2,96	1,18	3,62	5,80	8,49
SODIO	11976394,27	11060426,17	4825602,76	4800798,86	10956538,02	14640976,12	3849297,58	12984678,36	25016664,54	51701386,65
TÁNTALO	173,84	16,07	8,54	2,72	2,57	1,97	1,10	1,09	1,58	4,79
TITANIO	125219,75	123205,35	66469,50	57666,71	103954,47	135725,56	48449,69	198577,62	253759,88	547551,67
TORIO	16,25	15,53	5,82	7,87	2,61	3,08	1,31	9,68	16,86	33,16
URANIO	0,06	0,05	0,06	0,06	0,05	0,03	0,01	0,03	0,00	0,03
VANADIO	24,12	84,39	55,34	60,04	39,43	20,61	13,37	47,15	37,96	50,17
WOLFRAMIO	38,26	27,84	62,78	54,81	67,72	29,85	25,78	22,00	23,41	21,01
YTRIO	33,28	29,98	12,68	16,14	15,60	19,25	6,26	22,55	48,79	80,37
ZIRCONIO	3105,57	2724,72	2450,23	1520,10	1356,62	1655,61	1723,85	1748,18	4127,81	6774,43

Tabla 4.2.- (Continuación). Contenido metálico en las muestras de orujo expresado en ng Kg<sup>-1</sup>

	O-13	O-14	O-15	O-16	O-17	O-18	O-19	O-20	O-21	O-22
ALUMINIO	763844,19	870133,36	2782501,54	3440115,20	143418,60	168488,95	173715,60	171619,81	120086,47	138964,55
ARSENICO	31,67	22,60	8,19	8,71	5,82	5,64	6,09	3,78	7,28	1,37
BARIO	5289,60	3967,87	714,40	734,10	513,23	525,36	580,30	345,69	273,92	134,46
CALCIO	5041800,85	4652499,82	4837044,74	4737114,89	4830554,86	5670316,12	5438329,87	5326351,53	4682516,62	5660422,18
CESIO	44,88	31,61	9,61	9,58	8,74	7,55	7,82	5,33	23,87	5,16
CINC	227,60	209,95	255,52	248,89	223,00	206,79	208,19	181,32	184,29	159,39
COBALTO	32,11	21,85	55,45	89,27	17,61	14,37	10,68	10,62	14,97	13,87
COBRE	283,41	602,12	751,88	720,46	515,31	521,89	513,97	373,26	381,57	412,71
CROMO	153,82	151,41	1529,92	2077,82	35,34	32,08	34,18	32,06	37,87	24,40
ESCANDIO	545,53	363,45	106,52	115,69	72,41	73,56	74,71	50,74	72,51	36,73
ESTAÑO	12,72	10,51	4,56	4,01	2,18	2,28	2,31	1,27	6,07	0,52
ESTRONCIO	582,85	676,02	380,86	365,91	233,18	228,19	249,99	185,26	249,72	241,15
GALIO	242,30	178,49	74,17	72,47	53,39	53,71	59,60	37,81	29,90	15,80
HAFNIO	140,90	115,28	28,23	28,65	20,59	21,90	25,02	13,64	16,62	6,11
HIERRO	847263,48	953046,75	2713588,65	3381252,80	155432,07	178067,43	183721,39	177446,63	127115,14	146476,68
LITIO	1470,49	1008,37	232,40	238,06	149,54	160,53	167,53	91,59	110,94	43,30
MAGNESIO	4983137,67	1984874,17	15871453,12	19770929,86	943227,13	1080969,49	1161920,20	1041912,12	1048085,48	1094723,59
MANGANESO	26385,51	57003,08	66964,97	69692,67	14851,29	21456,06	18607,91	17244,01	16957,73	16917,14
MOLIBDENO	165,84	120,05	28,99	33,86	21,10	22,54	24,41	13,57	14,23	6,17
NIOBIO	27,11	20,05	5,42	5,47	3,37	3,58	3,92	2,12	3,24	1,48
NIQUEL	64,96	70,26	1333,20	1876,56	26,46	22,29	20,43	21,29	25,17	19,69
PLOMO	827,31	642,60	95,56	120,67	79,38	75,22	81,24	48,65	21,42	10,63
POTASIO	50908307,70	53675677,46	41604848,92	45480056,34	27942441,32	32854270,40	32721073,34	32449344,46	29873608,49	31430725,99
RUBIDIO	826,12	450,10	431,83	432,38	557,74	555,78	502,76	462,38	428,23	414,37
SELENIO	8,15	5,73	2,90	3,02	3,08	1,89	2,17	1,31	0,85	0,48
SODIO	60111650,61	63981294,84	12190048,10	12702333,77	10219933,17	8172202,15	9248611,79	9800714,59	6413155,14	4933078,29
TÁNTALO	2,84	2,36	1,85	0,90	0,76	0,70	0,69	0,53	0,50	0,62
TITANIO	609434,69	654131,51	157239,54	162642,36	87556,99	86604,64	91652,79	101838,43	62974,29	43458,00
TORIO	44,89	38,13	9,19	9,38	6,54	6,91	7,79	4,30	2,53	0,75
URANIO	0,06	0,03	0,00	0,03	0,23	0,16	0,11	0,14	0,79	0,22
VANADIO	51,01	41,67	33,84	40,17	8,63	7,33	7,80	4,79	6,10	4,04
WOLFRAMIO	16,79	15,44	15,00	20,00	3,70	3,34	2,81	2,50	6,34	3,08
YTRIO	100,76	74,73	18,89	18,91	12,13	12,58	14,07	7,68	9,59	3,51
ZIRCONIO	8514,80	6312,29	1522,31	1525,01	1049,97	1088,71	1239,80	681,75	834,06	221,35

Tabla 4. 2.- (Continuación). Contenido metálico en las muestras de orujo expresado en ng Kg<sup>-1</sup>

	O-23	O-24	O-25	O-27	O-28	O-29	O-30	O-31	O-32	O-33
ALUMINIO	209411,59	176619,80	147383,25	242979,42	167061,24	203883,53	204954,90	174111,40	185672,74	168229,85
ARSENICO	2,80	8,38	3,69	3,22	5,43	5,95	7,34	2,96	6,87	2,76
BARIO	314,23	901,61	406,67	343,32	592,67	642,60	804,09	332,87	700,67	294,50
CALCIO	5858312,11	3744416,49	3435104,11	5515801,48	5304110,37	5648197,21	4824287,89	5614064,45	4890537,41	4831852,25
CESIO	16,26	12,10	11,12	10,69	6,97	8,59	10,05	8,85	10,45	8,31
CINC	186,24	176,36	119,69	131,90	177,58	174,23	162,84	181,89	194,41	158,76
COBALTO	24,09	10,04	17,17	21,36	9,96	11,43	9,83	18,26	6,32	18,23
COBRE	401,98	236,37	201,36	243,34	388,95	319,63	211,49	226,91	221,59	233,64
CROMO	49,30	53,30	45,11	78,25	39,08	38,29	33,17	44,48	35,36	39,26
ESCANDIO	93,01	98,50	94,00	99,31	65,23	76,77	85,97	89,39	79,49	84,17
ESTAÑO	1,48	3,22	1,43	2,18	2,22	2,48	2,80	1,47	2,88	1,30
ESTRONCIO	256,13	333,89	274,07	215,78	321,91	312,27	309,82	291,17	293,58	245,38
GALIO	35,13	81,69	40,41	35,72	65,10	65,66	74,86	34,85	66,60	33,16
HAFNIO	22,59	40,74	27,43	24,13	25,48	28,35	33,06	20,63	30,64	20,70
HIERRO	238352,00	205421,44	171061,29	263928,53	176231,80	221677,17	225904,42	198113,34	208419,77	192759,65
LITIO	144,71	265,94	177,03	155,52	143,83	174,78	220,93	138,08	203,52	131,60
MAGNESIO	1320305,55	991524,16	794219,33	1278516,25	1351249,13	1566468,54	1625791,24	1209629,60	1044533,38	1084951,18
MANGANESO	20722,51	17813,57	14554,68	18282,57	29083,99	37501,04	41720,87	22166,78	19919,37	19047,07
MOLIBDENO	58,09	48,24	21,32	17,86	24,98	26,67	31,59	15,50	29,82	15,35
NIOBIO	7,82	6,02	5,04	4,94	3,77	4,49	4,97	4,30	4,65	4,62
NIQUEL	64,83	59,99	29,25	26,92	57,63	52,41	50,44	31,07	24,10	25,93
PLOMO	15,30	13,28	26,22	21,83	63,96	73,05	100,09	15,00	92,04	21,63
POTASIO	42358193,16	29652798,64	25778298,06	43894673,42	41169137,60	46708593,26	45810509,16	42361622,51	37791595,46	40960186,13
RUBIDIO	558,10	462,96	372,83	548,50	648,80	625,31	588,49	589,02	565,00	556,41
SELENIO	1,00	2,62	1,24	1,28	1,36	1,94	2,82	1,06	2,32	0,82
SODIO	16701509,00	17972970,00	17743361,34	17660021,89	9331188,95	13626569,43	15603281,33	14857309,63	13061627,50	14587364,56
TÁNTALO	0,54	0,81	0,54	0,57	0,55	0,62	0,66	0,46	0,92	0,58
TITANIO	137735,65	166064,18	141988,01	153113,98	89850,73	129583,38	150583,75	123731,08	130628,39	119665,36
TORIO	2,48	12,24	3,54	2,61	8,05	8,49	10,15	2,24	9,46	2,30
URANIO	0,14	0,12	0,06	0,05	0,04	0,09	0,06	0,04	0,06	0,05
VANADIO	8,19	9,02	7,71	9,07	6,72	7,49	8,19	8,21	8,48	7,18
WOLFRAMIO	7,97	9,60	2,83	3,06	11,39	7,49	2,78	4,34	4,16	3,18
YTRIO	12,46	22,58	14,81	13,74	13,53	15,68	18,55	11,78	17,28	11,35
ZIRCONIO	1113,95	1986,89	1345,42	1209,79	1233,96	1412,46	1654,99	1017,70	1502,24	989,47

Tabla 4.2.- (Continuación). Contenido metálico en las muestras de orujo expresado en ng Kg<sup>-1</sup>

	O-34	O-35	O-36	O-38	O-39	O-40	O-41	O-44	O-45	O-46
ALUMINIO	154084,69	184514,80	203539,87	244974,96	499742,33	537380,79	624015,53	424025,10	267564,25	242069,18
ARSENICO	3,10	6,08	5,39	5,83	7,57	3,47	7,26	8,95	6,30	3,55
BARIO	340,55	694,56	585,16	666,31	895,60	367,13	695,21	1070,78	714,62	377,76
CALCIO	4681036,84	4645255,86	6200687,08	4807817,77	3893781,89	4620904,11	4192223,44	4340795,46	3289185,24	3785901,85
CESIO	8,13	10,44	28,66	9,18	32,76	11,04	9,35	13,88	14,28	12,80
CINC	139,79	150,50	162,18	480,30	203,78	252,87	246,93	212,92	229,08	233,06
COBALTO	14,55	8,92	9,98	55,19	13,65	25,78	37,18	12,39	21,26	29,62
COBRE	212,09	196,40	261,98	549,05	496,03	561,23	750,41	743,51	616,73	476,34
CROMO	58,65	39,31	37,26	627,87	90,87	83,41	139,14	77,35	72,90	65,66
ESCANDIO	73,72	75,67	66,36	356,33	101,81	103,76	78,72	114,38	108,54	102,86
ESTAÑO	1,49	2,62	3,09	145,47	5,07	3,65	4,51	6,64	4,96	3,44
ESTRONCIO	224,76	239,98	251,48	501,71	294,04	288,20	327,40	385,84	272,96	162,58
GALIO	35,28	65,18	53,58	60,40	72,64	35,17	66,18	86,19	62,72	36,69
HAFNIO	20,06	29,82	25,64	26,60	37,92	23,75	27,59	44,22	34,24	24,48
HIERRO	172678,79	203641,95	223433,32	258890,08	517599,68	579447,08	644235,99	459896,22	290750,40	264562,10
LITIO	127,67	192,39	162,12	318,71	291,19	187,60	203,91	328,15	251,05	175,37
MAGNESIO	1047536,98	1125782,20	1445867,11	1413227,83	1861983,60	2045450,29	2441513,27	1930445,31	1294776,72	1290309,71
MANGANESO	18904,19	24210,84	28483,03	24701,66	44065,10	42635,83	44347,87	50478,29	29105,44	23098,07
MOLIBDENO	17,47	28,06	23,56	453,25	60,92	18,48	28,13	43,81	31,36	18,04
NIOBIO	3,77	4,31	3,74	3,97	9,42	5,29	5,05	6,84	6,00	5,09
NIQUEL	25,48	31,33	32,36	2058,28	99,07	65,57	93,19	48,65	56,70	63,09
PLOMO	29,57	87,24	68,25	74,35	112,79	147,85	122,36	194,20	84,62	32,17
POTASIO	38544836,00	40032779,55	50775541,03	40298494,17	53435982,67	63396351,29	52835447,16	50665314,53	41946397,15	50424882,57
RUBIDIO	569,78	723,70	776,76	1763,93	510,57	627,01	553,57	516,87	637,20	737,27
SELENIO	1,13	2,03	1,97	2,44	2,29	1,42	2,23	2,93	2,14	1,37
SODIO	12312050,55	12884890,66	12446749,57	11519035,24	21447415,16	21915000,70	13090249,36	22478800,15	16069469,70	18098045,94
TÁNTALO	0,46	0,61	0,72	0,53	0,96	0,61	0,66	0,82	1,06	0,72
TITANIO	108706,48	130836,73	132666,12	120319,81	225375,28	202661,01	151722,85	224116,16	149498,21	145364,93
TORIO	3,26	9,21	7,76	7,80	11,20	7,80	9,02	13,02	7,59	2,52
URANIO	0,01	0,03	0,03	0,05	0,09	0,04	0,03	0,07	0,13	0,04
VANADIO	6,69	7,60	7,09	8,56	15,18	15,38	17,63	15,44	12,14	9,21
WOLFRAMIO	5,34	12,11	9,06	32,78	19,74	23,37	14,31	16,40	18,73	20,23
YTRIO	10,81	16,10	13,63	14,84	22,66	14,88	17,99	26,39	20,42	14,55
ZIRCONIO	963,24	1428,89	1210,78	2688,65	1901,76	1172,86	1383,46	2216,98	1726,99	1213,45

Tabla 4.2. -(Continuación). - Contenido metálico en las muestras de orujo expresado en ng Kg<sup>-1</sup>

	O-46	O-47	O-48	O-49	O-50	O-51	O-52	O-53	O-54	O-55
ALUMINIO	242069,18	366416,21	277798,86	336733,81	286409,79	251411,17	262344,67	2395502,37	2447153,88	2609025,78
ARSENICO	3,55	6,09	7,51	4,47	2,82	8,71	8,58	3,91	7,50	5,31
BARIO	377,76	644,14	808,87	451,25	553,63	690,91	707,48	560,28	743,64	483,26
CALCIO	3785901,85	5063135,04	3931146,40	4573908,05	4198875,61	2520274,93	2924875,50	1795778,30	1920030,08	2473552,39
CESIO	12,80	33,43	30,49	40,80	10,00	18,11	13,32	8,78	10,12	7,51
CINC	233,06	216,91	239,96	195,33	154,22	313,94	262,53	232,30	195,32	184,70
COBALTO	29,62	20,55	21,22	20,73	19,42	44,58	38,63	85,16	67,03	55,81
COBRE	476,34	501,58	533,71	488,00	386,16	707,54	583,11	518,59	439,41	407,47
CROMO	65,66	72,74	73,85	72,13	206,01	251,11	162,10	2457,28	2036,84	1629,93
ESCANDIO	102,86	94,39	104,30	84,10	132,78	162,89	114,93	113,83	104,20	73,38
ESTAÑO	3,44	3,77	4,44	3,08	2,16	2,94	2,53	2,68	4,18	2,55
ESTRONCIO	162,58	174,54	198,82	150,06	145,65	175,78	138,46	204,06	200,02	165,00
GALIO	36,69	56,14	69,53	41,32	28,58	61,51	56,34	25,10	48,04	32,25
HAFNIO	24,48	29,32	35,46	23,60	17,12	28,76	26,67	17,55	33,42	22,22
HIERRO	264562,10	387731,88	299695,61	365078,44	307468,38	272540,27	289674,66	2422452,29	2551630,22	2619768,16
LITIO	175,37	214,04	252,70	170,17	240,47	232,23	210,68	155,85	257,58	161,90
MAGNESIO	1290309,71	1542706,26	1317066,46	1255604,01	1275281,55	1280955,74	1262152,58	13261732,10	13758776,69	13747820,75
MANGANESO	23098,07	28258,67	22872,47	22363,50	17949,41	15706,39	20519,42	36896,99	40381,78	42631,54
MOLIBDENO	18,04	27,07	33,96	19,75	12,47	23,17	21,61	10,79	24,78	57,85
NIOBIO	5,09	5,20	5,85	4,46	3,51	6,34	4,77	4,45	5,65	4,48
NIQUEL	63,09	65,57	70,28	62,13	51,72	142,55	100,29	1618,33	1330,06	1217,17
PLOMO	32,17	78,80	104,60	48,68	151,84	106,49	172,45	29,79	99,73	72,99
POTASIO	50424882,57	60902641,63	47611867,27	51722237,34	43062746,78	38062074,89	50913034,67	33328131,80	35077247,20	46817101,24
RUBIDIO	737,27	677,63	801,04	555,52	598,53	659,15	487,18	371,36	334,83	314,93
SELENIO	1,37	1,69	2,60	1,41	1,12	2,48	2,25	1,19	2,25	1,48
SODIO	18098045,94	19717885,42	16668495,77	15195814,13	13034296,73	11406087,16	12939395,61	9856637,52	13818720,74	12729417,09
TÁNTALO	0,72	0,70	0,81	0,58	0,38	6,55	3,62	0,52	0,89	0,84
TITANIO	145364,93	185511,90	153708,16	132257,33	116757,01	88114,63	107780,35	96395,72	137136,99	131440,57
TORIO	2,52	6,74	8,86	4,15	1,87	7,02	8,42	2,65	10,67	6,56
URANIO	0,04	0,04	0,04	0,06	0,04	0,03	0,04	0,02	0,07	0,00
VANADIO	9,21	10,56	11,35	10,10	8,16	16,09	11,93	49,59	43,78	35,69
WOLFRAMIO	20,23	41,80	43,12	44,14	13,68	22,92	19,78	13,85	16,13	17,33
YTRIO	14,55	18,10	21,30	14,24	9,95	18,72	16,51	11,87	20,06	13,63
ZIRCONIO	1213,45	1521,72	1764,20	1157,66	1079,86	1498,97	1334,56	1102,57	1572,21	1001,41

Tabla 4.2. -(Continuación). - Contenido metálico en las muestras de orujo expresado en ng Kg<sup>-1</sup>

	O-56	O-57	O-58	O-59	O-60	O-61	O-62	O-63	O-64	O-65
ALUMINIO	3740802,27	3875009,00	1821612,74	575122,61	744629,38	3479217,84	3521464,32	3590138,55	596915,35	466092,65
ARSENICO	11,07	3,09	4,46	3,28	7,76	4,87	4,93	3,14	5,54	3,36
BARIO	1083,44	548,32	418,21	326,43	802,74	501,42	517,71	409,22	525,96	282,57
CALCIO	3052257,43	2878287,71	1926190,56	1655907,10	2143955,15	2483689,90	2290501,67	2433592,35	3041327,69	2680124,46
CESIO	13,51	5,94	7,64	9,12	10,91	8,87	8,86	6,31	9,86	8,42
CINC	213,60	172,91	131,28	152,25	175,60	157,43	125,18	132,20	116,24	97,27
COBALTO	80,97	82,64	37,32	18,40	74,82	70,79	51,75	67,76	16,05	17,66
COBRE	422,27	340,11	269,34	369,50	282,56	208,34	164,94	183,26	175,08	145,23
CROMO	2640,24	2296,07	964,40	1325,63	2405,60	2270,18	1741,34	2033,39	95,35	82,67
ESCANDIO	119,72	59,92	58,02	62,37	82,63	52,47	48,84	35,00	54,45	47,85
ESTAÑO	3,45	1,25	1,83	1,81	2,77	2,11	1,92	1,50	2,15	1,91
ESTRONCIO	216,31	125,50	136,57	166,41	179,22	79,77	75,08	56,95	210,28	191,41
GALIO	58,77	14,71	25,93	22,56	44,25	30,32	28,64	18,63	28,89	17,35
HAFNIO	46,46	11,94	20,81	20,84	34,98	21,87	22,42	13,19	24,09	17,57
HIERRO	3817253,95	3911941,34	1815630,70	604181,26	782252,53	3643902,03	3526671,19	3592154,20	631783,87	486838,36
LITIO	331,44	138,02	145,23	139,79	230,56	129,84	142,09	70,88	174,90	127,59
MAGNESIO	20639288,91	21751689,01	8934129,05	1343100,63	1738954,74	21723643,70	20373932,27	21044432,55	20929218,21	19085344,29
MANGANESO	49106,65	47909,48	32263,63	26029,31	33700,97	33990,96	34535,74	36104,67	32558,53	26825,32
MOLIBDENO	34,93	6,90	13,16	11,32	24,06	15,38	15,85	9,09	15,35	9,60
NIOBIO	7,05	2,91	3,74	4,32	5,39	3,07	3,11	1,86	4,18	3,41
NIQUEL	1683,07	1436,83	919,31	1068,51	1552,61	1459,62	1120,78	1287,97	74,56	59,97
PLOMO	123,78	41,76	59,43	28,15	122,61	82,23	79,26	58,41	74,95	23,44
POTASIO	56907369,62	51247398,41	35445553,74	36280061,61	46972939,96	46157988,86	45092804,32	46257046,52	49720958,87	44324763,87
RUBIDIO	424,10	311,38	255,58	288,17	372,59	319,89	271,56	281,18	566,56	494,33
SELENIO	2,86	0,93	1,37	1,28	2,32	1,37	1,42	0,95	1,56	0,88
SODIO	21866425,01	10471983,54	13853238,68	15005615,96	19428244,22	13211273,93	15552250,86	8044967,16	16661541,81	15609777,68
TÁNTALO	1,00	1,42	0,51	0,58	0,78	0,60	0,49	0,47	0,58	0,46
TITANIO	194618,32	109474,88	129029,34	133078,40	172300,80	112212,12	124972,11	76460,03	138241,73	111692,03
TORIO	15,02	1,70	5,32	2,90	11,40	7,09	7,00	4,13	6,68	2,41
URANIO	0,03	0,01	0,00	0,03	0,02	0,00	0,02	0,02	0,00	0,03
VANADIO	51,43	38,97	24,99	19,70	44,92	30,93	24,82	25,81	14,22	11,13
WOLFRAMIO	21,32	18,25	13,17	15,11	19,95	8,46	5,92	8,12	74,48	57,91
YTRIO	27,47	7,90	12,43	12,43	20,19	11,74	12,34	6,86	15,67	11,26
ZIRCONIO	2158,08	1719,19	798,31	1153,03	1568,27	961,61	977,18	834,95	1072,32	762,40

Tabla 4.2. -(Continuación). - Contenido metálico en las muestras de orujo expresado en ng Kg<sup>-1</sup>

	O-66	O-67	O-69	O-70	O-71	O-72	O-73	O-74	O-75	O-77
ALUMINIO	577495,35	560129,32	1038421,79	687428,60	1090517,54	1279876,96	1240050,29	1307795,90	965044,00	1296994,24
ARSENICO	6,87	6,32	5,75	3,06	12,72	2,87	11,84	9,58	22,39	5,13
BARIO	732,38	657,63	633,63	540,16	1051,93	1467,28	1786,21	1361,18	5544,84	474,76
CALCIO	4011015,09	3254233,25	4748382,89	4605616,68	5278943,52	5938404,70	4880373,35	4542509,54	4319836,07	6391143,26
CESIO	10,19	10,27	9,21	6,30	18,80	18,89	36,06	36,02	46,49	10,05
CINC	123,38	151,51	132,22	146,10	151,11	154,66	126,32	112,61	134,05	95,96
COBALTO	14,00	12,30	7,44	13,32	10,30	40,49	47,18	57,83	11,30	17,75
COBRE	178,58	148,32	132,79	131,97	152,93	175,58	153,14	152,42	161,30	115,83
CROMO	64,36	75,83	55,72	51,97	145,55	121,55	187,85	203,93	138,21	66,31
ESCANDIO	56,16	50,52	44,38	32,68	88,82	153,49	196,92	212,08	194,32	22,47
ESTAÑO	2,33	3,65	3,00	2,21	5,22	5,36	7,67	6,92	11,29	1,38
ESTRONCIO	259,02	207,61	188,98	165,32	279,33	333,86	424,89	445,00	453,12	189,33
GALIO	36,66	41,00	37,12	20,85	74,30	22,65	82,03	71,06	129,89	29,65
HAFNIO	29,01	27,02	26,26	14,29	61,00	57,45	95,66	80,83	135,42	15,00
HIERRO	600182,68	573746,35	1054551,75	712352,03	1158022,07	1301114,72	1368856,15	1412644,82	1063626,74	1352568,32
LITIO	211,67	180,11	170,95	153,15	383,77	743,18	693,03	652,73	1034,83	80,07
MAGNESIO	4618968,72	24735060,42	9047174,74	5446912,86	6844598,70	14019358,12	10326054,08	10689332,95	7163865,97	5989259,76
MANGANESO	18781,06	29133,39	24148,06	21513,04	27541,06	26854,67	25402,98	23757,60	21939,27	30121,37
MOLIBDENO	19,45	18,20	18,30	8,28	80,95	46,38	63,15	52,50	117,40	10,23
NIOBIO	4,27	7,06	5,59	4,56	11,92	7,88	23,58	24,41	26,87	4,09
NIQUEL	59,48	34,55	27,00	25,11	98,56	53,86	57,40	64,70	36,66	45,86
PLOMO	128,13	88,26	85,15	27,49	178,86	67,90	245,90	66,22	182,99	87,26
POTASIO	44708826,57	52808842,88	54914342,79	50204023,14	57527704,78	57567345,70	62763868,53	58159455,40	42683814,79	49281797,90
RUBIDIO	545,26	555,60	469,95	440,90	554,69	651,35	510,44	455,65	435,05	469,60
SELENIO	2,10	1,52	1,82	0,53	2,86	0,73	2,61	2,20	5,04	1,25
SODIO	10770258,75	15224098,57	15224775,19	16079531,39	36186401,13	2714022,38	78329632,36	75308076,47	84544381,17	9516713,80
TÁNTALO	0,63	1,98	1,00	1,07	1,19	3,77	1,30	1,07	1,07	0,46
TITANIO	126800,09	128858,71	231370,37	190571,43	401464,33	237407,33	681000,22	612801,63	751042,90	247905,75
TORIO	9,34	9,49	9,14	3,20	20,48	3,70	18,62	10,84	42,36	5,65
URANIO	0,02	0,05	0,05	0,05	0,23	0,07	0,28	0,18	0,05	0,06
VANADIO	13,30	33,73	21,85	19,61	38,73	39,00	64,20	72,29	55,81	20,38
WOLFRAMIO	40,95	23,92	20,96	21,91	23,33	26,59	22,74	23,41	17,06	29,72
YTRIO	18,21	17,71	16,01	8,92	38,49	6,87	64,04	59,71	95,08	11,55
ZIRCONIO	1280,16	1181,98	1177,29	880,69	1554,31	4005,91	4934,93	4534,77	7454,80	658,87

Tabla 4.2. -(Continuación). - Contenido metálico en las muestras de orujo expresado en ng Kg<sup>-1</sup>

	O-78	O-79	O-80	O-81	O-88	O-89	O-90	O-91	O-92	O-93
<b>ALUMINIO</b>	1260617,33	703836,55	810807,70	1123219,38	1188920,78	443787,24	536763,47	241204,22	516724,18	388267,94
<b>ARSENICO</b>	7,65	1,94	2,64	4,84	13,99	4,17	11,90	3,21	9,52	6,30
<b>BARIO</b>	470,75	172,76	272,34	601,72	2210,18	2035,95	2165,14	1737,96	1738,50	1132,09
<b>CALCIO</b>	6533255,29	6331290,00	6638649,93	6029980,47	6382697,10	7889690,56	7993659,44	7935705,76	7039265,13	6572375,79
<b>CESIO</b>	23,24	8,03	9,62	19,70	28,74	21,46	29,68	11,52	24,97	20,74
<b>CINC</b>	95,93	77,62	66,64	76,31	111,10	77,12	97,29	81,13	78,70	68,86
<b>COBALTO</b>	18,65	21,62	16,48	25,23	13,58	36,36	10,90	9,50	8,54	13,32
<b>COBRE</b>	133,06	92,48	105,06	101,51	135,25	96,64	121,26	88,67	91,65	87,67
<b>CROMO</b>	83,44	38,93	40,26	84,53	75,70	69,78	54,20	18,88	45,33	42,96
<b>ESCANDIO</b>	54,16	14,93	14,95	49,06	81,58	71,43	78,50	19,25	59,28	50,42
<b>ESTAÑO</b>	2,62	0,61	0,78	1,63	5,28	1,61	5,18	0,93	3,61	2,40
<b>ESTRONCIO</b>	285,24	138,63	143,76	199,50	321,55	224,99	325,64	175,82	259,93	216,92
<b>GALIO</b>	46,75	11,43	16,87	30,71	83,43	31,83	69,52	22,79	54,61	40,73
<b>HAFNIO</b>	57,86	5,91	8,65	32,87	92,13	49,65	82,57	17,41	67,02	48,76
<b>HIERRO</b>	1331956,56	719618,90	822929,39	1174750,96	1243466,64	536421,89	641860,51	283986,06	629862,16	469252,84
<b>LITIO</b>	138,09	34,20	41,67	160,97	444,54	238,13	452,70	214,64	341,41	238,61
<b>MAGNESIO</b>	5690638,71	4125137,96	4209951,26	3823023,94	4046647,23	1699850,69	1723787,01	1751380,37	1533304,18	1400414,47
<b>MANGANESO</b>	31075,42	24486,53	24501,72	25977,16	27496,66	26808,81	29380,81	25650,48	28273,87	22476,11
<b>MOLIBDENO</b>	31,63	3,26	5,67	17,15	67,65	26,28	59,16	12,30	49,21	33,27
<b>NIOBIO</b>	12,65	2,35	2,44	7,53	14,30	9,66	12,57	2,54	10,04	7,63
<b>NIQUEL</b>	36,88	20,55	18,04	34,82	18,53	18,11	13,22	5,64	10,16	9,97
<b>PLOMO</b>	88,83	35,69	50,47	68,89	59,06	52,35	51,22	64,08	34,08	16,39
<b>POTASIO</b>	61428609,53	44588976,02	45617903,51	46380605,57	49093584,65	75159906,40	72049038,19	61447558,17	67377243,31	59381572,43
<b>RUBIDIO</b>	490,60	428,71	433,20	467,83	549,34	509,47	563,21	518,73	491,32	463,50
<b>SELENIO</b>	1,77	0,48	0,73	1,23	2,98	0,90	2,69	0,92	2,10	1,36
<b>SODIO</b>	53093422,84	6609298,55	6094015,87	29408961,41	31129204,09	64071759,60	73841203,40	15635115,26	65965113,94	51698664,92
<b>TÁNTALO</b>	0,54	0,23	0,53	0,47	1,67	0,98	1,40	0,36	1,09	0,84
<b>TITANIO</b>	520028,96	155458,05	183718,26	388164,18	410869,39	499232,39	674036,53	153122,26	601867,46	437082,94
<b>TORIO</b>	9,13	1,18	3,21	5,33	31,85	5,59	26,35	5,52	21,63	13,02
<b>URANIO</b>	0,45	0,03	0,04	0,04	0,04	0,03	0,02	0,04	0,43	0,05
<b>VANADIO</b>	30,48	11,58	11,85	22,73	18,68	13,49	17,29	4,85	13,41	10,72
<b>WOLFRAMIO</b>	40,75	14,15	14,17	26,59	7,19	4,16	4,53	2,19	3,40	2,85
<b>YTRIO</b>	35,94	5,32	6,44	20,63	54,52	28,22	50,81	9,66	41,60	29,04
<b>ZIRCONIO</b>	1143,50	197,89	284,30	1257,45	4457,89	2335,00	4093,57	3372,09	3253,76	2318,73

Tabla 4.2. -(Continuación). - Contenido metálico en las muestras de orujo expresado en ng Kg<sup>-1</sup>

	O-94	O-95	O-96
ALUMINIO	289044,62	389046,68	391129,62
ARSENICO	2,94	1,33	1,78
BARIO	1430,17	1424,63	1351,21
CALCIO	7556601,83	8356571,51	8921956,05
CESIO	11,45	12,16	9,79
CINC	71,78	71,77	70,83
COBALTO	9,66	15,51	11,32
COBRE	92,17	83,22	86,51
CROMO	16,21	24,67	31,26
ESCANDIO	17,04	19,58	25,23
ESTAÑO	0,76	0,32	0,66
ESTRONCIO	139,84	176,81	163,28
GALIO	21,39	11,07	11,94
HAFNIO	15,12	11,37	8,12
HIERRO	302599,19	413659,02	404220,69
LITIO	215,08	206,67	176,79
MAGNESIO	1629981,81	1891121,48	1934514,04
MANGANESO	22382,16	26090,00	26866,13
MOLIBDENO	24,84	21,55	19,70
NIOBIO	2,12	2,17	1,27
NIQUEL	5,55	6,65	5,83
PLOMO	58,30	20,02	33,32
POTASIO	57710669,29	70720655,13	68047850,85
RUBIDIO	471,74	568,95	516,28
SELENIO	1,24	0,26	0,76
SODIO	15076154,59	17698955,12	8500731,27
TÁNTALO	0,31	0,28	0,18
TITANIO	140197,27	153001,21	100652,38
TORIO	4,74	1,31	2,51
URANIO	0,03	0,06	0,03
VANADIO	3,87	5,42	4,74
WOLFRAMIO	1,92	2,85	5,13
YTRIO	8,19	6,23	4,53
ZIRCONIO	2117,89	2023,96	1676,43

Tabla 4.3.- Contenido metálico en las muestras de aceite expresado en ng Kg<sup>-1</sup>

	A-1	A-2	A-3	A-4	A-5	A-6	A-7	A-10	A-11	A-12	A-13	A-14	A-15
ALUMINIO	724,39	406,01	218,76	550,92	415,28	195,43	41,31	212,18	209,18	309,73	539,75	82,77	61,73
ARSENICO	12,28	10,82	1,39	11,44	10,55	8,64	0,54	9,62	0,39	8,85	9,94	8,46	0,09
BARIO	19,28	16,54	2,96	15,00	10,38	9,31	0,00	23,44	10,36	10,86	12,67	16,78	0,00
CALCIO	4810,31	5653,77	17610,59	16538,03	2391,26	3502,83	3731,45	7758,74	8946,60	8245,06	7381,84	6673,91	5832,01
CESIO	2,94	1,06	0,16	0,05	0,00	0,00	0,02	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,01
CINC	390,80	389,57	250,49	451,40	132,09	174,54	0,00	514,64	113,34	368,05	188,92	332,66	0,00
COBALTO	20,77	7,57	10,43	9,23	6,11	6,28	9,90	4,06	4,35	1,97	2,29	3,87	3,47
COBRE	81,58	57,69	38,30	80,00	43,61	42,99	29,49	48,13	38,31	46,34	49,89	46,11	28,43
CROMO	119,92	300,11	73,98	165,26	120,95	31,10	33,90	204,55	33,41	111,00	132,82	112,75	17,91
ESCANDIO	2,15	1,81	0,08	1,74	1,99	2,02	0,00	1,94	0,00	1,88	1,90	2,17	0,00
ESTAÑO	47,58	33,95	35,95	26,18	23,36	18,32	17,32	15,53	14,68	14,72	18,75	11,68	23,35
ESTROCIO	6,19	8,32	0,00	30,86	8,24	3,91	0,00	7,87	0,00	5,28	18,88	4,34	0,00
GALIO	4,61	3,26	0,73	3,07	2,08	1,82	0,00	4,23	1,57	2,18	2,60	17,41	0,00
HAFNIO	0,25	0,18	0,31	0,16	0,12	0,15	0,19	0,16	0,16	0,14	0,12	0,09	0,06
HIERRO	772,71	481,67	543,80	711,63	371,25	350,22	261,48	324,20	456,63	415,79	672,38	325,27	287,90
LITIO	8,99	4,12	11,01	16,10	5,88	8,89	2,92	9,80	6,93	3,44	4,56	3,05	3,71
MAGNESIO	994,59	577,76	970,61	1191,28	495,68	951,54	820,97	881,21	1509,47	1503,22	1440,46	1241,38	1419,25
MANGANESO	176,92	182,31	6,15	194,63	180,19	174,61	0,00	162,01	5,04	184,25	185,08	179,33	108,13
MOLIBDENO	195,47	227,38	23,51	35,79	16,48	8,30	0,00	102,21	0,00	7,23	7,06	4,68	0,00
NIOBIO	2,34	3,31	4,26	1,30	0,72	0,51	0,83	1,31	0,00	0,38	0,35	0,30	0,00
NIQUEL	172,35	98,73	315,46	154,90	81,80	60,37	57,12	444,82	81,44	40,43	51,35	37,74	44,52
PLOMO	72,77	55,93	93,70	52,85	40,18	87,98	86,16	35,12	46,52	22,44	19,20	26,71	32,07
POTASIO	10013,30	3939,24	23730,57	9389,35	3166,49	13999,43	16774,30	12149,02	19313,71	9190,77	8310,12	7699,54	8883,83
RUBIDIO	12,81	11,48	2,15	12,48	6,71	6,77	1,12	6,28	2,66	3,00	1,78	0,23	1,18
SELENIO	17,04	17,60	3,57	19,08	18,44	14,83	3,09	15,72	2,82	14,91	18,40	14,75	2,24
SODIO	36782,57	21877,23	21521,92	19489,70	12751,61	11348,58	12865,27	9075,09	13639,31	7011,31	6594,19	6147,36	8292,60
TANTALO	1,85	0,80	1,15	0,59	0,37	0,35	0,24	0,49	0,11	0,31	0,24	0,25	0,02
TITANIO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TORIO	0,23	0,10	0,02	0,11	0,10	0,08	0,00	0,06	0,00	0,07	0,17	0,06	0,00
URANIO	0,06	0,05	0,06	0,06	0,05	0,03	0,01	0,03	0,00	0,03	0,06	0,03	0,00
VANADIO	23,16	23,84	5,86	25,25	21,92	15,14	4,55	21,69	3,71	19,43	23,59	19,42	3,69
WOLFRAMIO	15,62	12,09	155,61	8,24	4,69	49,27	90,08	3,46	49,99	4,89	2,35	1,55	33,26
YTRIO	0,25	0,18	0,15	0,31	0,16	0,13	0,03	0,13	0,03	0,25	0,27	0,12	0,05
ZIRCONIO	5,39	5,93	8,16	7,00	5,81	7,36	5,52	7,32	4,96	6,55	5,42	4,51	1,87

Tabla 4.3. -(Continuación). - Contenido metálico en las muestras de aceite expresado en ng Kg<sup>-1</sup>

	A-16	A-17	A-18	A-19	A-20	A-21	A-22	A-23	A-24	A-25	A-27	A-28	A-29	A-30
<b>ALUMINIO</b>	314,27	3060,62	3271,27	1923,98	2766,75	2161,70	2923,47	3112,82	1802,77	1996,98	628,41	336,74	351,33	277,22
<b>ARSENICO</b>	8,48	12,74	10,45	9,84	9,42	2,54	9,33	9,79	10,84	8,67	6,42	7,13	0,40	8,21
<b>BARIO</b>	9,81	222,40	66,46	34,34	39,38	45,79	60,55	39,36	38,91	17,13	45,42	10,45	11,73	10,93
<b>CALCIO</b>	5549,64	22027,89	22528,74	14399,31	15749,86	23732,46	23810,23	17521,77	18376,51	23572,91	10123,75	7644,60	5781,38	9544,95
<b>CESIO</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
<b>CINC</b>	340,89	774,63	681,02	455,32	573,94	143,82	452,93	420,13	311,87	354,63	174,34	262,75	15,66	351,46
<b>COBALTO</b>	3,46	9,50	7,84	5,98	9,97	8,23	8,10	10,56	7,94	18,22	7,91	5,86	9,35	6,49
<b>COBRE</b>	39,71	146,10	101,87	82,62	85,29	88,68	104,99	67,20	85,81	48,50	26,57	24,15	33,44	35,06
<b>CROMO</b>	82,75	450,74	182,64	109,31	75,95	29,04	420,02	87,06	125,04	447,39	237,64	102,73	56,04	73,57
<b>ESCANDIO</b>	1,54	2,25	1,49	1,20	1,53	0,91	1,82	1,69	0,77	1,58	0,70	0,78	0,00	0,96
<b>ESTAÑO</b>	11,96	16,95	14,16	10,75	8,95	75,29	11,90	8,56	9,75	7,10	4,45	5,11	8,56	7,42
<b>ESTROCIO</b>	4,27	37,81	19,69	29,01	16,61	48,51	32,14	24,52	26,30	13,02	12,19	5,55	0,00	7,51
<b>GALIO</b>	1,92	16,98	13,40	6,87	8,04	7,86	11,44	7,90	7,39	3,95	8,39	2,12	1,91	1,94
<b>HAFNIO</b>	0,05	0,35	0,14	0,09	0,15	0,44	0,15	0,10	0,11	0,05	0,06	0,05	0,09	0,30
<b>HIERRO</b>	300,55	3018,30	3400,66	1802,01	2742,71	2432,54	2876,90	1912,25	1867,32	2147,13	665,22	643,19	509,20	366,34
<b>LITIO</b>	2,74	6,81	4,80	8,31	6,12	11,90	9,95	15,83	18,46	7,79	5,27	3,63	4,04	5,32
<b>MAGNESIO</b>	1280,95	1317,13	1615,38	957,23	1162,60	1390,89	1427,21	698,80	1129,51	1217,70	877,68	538,85	708,55	544,06
<b>MANGANESO</b>	181,12	242,60	265,64	182,66	207,18	64,59	225,33	172,55	198,58	208,27	194,86	167,93	8,72	152,78
<b>MOLIBDENO</b>	4,34	256,52	267,09	94,62	55,52	0,00	627,42	107,16	99,22	516,42	206,65	55,67	0,00	8,31
<b>NIOBIO</b>	0,24	6,78	3,37	2,05	1,70	4,52	14,72	0,50	0,42	33,86	1,86	0,56	0,05	1,60
<b>NIQUEL</b>	32,52	123,97	70,62	112,86	58,86	76,17	102,03	46,86	35,95	212,24	329,36	223,38	79,35	25,77
<b>PLOMO</b>	28,53	80,54	91,45	61,72	107,01	69,28	46,91	47,40	36,52	49,53	41,51	35,21	84,56	54,35
<b>POTASIO</b>	6963,02	5747,14	7704,21	4313,40	4889,79	5941,26	9279,01	9301,36	7937,16	7913,08	1893,32	3066,78	1968,32	2211,39
<b>RUBIDIO</b>	0,00	0,45	0,00	0,00	0,00	4,19	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,88	0,00
<b>SELENIO</b>	14,12	16,25	15,24	13,21	14,22	2,85	13,35	12,62	14,62	13,95	11,01	11,29	3,74	14,57
<b>SODIO</b>	4752,77	13337,73	12362,09	8559,52	11158,51	12984,89	10004,82	9533,24	9060,99	9363,84	3151,63	4268,87	3651,72	5985,04
<b>TANTALO</b>	0,17	1,80	0,50	0,53	0,38	0,66	0,46	0,39	0,67	0,15	0,20	0,23	0,12	2,42
<b>TITANIO</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<b>TORIO</b>	0,03	0,48	0,24	0,16	0,37	1,36	0,47	0,20	0,23	0,10	0,11	0,08	0,14	0,25
<b>URANIO</b>	0,03	0,23	0,16	0,11	0,14	0,79	0,22	0,14	0,12	0,06	0,05	0,04	0,09	0,06
<b>VANADIO</b>	19,17	28,85	23,91	23,05	23,22	9,77	23,26	21,81	24,77	18,76	16,15	16,00	3,98	19,54
<b>WOLFRAMIO</b>	1,13	13,27	6,15	12,97	11,19	57,59	7,94	5,49	4,87	3,08	1,76	0,97	21,35	5,34
<b>YTRIO</b>	0,11	1,03	0,63	0,52	0,77	1,55	0,94	0,56	0,57	0,23	0,20	0,17	0,14	0,22
<b>ZIRCONIO</b>	2,59	7,37	4,20	2,95	4,91	12,39	6,41	3,95	3,73	2,72	2,57	2,31	2,83	3,18

Tabla 4.3. -(Continuación). - Contenido metálico en las muestras de aceite expresado en ng Kg<sup>-1</sup>

	A-33	A-34	A-35	A-36	A-38	A-39	A-40	A-41	A-44	A-45	A-46	A-47	A-48	A-49
ALUMINIO	478,65	707,61	143,65	630,72	337,47	559,66	294,07	551,63	312,42	217,93	623,24	157,23	90,99	179,75
ARSENICO	7,99	0,16	7,40	7,85	8,06	7,54	7,98	7,51	8,06	1,28	8,58	1,33	8,20	10,59
BARIO	22,83	2,87	10,44	11,95	12,00	12,99	9,27	10,45	23,26	11,63	10,57	0,00	7,39	13,99
CALCIO	9982,45	5806,94	7127,65	7397,68	10338,28	13938,36	11518,23	9806,52	3474,33	4069,86	3378,01	2019,83	1612,53	2324,00
CESIO	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00	0,23	0,00	0,00
CINC	450,44	17,79	153,20	300,67	350,16	221,36	258,03	265,36	177,43	93,68	107,29	0,00	182,47	231,66
COBALTO	20,47	9,51	7,74	9,63	9,38	10,59	8,14	9,24	56,00	11,30	6,41	11,25	5,61	7,40
COBRE	51,62	36,79	26,06	31,47	27,41	26,38	21,22	23,52	44,54	39,97	26,30	23,08	25,84	60,27
CROMO	70,64	87,61	97,41	78,10	82,10	84,56	69,17	68,09	292,33	280,44	109,32	28,76	101,76	101,90
ESCANDIO	0,81	0,00	0,89	0,79	1,15	1,08	0,79	0,91	0,94	0,00	0,70	0,00	0,40	0,54
ESTAÑO	4,95	8,09	7,12	10,47	13,70	13,32	12,57	10,55	8,40	4,60	8,48	4,73	6,64	8,13
ESTROCIO	8,34	0,00	5,12	5,30	9,45	32,24	4,75	4,90	9,39	0,00	4,66	0,00	5,40	9,05
GALIO	4,40	0,20	1,80	2,04	2,40	2,67	1,66	1,95	5,44	1,50	1,95	0,00	1,35	2,44
HAFNIO	0,07	0,10	0,09	0,11	0,08	0,07	0,06	0,06	0,29	0,11	0,13	0,12	0,09	0,09
HIERRO	647,66	649,61	510,53	656,64	625,93	757,82	501,33	770,49	654,77	560,25	594,37	351,28	469,27	745,44
LITIO	3,10	2,85	7,28	2,27	2,78	7,78	3,19	3,89	3,46	5,61	3,38	2,54	0,85	2,77
MAGNESIO	1079,82	992,90	859,26	601,04	557,54	722,96	560,38	380,75	556,55	740,20	621,68	402,11	358,90	426,98
MANGANESO	173,15	22,47	182,82	177,93	171,26	168,07	186,12	173,48	247,02	171,87	187,95	20,69	166,64	180,95
MOLIBDENO	121,33	80,35	28,17	22,08	10,80	10,87	6,95	7,14	241,20	412,56	151,16	0,00	38,74	43,48
NIOBIO	42,87	0,52	0,43	0,45	0,24	0,22	0,19	0,19	174,83	3,11	1,42	0,00	0,53	0,61
NIQUEL	101,73	487,42	90,44	78,23	50,85	63,95	38,00	42,38	1171,33	1711,46	192,90	143,82	67,02	151,32
PLOMO	53,08	163,27	56,91	62,61	60,20	52,46	52,65	57,42	58,95	131,31	51,16	102,56	41,94	66,82
POTASIO	2223,19	3235,96	3848,32	1797,11	5419,51	5278,74	5182,76	5932,74	6782,62	8043,67	6723,47	2868,06	1753,01	1905,02
RUBIDIO	0,68	7,13	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,69	0,00	0,23	0,00	0,00
SELENIO	12,75	3,02	12,53	13,30	13,55	13,36	14,41	13,30	13,82	2,87	14,03	3,25	13,86	15,90
SODIO	5087,12	5995,02	3257,39	5325,85	1471,60	2205,56	1560,35	1905,08	1967,35	2952,08	1218,64	2276,72	3076,70	2142,81
TANTALO	0,25	0,03	0,28	0,39	0,19	0,16	0,19	0,17	2,17	0,00	0,90	0,00	0,40	0,36
TITANIO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TORIO	0,08	0,00	0,04	0,05	0,08	0,14	0,06	0,03	0,25	0,12	0,08	0,03	0,05	0,08
URANIO	0,05	0,01	0,03	0,03	0,05	0,09	0,04	0,03	0,07	0,13	0,04	0,04	0,04	0,06
VANADIO	18,21	3,81	17,48	19,12	19,16	19,63	20,16	18,68	21,20	4,63	20,57	3,78	18,61	23,74
WOLFRAMIO	4,60	21,63	0,99	2,02	0,62	1,33	0,47	0,42	11,33	16,53	1,72	15,80	0,81	2,45
YTRIO	0,18	0,05	0,13	0,15	0,29	0,33	0,16	0,15	0,25	0,26	0,13	0,06	0,12	0,21
ZIRCONIO	2,36	2,60	2,67	2,96	3,28	3,17	2,90	2,85	3,92	3,42	2,64	3,78	2,39	3,17

Tabla 4.3.- (Continuación).- Contenido metálico en las muestras de aceite expresado en ng Kg<sup>-1</sup>

	A-50	A-51	A-52	A-53	A-54	A-55	A-56	A-57	A-58	A-59	A-60	A-61	A-62	A-63
ALUMINIO	386,26	275,80	269,92	264,20	341,86	313,60	102,94	122,23	327,67	441,38	263,74	180,93	131,30	255,27
ARSENICO	8,43	0,35	6,17	7,21	7,46	0,10	8,81	7,27	0,00	7,50	7,92	0,00	7,34	7,65
BARIO	9,14	0,00	9,08	8,19	12,79	0,00	7,67	7,08	0,00	7,36	9,72	0,00	6,56	6,73
CALCIO	2204,02	2926,94	2645,63	4861,80	7798,87	6202,88	6473,64	6494,79	7903,30	9762,83	7385,60	8696,49	7081,17	7869,30
CESIO	0,00	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CINC	117,20	0,00	263,71	236,23	224,91	0,00	200,77	176,27	0,00	208,12	249,27	0,00	318,01	177,93
COBALTO	5,70	7,85	13,70	14,45	12,11	7,90	12,72	7,79	10,55	8,56	15,17	6,57	5,98	4,65
COBRE	20,19	37,99	16,71	11,89	21,01	22,53	13,06	11,47	15,13	13,50	17,06	11,38	10,90	11,49
CROMO	66,51	12,97	3297,58	101,98	103,75	15,30	75,77	61,81	10,45	46,56	25,39	203,89	101,79	75,24
ESCANDIO	0,80	0,00	1,15	1,28	0,72	0,00	0,77	0,64	0,00	1,35	0,79	0,00	0,54	0,29
ESTAÑO	4,79	3,38	3,36	4,18	4,53	4,39	4,43	3,46	2,56	3,43	2,29	0,60	2,77	3,10
ESTROCIO	4,43	0,00	6,08	3,62	26,61	0,00	4,47	4,68	0,00	5,42	4,30	0,00	4,82	4,29
GALIO	1,73	0,00	1,88	1,43	2,53	0,00	1,44	1,31	0,00	1,28	2,23	0,00	1,10	1,14
HAFNIO	0,08	0,13	0,08	0,08	0,09	0,13	0,11	0,07	0,10	0,27	0,04	0,08	0,17	0,08
HIERRO	490,50	370,06	274,28	326,69	524,33	417,51	370,12	358,37	1045,95	529,33	494,65	175,51	322,88	349,20
LITIO	2,95	1,06	3,56	9,00	5,27	0,27	3,36	1,62	0,07	2,20	2,76	0,00	3,18	3,88
MAGNESIO	438,10	372,55	302,70	343,65	765,71	722,36	533,70	292,78	664,29	948,26	702,54	808,13	610,36	583,42
MANGANESO	189,96	9,92	172,59	153,72	177,96	53,63	176,25	156,67	38,55	190,14	176,95	31,38	163,98	171,19
MOLIBDENO	15,54	0,00	36,59	58,86	18,13	0,00	8,04	5,70	0,00	6,48	27,18	280,85	55,91	17,04
NIOBIO	0,29	0,00	23,94	0,62	0,30	0,00	0,22	0,15	0,00	1,36	13,57	2,06	0,83	0,45
NIQUEL	44,71	44,56	49,00	176,75	71,68	39,18	21,97	18,15	22,64	16,38	57,30	1182,27	164,35	51,89
PLOMO	41,72	74,56	45,93	75,99	64,17	73,00	72,11	74,62	94,66	40,82	55,77	64,29	58,46	33,39
POTASIO	6856,42	5591,84	5077,56	710,25	1018,81	1721,85	3938,67	3060,66	8558,95	8418,78	5891,81	1019,81	1206,17	1723,94
RUBIDIO	0,00	0,37	0,00	0,00	0,00	2,26	0,00	0,00	0,28	0,00	0,00	0,51	0,00	0,00
SELENIO	14,76	1,71	11,57	12,05	12,18	1,85	15,31	12,79	2,66	12,91	13,13	2,09	11,81	12,06
SODIO	367,39	652,47	344,15	1114,47	618,97	1035,46	786,45	558,12	324,92	111,76	182,33	0,00	0,00	0,00
TANTALO	0,21	0,00	0,16	0,24	0,22	0,00	0,19	0,16	0,00	1,76	0,18	0,00	0,43	0,37
TITANIO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TORIO	0,07	0,05	0,06	0,04	0,15	0,00	0,04	0,03	0,00	0,16	0,04	0,00	0,05	0,03
URANIO	0,04	0,03	0,04	0,02	0,07	0,00	0,03	0,01	0,00	0,03	0,02	0,00	0,02	0,02
VANADIO	19,03	3,25	15,79	17,19	18,76	3,86	20,14	17,49	3,60	19,63	17,81	3,11	19,00	19,44
WOLFRAMIO	0,60	14,88	1,14	0,41	0,50	13,25	0,30	0,06	9,03	5,78	1,34	4,92	0,98	0,60
YTRIO	0,15	0,09	0,12	0,10	0,32	0,00	0,18	0,07	0,04	0,14	0,09	0,00	0,08	0,07
ZIRCONIO	2,84	3,80	3,35	3,55	4,24	3,16	5,00	3,67	3,05	4,53	2,22	1,86	3,25	2,55

Tabla 4.3.- (Continuación). - Contenido metálico en las muestras de aceite expresado en ng Kg<sup>-1</sup>

	A-64	A-65	A-66	A-67	A-69	A-70	A-71	A-72	A-73	A-74	A-75	A-77	A-78	A-79
ALUMINIO	604,37	371,38	337,87	1068,94	1266,36	1189,05	1754,48	1001,74	1476,11	1268,82	1002,79	56,77	168,31	431,91
ARSENICO	0,00	7,50	6,50	0,31	6,97	7,03	0,00	6,52	6,25	6,48	6,48	6,44	0,00	5,62
BARIO	0,00	11,52	9,79	0,00	13,55	9,73	0,00	15,37	11,35	14,92	9,05	7,23	0,57	7,40
CALCIO	2880,73	2330,99	1963,89	5162,71	7294,00	7498,82	8649,16	10624,31	13388,82	10732,93	11914,98	2501,50	2717,89	3483,98
CESIO	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00	0,20	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
CINC	0,00	112,44	99,59	0,00	153,42	124,85	0,00	108,53	126,47	175,91	128,23	137,66	0,00	208,25
COBALTO	5,44	11,03	3,46	12,09	11,32	10,38	16,13	7,40	16,55	12,94	17,28	6,15	10,97	8,41
COBRE	17,62	14,69	18,98	18,92	10,56	11,76	14,80	7,43	40,10	12,86	8,17	8,48	18,49	14,01
CROMO	11,45	87,34	58,28	11,30	276,03	237,73	15,46	52,50	64,65	97,58	61,00	101,22	18,01	58,17
ESCANDIO	0,00	0,48	0,40	0,00	0,98	0,50	0,05	0,45	0,00	0,48	0,42	0,19	0,30	0,44
ESTAÑO	1,13	3,05	1,73	0,18	2,18	1,97	0,10	1,08	1,52	1,41	1,15	1,23	0,00	2,07
ESTROCIO	0,00	6,32	3,92	0,00	3,64	3,25	0,00	3,22	14,92	30,55	8,53	4,11	6,19	3,36
GALIO	0,00	1,91	1,73	0,14	2,24	1,66	0,00	2,90	1,95	2,78	1,68	1,29	0,00	1,36
HAFNIO	0,12	0,09	0,08	0,11	0,08	0,08	0,12	0,05	0,04	0,32	0,11	0,10	0,13	0,08
HIERRO	740,99	559,77	600,13	1116,16	1388,11	1367,65	1615,85	718,61	754,86	802,41	428,93	357,16	185,88	429,20
LITIO	0,28	1,85	2,62	2,36	4,00	2,24	0,00	2,05	4,78	5,17	3,72	2,68	0,00	1,36
MAGNESIO	414,90	323,99	308,74	692,79	847,27	530,10	827,42	225,00	645,82	491,16	354,50	767,00	955,92	811,54
MANGANESO	29,82	166,37	169,81	33,18	181,24	174,14	47,57	164,63	37,92	177,60	162,97	153,19	24,90	206,01
MOLIBDENO	0,00	6,37	6,22	0,00	243,04	190,84	0,00	14,62	9,79	11,49	7,22	46,56	0,00	8,15
NIOBIO	0,00	0,27	0,24	0,00	2,11	1,63	0,00	0,21	1,40	1,34	0,45	0,65	0,00	0,25
NIQUEL	42,61	40,55	26,78	28,55	791,98	738,58	51,85	37,07	63,26	43,87	22,45	191,97	87,82	32,62
PLOMO	50,03	68,51	30,05	112,72	68,50	60,24	149,60	43,52	179,66	73,35	90,07	44,68	88,59	47,72
POTASIO	1254,67	915,27	1231,82	4946,15	9389,38	8434,77	11145,14	6620,29	10995,60	7059,74	6631,05	3755,11	3911,21	4096,03
RUBIDIO	1,10	0,00	0,00	3,84	0,00	0,00	0,81	0,00	2,90	0,00	0,00	0,00	3,29	0,00
SELENIO	2,39	13,74	12,21	2,49	12,31	11,56	1,59	11,27	0,00	11,16	10,59	11,02	1,74	10,62
SODIO	0,00	0,00	0,00	1706,95	1584,24	1221,06	1588,78	16052,95	18137,52	18282,01	17241,15	0,00	0,00	0,00
TANTALO	0,00	0,23	0,18	0,00	0,19	0,13	0,00	0,08	1,34	1,98	0,48	0,39	0,00	0,19
TITANIO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TORIO	0,00	0,04	0,03	0,03	0,06	0,05	0,00	0,04	0,25	0,34	0,10	0,05	0,15	0,05
URANIO	0,00	0,03	0,02	0,05	0,05	0,05	0,23	0,07	0,28	0,18	0,05	0,06	0,45	0,03
VANADIO	3,66	21,30	17,57	4,24	17,71	16,49	2,80	15,05	18,15	16,45	16,29	15,73	3,05	13,83
WOLFRAMIO	6,34	0,40	0,39	2,64	0,86	0,17	2,83	0,04	4,01	4,58	1,33	0,74	0,51	0,37
YTRIO	0,03	0,12	0,09	0,10	0,13	0,11	0,14	0,10	0,47	0,44	0,16	0,13	0,22	0,09
ZIRCONIO	3,35	3,86	2,68	3,14	3,51	3,85	3,12	3,26	3,73	3,43	3,11	3,51	2,69	3,71

Tabla 4.3. -(Continuación). - Contenido metálico en las muestras de aceite expresado en ng Kg<sup>-1</sup>

	A-80	A-81	A-88	A-89	A-90	A-91	A-92	A-93	A-94	A-95	A-96
ALUMINIO	161,16	286,13	513,11	301,93	98,66	483,77	454,57	289,10	530,23	482,00	675,62
ARSENICO	6,71	5,04	6,66	6,40	6,38	6,90	0,00	6,48	5,78	5,83	0,13
BARIO	8,29	11,93	10,68	8,47	8,74	13,30	2,62	10,37	7,22	11,30	2,79
CALCIO	2561,91	2996,96	6631,19	5013,84	4779,42	6436,89	5874,93	5101,37	8375,51	8491,67	5785,59
CESIO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03
CINC	96,42	230,31	330,32	301,78	246,00	281,70	0,00	191,72	164,60	291,05	0,00
COBALTO	5,45	7,37	8,49	8,82	11,03	11,26	5,60	4,98	4,72	4,92	8,09
COBRE	5,96	10,30	19,46	12,97	12,98	57,24	20,28	14,89	9,12	14,78	20,01
CROMO	57,09	49,86	65,72	56,40	79,02	65,39	12,61	59,76	64,89	76,59	69,62
ESCANDIO	0,50	0,00	0,23	0,20	0,10	0,00	0,44	0,17	0,00	0,17	0,00
ESTAÑO	1,18	0,52	1,70	1,95	1,55	1,81	0,74	1,18	0,95	0,85	2,03
ESTROCIO	3,83	4,32	5,00	4,83	3,92	10,67	0,00	5,50	2,96	19,54	7,04
GALIO	1,36	2,15	1,91	1,37	1,50	2,19	0,00	1,88	1,31	2,20	0,00
HAFNIO	0,10	0,09	0,05	0,07	0,04	0,05	0,14	0,04	0,04	0,05	0,09
HIERRO	476,97	375,05	735,49	446,08	552,93	607,39	579,44	658,23	596,97	749,35	681,80
LITIO	1,85	4,86	2,79	1,87	13,99	2,44	0,82	6,27	4,30	12,81	0,00
MAGNESIO	886,98	503,87	1128,00	438,35	601,47	616,60	795,85	815,37	803,39	719,14	772,74
MANGANESO	173,37	149,90	164,45	154,24	169,65	186,63	17,75	173,36	172,53	173,16	44,98
MOLIBDENO	6,40	3,82	8,08	11,09	7,88	6,46	0,00	2,82	0,83	1,86	24,77
NIOBIO	0,21	0,18	0,19	0,22	0,19	0,18	0,00	0,12	0,07	0,09	0,00
NIQUEL	28,20	20,10	38,92	54,64	36,31	35,46	24,64	15,72	10,97	44,15	281,14
PLOMO	33,06	48,64	53,22	55,52	66,21	69,95	58,23	47,65	41,85	48,37	85,91
POTASIO	4058,72	1306,27	11273,60	9716,76	10356,24	4896,13	6854,09	11550,18	10405,58	6681,26	10500,63
RUBIDIO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,05	0,00	0,00	0,00	6,37
SELENIO	12,52	9,81	12,06	10,30	10,91	11,84	2,46	11,10	10,27	8,68	3,29
SODIO	0,00	0,00	5182,88	6636,23	7546,19	6420,85	10895,08	6965,18	8274,76	8012,39	10666,41
TANTALO	0,22	0,16	0,18	0,20	0,18	0,23	0,00	0,11	0,13	0,08	0,00
TITANIO	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
TORIO	0,06	0,07	0,06	0,06	0,03	0,07	0,50	0,06	0,04	0,08	0,03
URANIO	0,04	0,04	0,04	0,03	0,02	0,04	0,43	0,05	0,03	0,06	0,03
VANADIO	15,85	13,24	16,61	14,95	14,98	17,04	3,08	15,82	14,73	13,36	3,52
WOLFRAMIO	0,23	0,30	0,49	0,46	0,29	1,37	3,07	0,08	0,21	0,63	3,92
YTRIO	0,12	0,14	0,13	0,11	0,11	0,14	0,52	0,13	0,10	0,21	0,07
ZIRCONIO	3,91	2,58	2,06	2,53	1,68	2,15	4,43	2,36	1,96	2,53	2,91

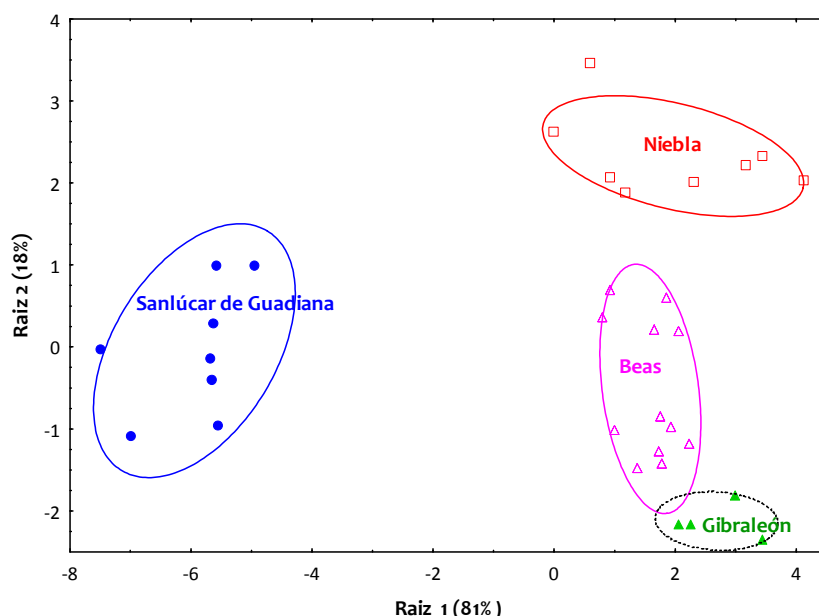
La disponibilidad de los elementos que son incorporados por los olivos varía de un olivara otro, y esta variabilidad apoya la hipótesis de que los oligoelementos pueden ser usados para determinar la procedencia geográfica del aceite de oliva virgen. Para confirmar esta hipótesis, es necesario comprobar las diferencias en la composición elemental entre los suelos de las cuatro zonas seleccionadas (Beas, Gibrleón, Niebla y Sanlúcar de Gadiana). Por ello, se realizó un estudio preliminar de las muestras de suelo para analizar las posibles diferencias en la concentración de elementos en las zonas estudiadas.

**Tabla 4.4.-** Medias y desviaciones estándar de las concentraciones de los 34 elementos en las dos profundidades

Elementos	Medias (Std) 30cm	Meadias (Std) 60cm	Elementos	Meadias (Std) 30cm	Meadias (Std) 60cm
Aluminio (Al)	29.4 (3.3)	32.3 (3.6)	Molibdeno (Mo)	1.9 (0.3)	1.7 (0.2)
Arsenico (As)	8.3 (0.5)	8.5 (0.6)	Niobio (Nb)	9.7 (0.4)	9.8 (0.5)
Bario(Ba)	216.3 (11.5)	223.9 (13.1)	Níquel (Ni)	15.2 (1.5)	16.7 (1.5)
Calcio (Ca)	41.0 (15.7)	52.0 (18.8)	Plomo(Pb)	14.8 (1.2)	14.0 (1.1)
Cesio (Cs)	2.4 (0.1)	2.6 (0.1)	Potasio(K)	17.9 (1.5)	18.5 (1.8)
Cinc (Zn)	30.0 (2.2)	30.4 (2.6)	Rubidio (Rb)	55.4 (2.2)	57.8 (2.9)
Cobalto (Co)	6.7 (0.7)	7.4 (0.7)	Selenio (Se)	1.7 (0.2)	2.0 (0.3)
Cobre (Cu)	20.6 (1.1)	16.0 (1.0)	Sodio(Na)	5.8 (0.8)	5.7 (0.8)
Cromo (Cr)	42.5 (3.1)	49.7 (2.3)	Tantalo (Ta)	5.6 (0.6)	6.0 (0.5)
Escandio (Sc)	3.2 (0.5)	3.4 (0.3)	Estaño (Sn)	5.8 (0.7)	5.0 (0.3)
Estroncio(Sr)	63.1 (10.0)	67.1 (11.0)	Titanio(Ti)	4.1 (0.3)	4.2 (0.3)
Galio (Ga)	22.0 (1.2)	22.9 (1.2)	Torio (Th)	5.7 (0.3)	5.6 (0.3)
Hafnio(Hf)	2.4 (0.2)	2.4 (0.2)	Uranio (U)	2.5 (0.2)	2.5 (0.2)
Hierro(Fe)	32.3 (3.8)	35.5 (4.2)	Vanadio (V)	63.0 (4.2)	69.3 (4.5)
Litio (Li)	26.1 (2.0)	29.0 (2.1)	Wolframio (W)	4.2 (0.3)	4.5 (0.3)
Magnesio (Mg)	4.0 (0.6)	4.3 (0.6)	Ytrio(Y)	5.1 (0.3)	5.2 (0.3)
Manganeso(Mn)	0.6 (0.1)	0.7 (0.2)	Zirconio (Zr)	76.3 (4.5)	78.9 (3.6)

La tabla 4.5 muestra las concentraciones de los diferentes elementos expresadas como media  $\pm$  desviación estándar de las cuatro zonas seleccionadas. Los datos indican, en términos generales, que las mayores concentraciones de los elementos se obtuvieron en las muestras de Beas, seguidas de las de Sanlúcar de Gadiana, que está más alejada

geográficamente de las otras tres zonas. El uso de la prueba de Brown-Forsythe indicó que cinco elementos (Mg, Na, Sc, Ta, U) tenían un valor de  $p > 0,05$  para la caracterización simultánea de las muestras de las cuatro ubicaciones geográficas. Otros elementos fueron capaces de distinguir dos o tres orígenes geográficos de forma simultánea (por ejemplo, Ba, Cs, Cr, Ga, Hf, Fe, K, W). La Figura 4.1 muestra que sólo tres elementos, Fe, Na y W, fueron capaces de distinguir los suelos -incluyendo las dos profundidades- de las cuatro ubicaciones mediante la aplicación del LDA. La mayor parte de la varianza se explica por la primera ecuación canónica (81%). Se observó un solapamiento entre las muestras recogidas en los olivares de Beas y Gibraleón. Estos dos municipios son adyacentes el uno al otro, lo que explica que pueden surgir algunos problemas de clasificación al distinguir esas muestras. Las diferencias son mucho más claras cuando se tienen en cuenta los otros elementos seleccionados por la prueba de Brown-Forsythe. Por lo tanto, las concentraciones de Ba, Fe, K, Na, Ta y W pueden distinguir los suelos de los cuatro orígenes geográficos independientemente de la profundidad de las muestras recogidas.



**Figura 4.1.**-Aplicación del análisis discriminante lineal (LDA) a la concentración de tres elementos (Fe, Na y W) determinados en los suelos de los olivares, recogidos a dos profundidades (30 cm y 60 cm) de cuatro orígenes geográficos (Beas, Gibraleón, Niebla y Sanlúcar de Guadiana).

**Tabla 4.5.-**Medias y desviaciones estándar de las concentraciones de los elementos en los suelos de las cuatro zonas seleccionadas.

Elementos	Suelos (mg/kg)			
	Beas	Gibraleón	Niebla	Sanlúcar de Guadiana
Aluminio (Al)	53.1 (1.3)	23.9 (2.1)	25.1 (1.0)	17.7 (1.1)
Arsenico (As)	6.9 (0.3)	5.3 (0.1)	10.2 (0.5)	11.5 (0.5)
Bario (Ba)	321.2 (6.1)	152.7 (20.8)	207.5 (8.6)	214.6 (5.2)
Calcio (Ca)	16.7 (1.3)	92.0 (56.74)	1111.0 (216.8)	171.1 (84.66)
Cesio (Cs)	2.6 (0.2)	2.0 (0.0)	2.6 (0.2)	3.2 (0.1)
Cinc (Zn)	30.0 (1.5)	21.6 (0.7)	26.1 (1.1)	51.1 (3.9)
Cobalto (Co)	6.4 (0.5)	4.2 (0.1)	6.4 (0.4)	13.1 (0.4)
Cobre (Cu)	22.4 (0.7)	17.1 (1.6)	17.3 (2.7)	18.6 (2.2)
Cromo (Cr)	67.1 (1.5)	45.6 (2.8)	43.2 (4.5)	37.7 (2.3)
Escandio (Sc)	3.4 (0.2)	2.8 (0.0)	2.6 (0.1)	5.7(0.1)
Estaño (Sn)	7.9 (1.5)	5.0 (0.5)	5.5 (0.7)	4.3 (0.8)
Estroncio (Sr)	nd	nd	nd	nd
Galio (Ga)	27.3 (0.7)	14.8 (1.6)	23.6 (1.7)	25.5 (0.4)
Hafnio (Hf)	3.6 (0.0)	2.7 (0.1)	1.9 (0.2)	1.9 (0.1)
Hierron (Fe)	59.4 (1.4)	26.0 (2.4)	27.1 (1.1)	19.0 (1.2)
Litio (Li)	46.0 (3.4)	23.7 (1.6)	24.5 (1.7)	23.7 (0.8)
Magnesio (Mg)	7.1 (0.2)	1.5 (0.2)	4.4 (0.6)	3.0 (0.3)
Manganeso (Mn)	1.5 (0.1)	0.5 (0.1)	0.4 (0.1)	0.2 (0.0)
Molibdeno (Mo)	3.3 (0.5)	2.2 (0.1)	0.8 (0.3)	nd
Niobio (Nb)	8.4 (0.9)	9.0 (0.3)	9.9 (0.4)	12.1. (0.2)
Niquel (Ni)	29.7 (1.1)	13.0 (1.4)	15.5 (1.2)	11.1 (0.9)
Plomo (Pb)	14.1 (2.6)	10.7 (0.1)	15.1 (0.8)	19.1 (0.4)
Potasio (K)	26.6 (1.2)	12.4 (2.4)	17.5 (0.5)	15.0 (0.4)
Rubidio (Rb)	59.0 (1.9)	46.2 (0.2)	55.5 (3.8)	69.8 (3.1)
Selenio (Se)	1.1 (0.3)	nd	1.6 (0.3)	3.2 (0.4)
Sodio (Na)	9.5 (0.8)	2.5 (0.7)	4.8 (0.3)	7.5 (0.3)
Tantalo (Ta)	8.3 (0.1)	7.6 (0.1)	5.0 (0.7)	2.3 (0.8)
Titanio (Ti)	5.6 (0.1)	3.9 (0.1)	3.3 (0.1)	4.1 (0.2)
Torio (Th)	4.7 (0.2)	5.8 (0.1)	5.1 (0.4)	8.0 (0.2)
Uranio (U)	1.8 (0.2)	1.5 (0.0)	2.9 (0.1)	4.2 (0.0)
Vanadio (V)	105.9 (3.9)	53.9 (4.1)	66.7 (3.9)	52.9 (2.8)
Wolframio (W)	5.9 (0.2)	5.5 (0.3)	3.4 (0.3)	2.9 (0.2)
Ytrio (Y)	7.7 (0.1)	4.9 (0.3)	4.8 (0.2)	4.3 (0.3)
Zirconio (Zr)	107.0 (2.0)	72.8 (4.4)	69.3 (6.0)	81.8 (3.1)

Como los olivos obtendrían los elementos de la tierra, se espera que los alperujos resultantes de la extracción de los aceites de oliva contengan los mismos elementos presentes en el suelo, pero en concentraciones más bajas. El orujo de oliva o "alperujo" es el subproducto resultante de la producción de aceite de oliva virgen. El Aceite de oliva virgen se obtiene únicamente del fruto del olivo (*Olea europaea* L.) en un proceso que comienza con la molienda de la aceituna, y es seguido por agitación de la pasta de aceitunas, y separación del aceite de la materia vegetal y el agua por centrifugación continua y doble decantación (Vossen, 2013). Una vez que el aceite se

separa, la pasta restante, alperujo, contiene una pequeña cantidad de aceite (2-6%), y se espera que algunos elementos también permanezcan en esta pasta. A este respecto, la hipótesis es que la producción de aceite de oliva es lo suficientemente simple para no alterar en gran medida la concentración de la pasta resultante. Los datos recogidos en la Tabla 4.6 confirman que los elementos cuantificados en los alperujos son los mismos que los cuantificados en los suelos, pero en concentraciones más bajas, con algunas excepciones. Algunas de estas excepciones pueden explicarse por el empleo de los fertilizantes foliares, que son ampliamente utilizados en los olivares, cuya composición química contiene K, Fe, Mg, Mn, P y Zn en diferentes proporciones, junto con otros elementos como por ejemplo B y Ca, que pueden formar complejos con aminoácidos como en los casos de Ca, Fe, Mg, Mn y Zn (Barranco, Ercan, Muñoz-Díez, Belaj y Arquero, 2010).

El uso de estos fertilizantes podría explicar la mayor concentración de K y Mg encontrada en los alperujos, mientras que la alta concentración de Cu podría ser debida a la utilización de fungicidas de cobre (Soares, Pereira y Bastos, 2006). El uso de fertilizantes foliares vs. suelo y también fungicidas de cobre depende de la variedad y el nivel de conocimientos de los agricultores (Sistani, Ramezani y Nasrollanejad, 2009) como se detectó cuando se analizó la concentración de estos elementos en los diferentes olivares estudiados en este trabajo. Sin embargo, no hemos encontrado una explicación plausible para la alta concentración de Sc en todas las muestras de alperujos, y de Cr en casi todo los alperujos en las explotaciones de Niebla y Sanlúcar de Guadiana.

El primer estudio de muestras de alperujos se centra en la influencia de las variedades (Arbequina, Picual y Verdial de Huévar) sobre las concentraciones de los elementos. Cuando se aplica el LDA a las muestras de alperujos de cada localidad, utilizando la variedad como criterio de clasificación, se observa que cuatro elementos, Ba, Cu, Rb y Zn, son suficientes para clasificar correctamente dichas muestras.

**Tabla 4.6.-** Medias y desviaciones estándar de las concentraciones de los elementos de los alperujos de las cuatro zonas seleccionadas.

Elementos	alperujos (mg/kg)			
	Beas	Gibraleón	Niebla	Sanlúcar de Guadiana
Aluminio (Al)	0.39 (0.05)	1.33 (0.09)	1.60 (0.41)	2.38 (0.52)
Arsenico (As)	0.18 (0.02)	0.21 (0.05)	0.29 (0.04)	0.39 (0.08)
Bario (Ba)	29.05 (3.67)	23.10 (3.81)	21.80 (1.76)	23.42 (2.09)
Calcio (Ca)	84.85 (2.16)	70.46 (4.45)	62.54 (3.63)	54.27 (4.48)
Cesio (Cs)	0.47 (0.05)	0.59 (0.12)	0.66 (0.10)	0.65 (0.11)
Cinc (Zn)	5.07 (0.37)	3.50 (0.30)	10.10 (1.06)	8.38 (0.68)
Cobalto (Co)	0.49 (0.04)	0.73 (0.13)	1.73 (0.32)	1.67 (0.27)
Cobre (Cu)	8.91 (1.02)	4.08 (0.23)	19.52 (2.26)	13.51 (1.86)
Cromo (Cr)	1.45 (0.10)	2.89 (0.46)	21.43 (5.27)	21.96 (5.88)
Escandio (Sc)	2.39 (0.18)	2.62 (0.68)	5.46 (0.71)	6.70 (1.41)
Estaño (Sn)	0.08 (0.01)	0.12 (0.03)	0.24 (0.06)	0.19 (0.03)
Estroncio (Sr)	nd	nd	nd	nd
Galio (Ga)	1.60 (0.14)	1.38 (0.32)	2.28 (0.32)	3.13 (0.64)
Hafnio (Hf)	1.04 (0.13)	1.41 (0.37)	0.94 (0.08)	1.69 (0.35)
Hierron (Fe)	0.43 (0.06)	1.40 (0.10)	1.61 (0.40)	2.44 (0.52)
Litio (Li)	6.68 (0.54)	10.42 (3.13)	7.69 (0.53)	15.66 (3.67)
Magnesio (Mg)	2.04 (0.15)	8.86 (1.00)	2.60 (0.23)	2.93 (0.32)
Manganeso (Mn)	0.03 (0.00)	0.03 (0.00)	0.04 (0.00)	0.07 (0.00)
Molibdeno (Mo)	0.95 (0.10)	1.00 (0.32)	0.85 (0.07)	1.80 (0.43)
Niobio (Nb)	0.18 (0.02)	0.33 (0.08)	0.32 (0.13)	0.34 (0.06)
Niquel (Ni)	0.95 (0.12)	1.14 (0.11)	6.26 (1.20)	4.17 (0.37)
Plomo (Pb)	1.62 (0.17)	2.75 (0.53)	2.91 (0.36)	7.70 (2.22)
Potasio (K)	65.54 (2.42)	68.50 (2.19)	66.56 (2.52)	69.71 (1.26)
Rubidio (Rb)	18.67 (0.51)	14.78 (0.52)	37.25 (5.29)	19.40 (2.42)
Selenio (Se)	0.05 (0.00)	0.05 (0.01)	0.09 (0.01)	0.12 (0.02)
Sodio (Na)	18.58 (1.57)	21.97 (5.32)	19.43 (1.67)	22.08 (1.78)
Tantalo (Ta)	0.02 (0.00)	0.03 (0.01)	0.41 (0.33)	0.05 (0.01)
Titanio (Ti)	0.27 (0.04)	0.48 (0.09)	0.18 (0.01)	0.37 (0.07)
Torio (Th)	0.27 (0.05)	0.31 (0.11)	0.24 (0.03)	0.51 (0.12)
Uranio (U)	0.10 (0.01)	0.13 (0.04)	0.09 (0.01)	0.16 (0.03)
Vanadio (V)	0.29 (0.02)	1.02 (0.17)	0.80 (0.15)	1.33 (0.13)
Wolframio (W)	0.17 (0.02)	0.71 (0.05)	1.16 (0.13)	0.65 (0.03)
Ytrio (Y)	0.59 (0.08)	0.88 (0.27)	0.60 (0.05)	1.14 (0.25)
Zirconio (Zr)	57.60 (5.89)	22.51 (3.37)	57.96 (5.18)	52.49 (4.50)

La concentración de Cu fue mayor para los alperujos de la variedad Arbequina, independientemente del origen geográfico de los mismos, por lo que se deduce que esta variedad estaba mejor protegida contra las enfermedades por medio de fungicidas a base de cobre que las otras variedades, siendo la concentración media de Cu en Arbequina el doble que en Picual y cinco veces más que en Verdial de Huévar. En la Tabla 4.7 se muestran los valores encontrados en los alperujos relativo a los encontrados en el suelo, como puede observarse, los Arbequinos son mucho más eficientes en la obtención de elementos de los suelos que los Picuales en todas las

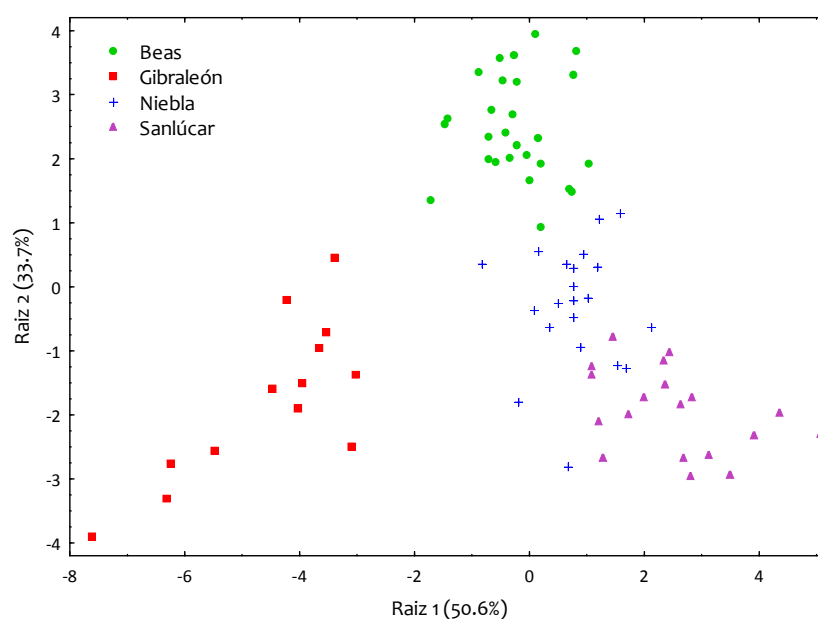
ubicaciones. Destaca también los altos porcentajes de Zn encontrados para la variedad Arbequina que podría explicarse por el uso de fertilizantes que favorece el aumento de la producción de aceitunas. Algunos de los cultivos de Arbequina se plantaron en modo intensivo / súper intensivo, que requieren más cantidad de fertilizantes y fungicidas (Beaufoy 2002).

**Tabla 4.7.-** Porcentajes de las concentraciones de los elementos determinados en los alperujos con respecto a los determinados en los suelos.

Elementos	Variedad	Origen Geográfico			
		Beas	Gibraleón	Niebla	Sanlúcar de Gadiana
Cu	Arbequina	66.5	28.4	146.8	137.1
	Picual	44.2	19.3	44.5	86.6
Ba	Arbequina	5.2	24.8	11.1	10.9
	Picual	5.4	7.7	8.3	11.6
Rb	Arbequina	31.0	31.2	85.4	32.2
	Picual	36.3	30.1	24.0	19.2
Zn	Arbequina	22.3	18.5	48.3	17.2
	Picual	19.0	11.6	17.6	14.9

En cambio, no se ha encontrado ninguna explicación para los altos porcentajes de rubidio determinados en los alperujos de arbequina de las explotaciones situadas en Niebla.

La determinación de la procedencia geográfica de los alperujos, cualquiera que sea su cultivo es más complejo que el análisis de los suelos. Por lo tanto, ocho elementos (W, Mg, Mn, Ca, Fe, Ba, Li y Na) fueron seleccionados por SLDA hasta llegar a una clasificación completa con tres ecuaciones canónicas. La figura 4.2 muestra los resultados con las dos primeras ecuaciones canónicas. Tres de los elementos seleccionados (W, Fe y Na) ya fueron utilizados para la clasificación de los suelos (Fig.4.1).



**Figura 4.2.-** Aplicación del análisis discriminante lineal (LDA) a las concentraciones de ocho elementos (Fe, Na, W, Mg, Mn, Ca, Li, Ba) determinados en el orujo de las distintas variedades (Arbequina, Picual y Verdial de Huévar) y cuatro orígenes geográficos (Beas, Gibraleón, Niebla y Sanlúcar de Gadiana).

Idealmente, cualquier sistema de trazabilidad basado en compuestos químicos debería basarse en las determinaciones en los aceites de oliva, ya que veces su origen es desconocido o bien necesita ser confirmado. El principal objetivo de la trazabilidad es determinar la procedencia geográfica de los aceites de oliva mediante el análisis de su composición química, elemental en nuestro caso. Por ello, siguiendo el mismo procedimiento aplicado para los alperujos, se analizaron las diferencias en la concentración de los elementos determinados en los aceites de oliva de los diferentes olivares. El test de Grubbs (Grubbs, 1969) puso de manifiesto que seis muestras dieron valores atípicos y fueron eliminadas de los análisis posteriores.

**Tabla 4.8.-** Medias y desviaciones estándar de las concentraciones de los elementos de los aceites de las cuatro zonas seleccionadas.

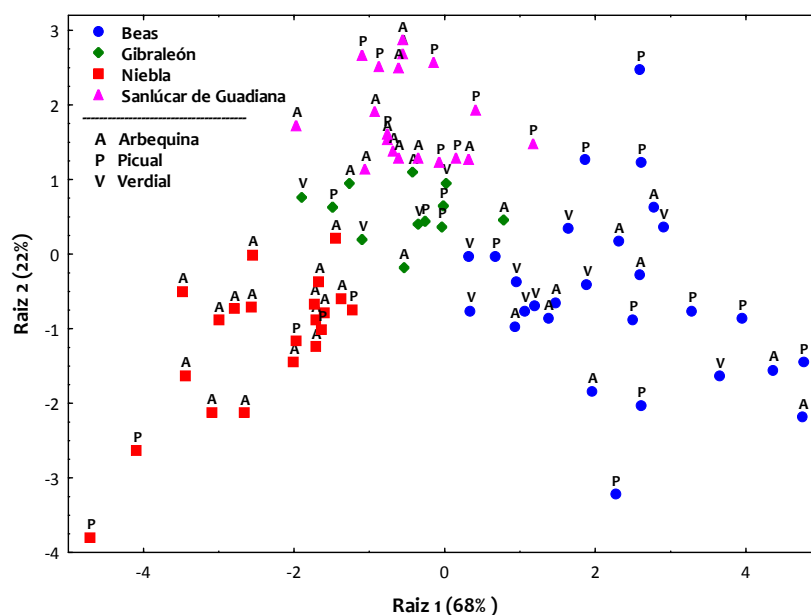
Elementos	Aceite (10×mg/kg)			
	Beas	Gibraleón	Niebla	Sanlúcar de Guadiana
Aluminio (Al)	0.011 (0.002)	0.008 (0.001)	0.003 (0.000)	0.003 (0.000)
Arsenico (As)	0.067 (0.006)	0.053 (0.007)	0.069 (0.008)	0.077 (0.006)
Bario (Ba)	0.224 (0.033)	0.099 (0.012)	0.123 (0.013)	0.113 (0.011)
Calcio (Ca)	0.112 (0.013)	0.067 (0.012)	0.051 (0.010)	0.082 (0.006)
Cesio (Cs)	nd/tr	nd/tr	0.002 (0.001)	nd/tr
Cinc (Zn)	3.279 (0.317)	1.490 (0.137)	2.234 (0.269)	2.599 (0.250)
Cobalto (Co)	0.088 (0.007)	0.105 (0.011)	0.110 (0.024)	0.079 (0.011)
Cobre (Cu)	0.472 (0.066)	0.139 (0.027)	0.358 (0.045)	0.285 (0.038)
Cromo (Cr)	1.233 (0.226)	0.519 (0.083)	1.084 (0.185)	0.876 (0.114)
Escandio (Sc)	0.008 (0.001)	0.004 (0.001)	0.008 (0.002)	0.012 (0.002)
Estaño (Sn)	0.086 (0.026)	0.012 (0.002)	0.133 (0.029)	0.097 (0.014)
Estroncio (Sr)	nd	nd	nd	nd
Galio (Ga)	0.045 (0.008)	0.016 (0.003)	0.019 (0.003)	0.031 (0.010)
Hafnio (Hf)	0.001 (0.000)	0.001 (0.000)	0.001 (0.000)	0.001 (0.000)
Hierron (Fe)	0.012 (0.002)	0.007 (0.001)	0.005 (0.000)	0.005 (0.000)
Litio (Li)	0.064 (0.009)	0.029 (0.005)	0.047 (0.008)	0.046 (0.007)
Magnesio (Mg)	0.009 (0.001)	0.006 (0.001)	0.006 (0.001)	0.009 (0.001)
Manganeso (Mn)	0.002 (0.000)	0.001 (0.000)	0.001 (0.000)	0.002 (0.000)
Molibdeno (Mo)	0.143 (0.030)	0.141 (0.043)	0.243 (0.034)	0.131 (0.039)
Niobio (Nb)	0.011 (0.003)	0.008 (0.002)	0.012 (0.003)	0.005 (0.001)
Niquel (Ni)	1.025 (0.208)	1.739 (0.810)	1.075 (0.157)	0.797 (0.280)
Plomo (Pb)	0.629 (0.050)	0.742 (0.117)	0.645 (0.055)	0.483 (0.049)
Potasio (K)	0.061 (0.006)	0.059 (0.008)	0.065 (0.013)	0.069 (0.012)
Rubidio (Rb)	0.009 (0.004)	0.008 (0.004)	0.026 (0.010)	0.009 (0.005)
Selenio (Se)	0.109 (0.008)	0.097 (0.011)	0.118 (0.012)	0.133 (0.009)
Sodio (Na)	0.078 (0.005)	0.062 (0.024)	0.073 (0.022)	0.038 (0.010)
Tantalo (Ta)	0.004 (0.001)	0.004 (0.002)	0.005 (0.001)	0.003 (0.001)
Titanio (Ti)	nd/tr	nd/tr	nd/tr	nd/tr
Torio (Th)	0.002 (0.001)	0.001 (0.000)	0.001 (0.000)	0.001 (0.000)
Uranio (U)	0.001 (0.000)	0.001 (0.000)	nd/tr	nd/tr
Vanadio (V)	0.165 (0.013)	0.138 (0.014)	0.165 (0.016)	0.184 (0.011)
Wolframio (W)	0.026 (0.004)	0.007 (0.002)	0.041 (0.011)	0.020 (0.005)
Ytrio (Y)	0.004 (0.001)	0.002 (0.000)	0.002 (0.000)	0.002 (0.000)
Zirconio (Zr)	0.031 (0.002)	0.034 (0.001)	0.043 (0.004)	0.042 (0.004)

La Tabla 4.8 muestra las concentraciones de los elementos determinados en los aceites de oliva vírgenes agrupados por su origen geográfico. Las concentraciones de los elementos están de acuerdo con los valores publicados anteriormente por otros autores (Camin y col., 2010b; Benincasa y col., 2007; Llorent-Martínez y col., 2011b.). Además, con el fin de comprobar la seguridad de los AOVEs utilizados en este estudio, se comprobó que las concentraciones máximas de los elementos son inferiores a los

máximos admitidos para los aceites comestibles que se citan en las normativas (Reglamento CE (UE, 2006) y las normas comerciales del COI (COI, 2013), (0,10 mg / kg de As, Cu y Pb; 3,0 mg / kg para la Fe, y 50 mg / kg para Sn).

El análisis discriminante aplicado a las variedades (Arbequina, Picual y Verdial de Huévar) de cada zona de forma independiente mostró que los elementos seleccionados para la caracterización de los aceites de oliva por su origen geográfico fueron K, Cu, Fe, Mg. Algunos elementos, tales como Cu o K, podrían estar directamente relacionados con los fertilizantes y fungicidas aplicados a los olivos (Soares y col., 2006). Como se mostró para los alperujos, las concentraciones de los elementos relacionados con la adición externa de productos agrícolas (K, Cu) son mayores en Arbequina, cualquiera que sea su origen geográfico.

Si la clasificación de los alperujos de acuerdo con su procedencia geográfica requiere más elementos que la clasificación de los suelos de las explotaciones, para el estudio de los aceites de oliva se necesitan aún más elementos para obtener una tasa de clasificación más alta del 90%. Siete de los elementos seleccionados para la clasificación de los aceites de oliva (W, Mg, Mn, Li, Fe, Ca, Ba) ya fueron seleccionados en el estudio de alperujos aunque para el procedimiento SLDA fue necesario añadir dos más (Bi y Cu) para clasificar correctamente el 93% de las muestras analizadas (96% de Beas, 77% de Gibraleón, 91% de Niebla, y 100% de Sanlúcar de Guadiana). Los resultados no son tan buenos como los obtenidos para los suelos y los alperujos, donde no se observaron errores de clasificación. En el caso de los aceites de oliva, la tasa de clasificación fue menor, probablemente debido a las bajas concentraciones de los elementos en los aceites de oliva que pueden causar problemas de sensibilidad. La Figura 4.3 muestra el resultado del SLDA, que señala que la clasificación no está influenciada por las variedades de los olivares a pesar de la selección de Cu, K y Mg.



**Figura 4.3.-** Aplicación del análisis discriminante lineal (LDA) a las concentraciones de ocho elementos (Ba, Bi, Ca, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Sn, W) determinados en los aceites de oliva de las variedades Arbequina, Picual y Verdial de Huévar de cuatro orígenes geográficos (Beas, Gibrleón, Niebla y Sanlúcar de Guadiana).

La coincidencia en la selección de los elementos para la clasificación de los suelos (W, Fe, Na), de alperujo (W, Fe, Na, Mg, Mn, Ca, Ba, Li) y aceites de oliva (W, Fe, Mg, Mn, Ca, Ba, Li, Bi) de acuerdo con la procedencia geográfica indica que algunos elementos presentes en los suelos de los olivares también pueden ser detectados en las aceitunas y en los aceites de oliva, aunque en concentraciones muy bajas. En conclusión, el análisis de los elementos por ICP-MS podría ser una buena técnica para realizar la trazabilidad hacia atrás de los aceites de oliva. Se requieren estudios adicionales para ganar en conocimiento acerca de en qué medida la concentración natural de algunos elementos puede ser modificada por el uso de fertilizantes (ya sea con la aplicación foliar o al suelo) y fungicidas antes de la normalización de la metodología y su propuesta como un posible estándar para la trazabilidad del aceite de oliva en el futuro.

#### **4.1.2.-Determinación de la trazabilidad geográfica atendiendo al estudio de compuestos minoritarios implicados en el origen geográfico.**

La composición en ácidos grasos y esteroides unida al análisis estadístico multivariante ha sido una herramienta importante para la clasificación de los aceites de oliva de acuerdo a su variedad genética y procedencia geográfica.

Por ejemplo, se ha podido distinguir entre aceites de oliva producidos a distintas altitudes atendiendo al contenido en ácidos grasos monoinsaturados y saturados, así como a sus contenidos en ácido palmítico y palmitoleico. En zonas de gran altitud los aceites son más ricos en ácidos monoinsaturados y en ácido palmítico y palmitoleico, mientras que en zonas de baja altitud son más ricos en ácidos saturados (Stefanoudaki y col., 1999).

En el mismo sentido, se ha comprobado que la composición de la fracción de esteroides del aceite de oliva es un parámetro muy útil para la detección de adulteraciones o para comprobar su origen geográfico, Stiti y col. (2002) estudiaron la composición esteroídica del aceite de siete zonas geográficas de Túnez (Chemchali, Chemlali, Chétoui, Gerboui, Ouelati, Sayali y Zalmati) y los resultados mostraron que los esteroides totales,  $\beta$ -sitosterol,  $\Delta^5$ -avenasterol, estigmasterol, y la suma de eritrodol + uvaol fueron las variables más importantes para la caracterización de los aceites, de acuerdo a su origen geográfico.

Las muestras utilizadas tanto para el estudio del contenido en ácidos grasos como para el contenido en esteroides se recogen en la tabla 4.9.

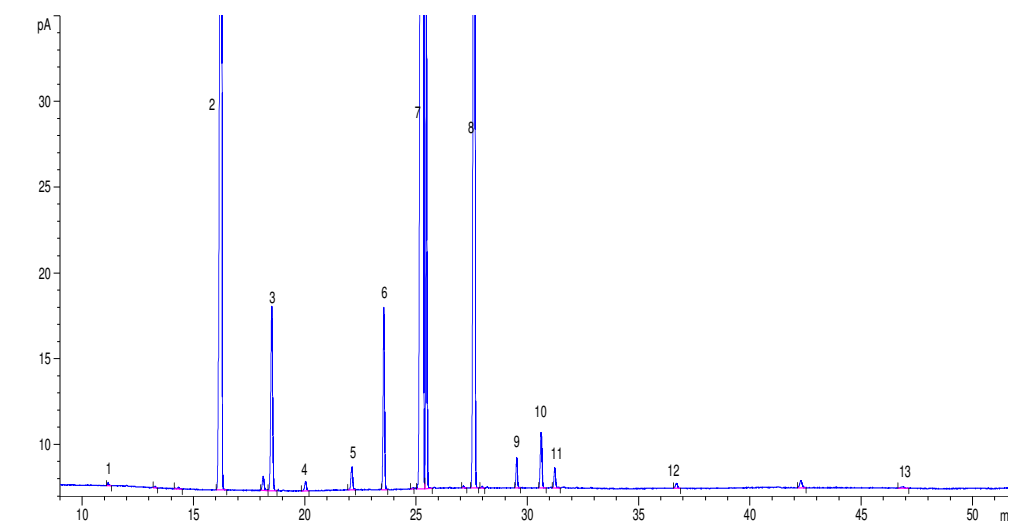
**Tabla 4.9.-**Descripción de las muestras utilizadas para la determinación del perfil de ácidos grasos y para el contenido en esteroides, uvaol y eritrodiool.

MUESTRA	ALMAZARA	PROCEDENCIA	VARIEDAD	MUESTRA	ALMAZARA	PROCEDENCIA	VARIEDAD
A3	Olivar de Huelva	Niebla	Arbequina	A58	Olivar de Huelva	Sanlúcar de Guadiana	Picual
A5	Olivar de Huelva	Niebla	Arbequina	A59	Olivar de Huelva	Sanlúcar de Guadiana	Picual
A7	Olivar de Huelva	Niebla	Arbequina	A61	Olivar de Huelva	Sanlúcar de Guadiana	Picual
A11	Olivar de Huelva	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	A62	Olivar de Huelva	Niebla	Picual
A13	Olivar de Huelva	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	A63	Olivar de Huelva	Niebla	Picual
A15	Olivar de Huelva	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	A64	Olivar de Huelva	Niebla	Picual
A16	Olivar de Huelva	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	A65	Olivar de Huelva	Niebla	Picual
A17	San Bartolomé	Beas	Arbequina	A67	Oleodiel	Gibraleón	Verdial
A18	San Bartolomé	Beas	Arbequina	A70	Oleodiel	Gibraleón	Verdial
A20	San Bartolomé	Beas	Arbequina	A71	Oleodiel	Gibraleón	Verdial
A23	San Bartolomé	Beas	Arbequina	A72	Oleodiel	Gibraleón	Arbequina
A25	San Bartolomé	Beas	Arbequina	A73	Oleodiel	Gibraleón	Arbequina
A28	San Bartolomé	Beas	Picual	A74	Oleodiel	Gibraleón	Arbequina
A30	San Bartolomé	Beas	Picual	A75	Oleodiel	Gibraleón	Arbequina
A31	San Bartolomé	Beas	Picual	A76	Oleodiel	Gibraleón	Arbequina
A34	San Bartolomé	Beas	Picual	A77	Oleodiel	Gibraleón	Picual
A36	San Bartolomé	Beas	Picual	A78	Oleodiel	Gibraleón	Picual
A39	Olivar de Huelva	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	A79	Oleodiel	Gibraleón	Picual
A41	Olivar de Huelva	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina	A80	Oleodiel	Gibraleón	Picual
A46	Olivar de Huelva	Niebla	Arbequina	A81	Oleodiel	Gibraleón	Picual
A50	Olivar de Huelva	Niebla	Arbequina	A88	San Bartolomé	Beas	Verdial
A53	Olivar de Huelva	Niebla	Picual	A92	San Bartolomé	Beas	Verdial
A55	Olivar de Huelva	Sanlúcar de Guadiana	Picual	A95	San Bartolomé	Beas	Verdial
A57	Olivar de Huelva	Sanlúcar de Guadiana	Picual	A96	San Bartolomé	Beas	Verdial

### **Determinación del perfil de ácidos grasos**

Para la determinación del perfil en ácidos grasos de las distintas muestras, se utilizó el método descrito en el apartado 3.4.2 del capítulo 3. Éste método resulta adecuado para separar los distintos ácidos grasos encontrados en las muestras de aceite de oliva, tal como se observa en la Figura 4.4. donde se muestra el cromatograma correspondiente a una muestra de aceite de la variedad Verdial.

La identificación de los picos se realiza por comparación de los tiempos de retención con los obtenidos para el material de referencia (Tabla 3.9).



**Figura 4.4.-**Cromatograma de los ésteres metílicos correspondiente a una muestra de la variedad Verdial.

La aplicación de esta metodología a las distintas muestras de aceite permite cuantificar los ácidos grasos presentes. Los resultados obtenidos, expresados como % se muestran en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10.- Resultados obtenidos del perfil de ácidos grasos de las diferentes muestras en %.

Muestras	Ácido Mirístico	Ácido Palmítico	Ácido Palmitoléico	Ácido Margárico	Ácido Margaroléico	Ácido Estearico	Ácido Oléico	Ácido Linoleico	Ácido Araquídico	Ácido Linolenico	Ácido Gadoléico
A3	0,02	17,87	2,25	0,17	0,32	2,07	63,66	12,45	0,36	0,63	0,22
A5	0,02	17,76	1,92	0,15	0,28	2,06	64,12	12,25	0,37	0,6	0,23
A7	0,02	18,29	1,71	0,17	0,32	2,03	63,61	12,37	0,38	0,61	0,25
A11	0,02	16,58	1,29	0,15	0,27	2,08	67,75	10,4	0,38	0,56	0,25
A13	0,02	17,25	1,58	0,16	0,3	2,08	66,52	10,63	0,38	0,59	0,25
A15	0,02	15,58	1,31	0,12	0,22	2,14	70,51	8,52	0,37	0,55	0,25
A16	0,02	15,6	1,39	0,09	0,17	2,27	71,41	7,68	0,35	0,55	0,23
A17	0,02	17,88	1,93	0,13	0,26	1,87	62,71	13,81	0,36	0,59	0,24
A18	0,02	17,79	1,93	0,13	0,26	1,87	62,8	13,79	0,36	0,59	0,24
A20	0,02	17,67	1,94	0,13	0,26	1,88	62,77	13,88	0,36	0,6	0,25
A23	0,02	17,53	1,97	0,14	0,27	1,9	63,55	13,24	0,35	0,58	0,24
A25	0,02	18,23	1,88	0,13	0,25	1,88	62,45	13,71	0,37	0,6	0,25
A28	0,01	13,13	1,03	0,06	0,09	3,09	76,03	4,62	0,4	0,67	0,22
A30	0,01	12,9	1,03	0,06	0,1	3,19	76,15	4,79	0,39	0,66	0,21
A31	0,02	12,81	1,03	0,06	0,1	3,19	76,23	4,79	0,39	0,66	0,22
A34	0,02	12,33	1	0,06	0,1	3,27	76,52	4,92	0,39	0,65	0,21
A36	0,01	12,43	0,98	0,06	0,1	3,35	76,18	4,96	0,4	0,68	0,22
A39	0,01	16,13	1,61	0,1	0,19	2,02	68,1	10,4	0,35	0,54	0,24
A41	0,02	17,66	1,54	0,12	0,22	1,88	65,92	11,25	0,36	0,5	0,26
A46	0,02	17,61	1,89	0,13	0,26	1,88	61,88	14,85	0,37	0,61	0,27
A50	0,02	17,39	1,96	0,16	0,31	2,06	63,29	13,29	0,39	0,64	0,25
A53	0,01	12,39	1,18	0,06	0,11	2,73	76,31	5,56	0,35	0,55	0,21
A55	0,01	12,84	1,08	0,01	0,05	2,82	77,1	4,21	0,37	0,58	0,22
A57	0,01	13,14	1,21	0,04	0,07	3,11	75,82	4,91	0,34	0,55	0,2

Tabla 4.10.- (Continuación) Resultados obtenidos del perfil de ácidos grasos de las diferentes muestras en %.

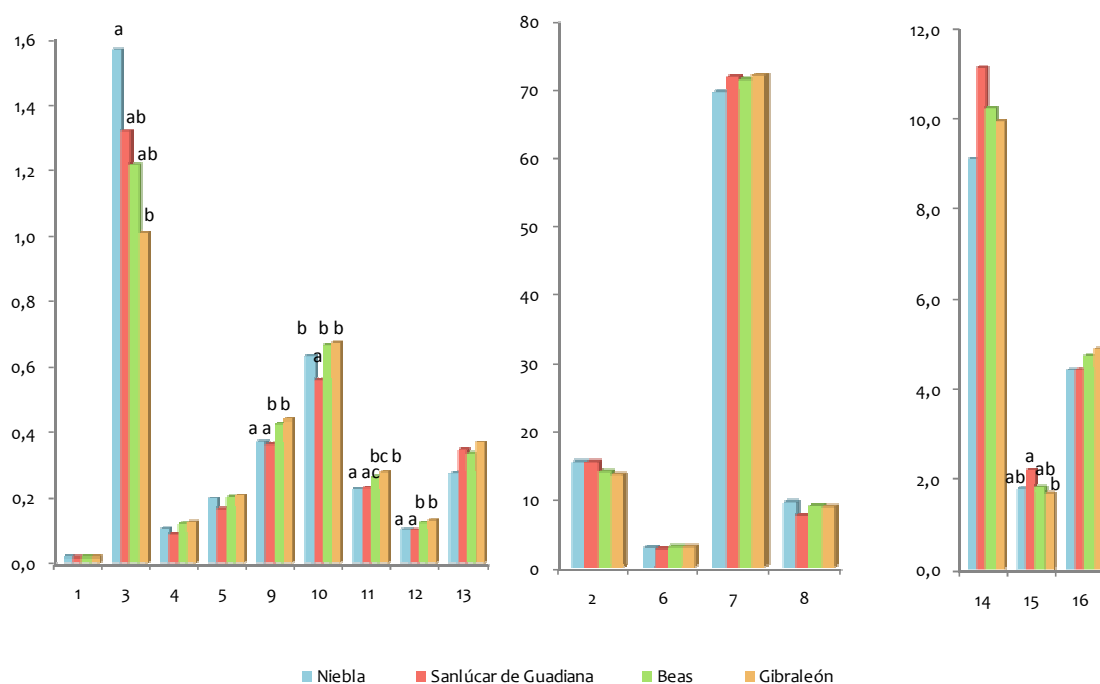
Muestras	Ácido Mírstico	Ácido Palmítico	ácido Palmitoléico	Ácido Margárico	Ácido Margaroléico	Ácido Esteárico	Ácido Oléico	Ácido Linoleico	Ácido Araquídico	Ácido Linolenico	Ácido Gadoléico
A58	0,01	15,77	1,11	0,06	0,1	2,82	73,37	5,18	0,34	0,51	0,2
A59	0,01	13,28	1,07	0,05	0,08	2,87	76,62	4,17	0,36	0,57	0,22
A61	0,01	13,06	1,28	0,05	0,08	3,4	74,74	5,61	0,36	0,64	0,2
A62	0,01	13,15	1,28	0,05	0,08	3,4	74,64	5,61	0,36	0,64	0,2
A63	0,01	13,16	1,28	0,05	0,09	3,44	74,44	5,65	0,38	0,66	0,21
A64	0,01	12,03	1,12	0,05	0,08	3,78	75,2	6,08	0,38	0,68	0,21
A65	0,01	12,24	1,04	0,05	0,09	3,39	76,07	5,44	0,35	0,68	0,19
A67	0,02	11,83	0,68	0,19	0,28	3,35	73,63	7,7	0,55	0,69	0,33
A70	0,01	10,98	0,57	0,18	0,27	3,02	74,15	8,4	0,54	0,76	0,36
A71	0,01	10,29	0,54	0,18	0,27	3,06	75,05	8,26	0,54	0,8	0,37
A72	0,02	17,54	1,47	0,13	0,23	1,89	64,19	13,09	0,36	0,59	0,26
A73	0,02	15,96	1,47	0,13	0,25	1,92	64,96	13,71	0,42	0,61	0,3
A74	0,02	21,39	1,48	0,14	0,24	1,76	62,05	11,63	0,33	0,54	0,23
A75	0,02	15,99	1,48	0,13	0,25	1,85	66,61	12,15	0,38	0,58	0,29
A76	0,02	16,9	1,2	0,12	0,23	1,94	67,06	11,16	0,36	0,54	0,25
A77	0,01	11,13	0,86	0,05	0,09	3,36	77,85	4,7	0,4	0,71	0,22
A78	0,01	10,28	0,86	0,07	0,12	3,37	77,73	5,41	0,45	0,73	0,26
A79	0,01	11,01	0,76	0,08	0,11	3,39	77,87	4,75	0,43	0,69	0,25
A80	0,01	10,55	0,78	0,07	0,11	3,35	78,22	4,86	0,43	0,71	0,25
A81	0,01	11,64	0,91	0,14	0,19	3,82	74,88	6,34	0,49	0,77	0,25
A88	0,01	11,39	0,89	0,13	0,19	3,73	75,42	6,21	0,48	0,76	0,25
A92	0,01	10,24	0,43	0,19	0,28	3,26	75,46	7,74	0,56	0,75	0,38
A95	0,01	10,35	0,47	0,19	0,28	3,25	75,23	7,84	0,57	0,75	0,37
A96	0,01	10,3	0,47	0,19	0,28	3,22	75,47	7,88	0,57	0,75	0,37

**Tabla 4.10.- (Continuación) Resultados obtenidos del perfil de ácidos grasos de las diferentes muestras en %.**

Muestras	Ácido					Muestras	Ácido Behénico	Ácido Lignocérico	C18:1/C18:2	C16:o/C18:2	Insaturado/saturado
	Ácido Behénico	Lignocérico	C18:1/C18:2	C16:o/C18:2	Insaturado/saturado						
A3	0,09	0,11	5,11	1,43	3,84	A58	0,09	0,44	14,16	3,04	4,12
A5	0,1	0,14	5,23	1,45	3,86	A59	0,1	0,59	18,38	3,19	4,79
A7	0,11	0,14	5,14	1,48	3,73	A61	0,09	0,49	13,33	2,33	4,73
A11	0,11	0,16	6,51	1,59	4,13	A62	0,1	0,49	13,3	2,34	4,7
A13	0,11	0,13	6,26	1,62	3,97	A63	0,1	0,53	13,17	2,33	4,66
A15	0,1	0,3	8,27	1,83	4,37	A64	0,1	0,28	12,37	1,98	5,01
A16	0,1	0,15	9,3	2,03	4,38	A65	0,09	0,36	13,99	2,25	5,06
A17	0,1	0,1	4,54	1,29	3,89	A67	0,16	0,6	9,56	1,54	4,99
A18	0,1	0,11	4,56	1,29	3,91	A70	0,17	0,58	8,83	1,31	5,46
A20	0,11	0,15	4,52	1,27	3,92	A71	0,16	0,46	9,09	1,25	5,8
A23	0,1	0,1	4,8	1,32	3,96	A72	0,11	0,12	4,9	1,34	3,96
A25	0,11	0,13	4,55	1,33	3,79	A73	0,14	0,11	4,74	1,16	4,35
A28	0,11	0,54	16,45	2,84	4,76	A74	0,1	0,1	5,33	1,84	3,19
A30	0,11	0,4	15,9	2,69	4,86	A75	0,12	0,14	5,48	1,32	4,37
A31	0,11	0,41	15,93	2,68	4,89	A76	0,1	0,12	6,01	1,51	4,11
A34	0,11	0,42	15,56	2,51	5,02	A77	0,1	0,5	16,56	2,37	5,42
A36	0,11	0,52	15,36	2,51	4,92	A78	0,13	0,56	14,36	1,9	5,72
A39	0,1	0,22	6,55	1,55	4,28	A79	0,12	0,52	16,38	2,32	5,43
A41	0,11	0,16	5,86	1,57	3,92	A80	0,12	0,53	16,1	2,17	5,64
A46	0,11	0,12	4,17	1,19	3,94	A81	0,14	0,42	11,81	1,84	5,01
A50	0,11	0,12	4,76	1,31	3,94	A88	0,13	0,41	12,15	1,84	5,14
A53	0,09	0,45	13,72	2,23	5,22	A92	0,17	0,53	9,75	1,32	5,68
A55	0,1	0,6	18,29	3,05	4,97	A95	0,17	0,52	9,59	1,32	5,64
A57	0,09	0,52	15,45	2,68	4,8	A96	0,17	0,31	9,58	1,31	5,77

Tabla 4.10.- (Continuación) Resultados obtenidos del perfil de ácidos grasos de las diferentes muestras en %.

Muestras	Ácido					Muestras	Ácido Behénico	Ácido Lignocérico	C18:1/C18:2	C16:o/C18:2	Insaturado/saturado
	Ácido Behénico	Lignocérico	C18:1/C18:2	C16:o/C18:2	Insaturado/saturado						
A3	0,09	0,11	5,11	1,43	3,84	A58	0,09	0,44	14,16	3,04	4,12
A5	0,1	0,14	5,23	1,45	3,86	A59	0,1	0,59	18,38	3,19	4,79
A7	0,11	0,14	5,14	1,48	3,73	A61	0,09	0,49	13,33	2,33	4,73
A11	0,11	0,16	6,51	1,59	4,13	A62	0,1	0,49	13,3	2,34	4,7
A13	0,11	0,13	6,26	1,62	3,97	A63	0,1	0,53	13,17	2,33	4,66
A15	0,1	0,3	8,27	1,83	4,37	A64	0,1	0,28	12,37	1,98	5,01
A16	0,1	0,15	9,3	2,03	4,38	A65	0,09	0,36	13,99	2,25	5,06
A17	0,1	0,1	4,54	1,29	3,89	A67	0,16	0,6	9,56	1,54	4,99
A18	0,1	0,11	4,56	1,29	3,91	A70	0,17	0,58	8,83	1,31	5,46
A20	0,11	0,15	4,52	1,27	3,92	A71	0,16	0,46	9,09	1,25	5,8
A23	0,1	0,1	4,8	1,32	3,96	A72	0,11	0,12	4,9	1,34	3,96
A25	0,11	0,13	4,55	1,33	3,79	A73	0,14	0,11	4,74	1,16	4,35
A28	0,11	0,54	16,45	2,84	4,76	A74	0,1	0,1	5,33	1,84	3,19
A30	0,11	0,4	15,9	2,69	4,86	A75	0,12	0,14	5,48	1,32	4,37
A31	0,11	0,41	15,93	2,68	4,89	A76	0,1	0,12	6,01	1,51	4,11
A34	0,11	0,42	15,56	2,51	5,02	A77	0,1	0,5	16,56	2,37	5,42
A36	0,11	0,52	15,36	2,51	4,92	A78	0,13	0,56	14,36	1,9	5,72
A39	0,1	0,22	6,55	1,55	4,28	A79	0,12	0,52	16,38	2,32	5,43
A41	0,11	0,16	5,86	1,57	3,92	A80	0,12	0,53	16,1	2,17	5,64
A46	0,11	0,12	4,17	1,19	3,94	A81	0,14	0,42	11,81	1,84	5,01
A50	0,11	0,12	4,76	1,31	3,94	A88	0,13	0,41	12,15	1,84	5,14
A53	0,09	0,45	13,72	2,23	5,22	A92	0,17	0,53	9,75	1,32	5,68
A55	0,1	0,6	18,29	3,05	4,97	A95	0,17	0,52	9,59	1,32	5,64
A57	0,09	0,52	15,45	2,68	4,8	A96	0,17	0,31	9,58	1,31	5,77



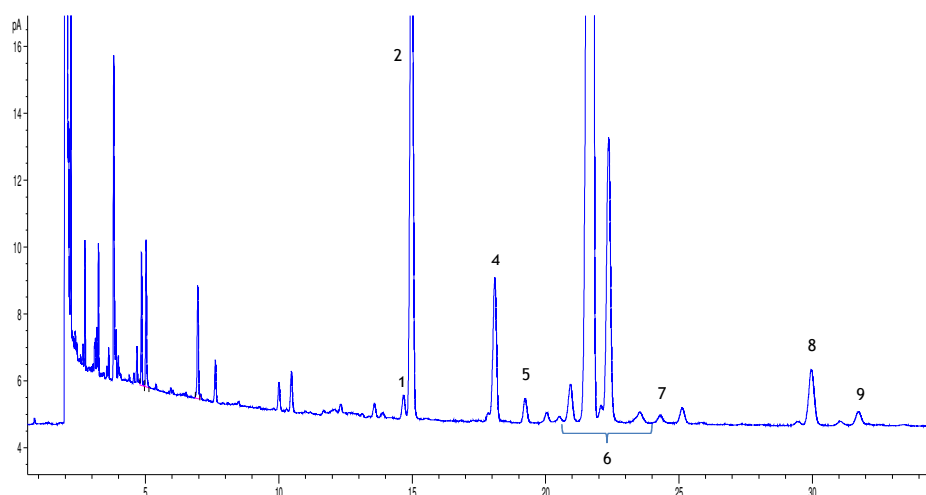
**Figura 4.5.** –Contenido medio de los distintos ácidos grasos (1. Mirístico, 2. Palmítico, 3. Palmitoleico, 4. Margárico, 5. Margaroleico, 6. Esteárico, 7. Oleico, 8. Linoleico, 9. Araquídico, 10. Linolénico, 11. Gadoleico, 12. Behénico, 13. Lignocérico, 14. C18:1/c18:2, 15. C16:0/c18:2, Insaturado/saturado) en las cuatro zonas de estudio (Niebla, Sanlúcar del Guadiana, Beas y Gibraleón). Los valores con la misma letra indican que no existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) según el test LSD.

Los resultados obtenidos al aplicar el análisis de la varianza muestran que la zona de cultivo tiene un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre algunos de estos compuestos (ácidos palmitoleico, araquídico, linolénico, gadoleico, behénico, así como la relación C16:0/C18:2). Las diferencias significativas entre las medias de cada grupo fueron evaluadas mediante el test LSD de Fisher. La figura 4.5 representa comparativamente los valores de los distintos ácidos grasos para las muestras de las cuatro zonas de producción estudiadas, las diferentes letras sobre las barras indican las diferencias significativas entre los grupos. Se observa como el contenido en ácidos grasos mayoritarios (palmítico, esteárico, oleico y linoleico) no presenta diferencias significativas entre las muestras analizadas. Si analizamos el contenido en ácido palmitoleico las muestras pertenecientes a la zona de Niebla presentan diferencias

significativas respecto a las muestras procedentes de Gibraleón, no mostrando diferencias significativas con las procedentes de las otras dos zonas de estudio. Para los ácidos araquídico y behénico las muestras de Niebla y Sanlúcar de Guadiana difieren de forma significativa de las muestras de Beas y Gibraleón, mientras que para el contenido en ácido linolénico las muestras de Sanlúcar difieren significativamente de los aceites de las otras zonas. Para el ácido gadoleico, las muestras procedentes de Niebla presentan diferencias significativas con la de Beas y Gibraleón, mientras que las de Sanlúcar solo difieren de las de Gibraleón. Por último, para la relación C16:0/C18:2 las muestras pertenecientes a la zona de Sanlúcar de Guadiana presentan diferencias significativas respecto a las muestras procedentes de Gibraleón, no mostrando diferencias significativas con las procedentes de las otras dos zonas de estudio.

#### **Determinación de esteroides y eritrodiol y uvaol**

El análisis de esteroides se realiza siguiendo el método cromatográfico descrito en el apartado 3.4.3 del capítulo 3, que como puede observarse en la figura 4.6 permite la separación de los compuestos esteroides estudiados.

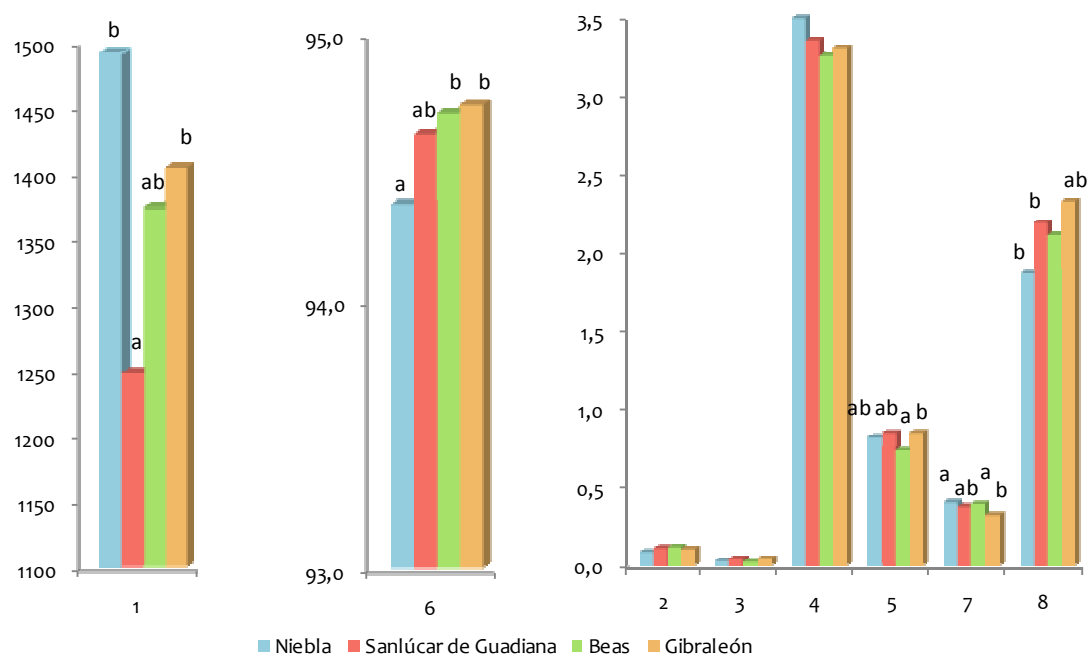


**Figura 4.6.**-Cromatograma de esteroides de una muestra de aceite de oliva virgen extra. 1. Colesterol; 2. Patrón interno; 3. Brasicasterol; 4. Campesterol; 5. Estigmasterol; 6. B-Sitosterol aparente; 7.  $\Delta$ -7-Estigmasterol; 8. Eritrodiol; 9. Uvaol.

Los resultados del análisis de esteroides en las muestras así como la suma de las concentraciones de eritrodial y uvaol, expresadas en porcentaje se encuentran recogidos así mismo en las Tabla 4.11.

**Tabla 4.11.-Resultados del contenido en esteroides, uvaol y eritrodial.**

		Esteroides							
		Totales	Coolesterol	Brasicolesterol	Campesterol	estigmasterol	$\beta$ -Sitosterol	$\Delta^7$ estigmasterol	Eritrodial+u
A3	Arbequina	1704,00	0,10	0,01	3,90	0,80	93,90	0,50	2,60
A5	Arbequina	1474,00	0,10	0,01	3,90	0,90	94,00	0,40	2,40
A7	Arbequina	1448,00	0,01	0,01	3,90	1,10	93,80	0,50	2,70
A11	Arbequina	1120,00	0,10	0,01	3,70	0,90	94,20	0,40	3,60
A13	Arbequina	1391,00	0,01	0,01	3,90	0,90	94,10	0,50	3,10
A15	Arbequina	1141,00	0,20	0,01	3,50	0,90	94,30	0,50	3,20
A16	Arbequina	1194,00	0,10	0,10	3,40	0,90	94,60	0,40	2,30
A17	Arbequina	1651,00	0,10	0,01	3,60	0,90	94,30	0,40	2,30
A18	Arbequina	1490,00	0,10	0,01	3,60	0,90	94,30	0,30	2,20
A20	Arbequina	1677,00	0,10	0,01	3,60	0,80	94,50	0,40	2,40
A23	Arbequina	1502,00	0,10	0,01	3,60	0,80	94,40	0,30	2,10
A25	Arbequina	1664,00	0,01	0,01	3,60	0,90	94,40	0,30	2,60
A28	Picual	1330,00	0,10	0,10	2,90	0,70	95,00	0,50	1,90
A30	Picual	1285,00	0,10	0,01	3,00	0,70	95,00	0,50	1,90
A31	Picual	1217,00	0,10	0,01	3,00	0,70	94,90	0,60	2,00
A34	Picual	1360,00	0,20	0,10	2,90	0,70	94,80	0,50	1,90
A36	Picual	1361,00	0,10	0,01	3,00	0,70	94,90	0,50	1,90
A39	Arbequina	1422,00	0,20	0,10	3,50	0,80	94,50	0,30	2,20
A41	Arbequina	1444,00	0,10	0,01	3,70	0,90	94,30	0,30	2,40
A46	Arbequina	1756,00	0,10	0,01	3,80	1,00	94,00	0,30	2,20
A50	Arbequina	1556,00	0,20	0,01	3,90	0,90	93,90	0,30	2,10
A53	Picual	1228,00	0,01	0,01	3,10	0,80	95,00	0,40	1,80
A55	Picual	1112,00	0,20	0,01	3,00	0,80	94,80	0,40	1,60
A57	Picual	1182,00	0,10	0,01	3,00	0,80	94,80	0,40	1,40
A58	Picual	1089,00	0,01	0,10	3,10	0,80	95,20	0,30	1,70
A59	Picual	1200,00	0,10	0,01	3,00	0,80	95,10	0,40	1,50
A61	Picual	1433,00	0,10	0,10	3,10	0,80	95,00	0,30	1,20
A62	Picual	1359,00	0,01	0,10	3,10	0,80	94,90	0,30	1,20
A63	Picual	1450,00	0,20	0,01	3,10	0,80	94,70	0,40	1,10
A64	Picual	1506,00	0,10	0,01	3,20	0,60	94,60	0,50	1,30
A65	Picual	1427,00	0,01	0,10	3,10	0,50	94,80	0,50	1,30
A67	Verdial	1208,00	0,10	0,10	2,80	1,00	94,90	0,30	6,00
A70	Verdial	1020,00	0,10	0,10	3,20	0,80	94,80	0,30	6,80
A71	Verdial	1228,00	0,20	0,10	3,20	0,90	94,50	0,40	7,50
A72	Arbequina	1550,00	0,01	0,01	3,60	0,70	94,90	0,20	2,20
A73	Arbequina	1655,00	0,10	0,01	3,60	0,70	94,80	0,20	2,20
A74	Arbequina	1521,00	0,01	0,01	3,80	0,70	94,70	0,20	2,10
A75	Arbequina	1368,00	0,10	0,01	3,60	0,70	94,70	0,30	1,90
A76	Arbequina	1540,00	0,01	0,10	3,50	0,70	94,80	0,20	2,60
A77	Picual	1343,00	0,10	0,01	3,20	0,80	94,90	0,40	1,50
A78	Picual	1372,00	0,20	0,01	3,10	1,10	94,40	0,50	2,60
A79	Picual	1409,00	0,10	0,10	3,20	0,80	94,90	0,40	2,60
A80	Picual	1344,00	0,20	0,01	3,30	0,80	94,90	0,30	3,00
A81	Picual	1695,00	0,10	0,01	2,90	1,30	94,40	0,50	2,50
A88	Verdial	1154,00	0,20	0,01	3,20	0,70	94,80	0,40	7,50
A92	Verdial	1204,00	0,20	0,01	3,20	0,60	94,80	0,30	7,60
A95	Verdial	1193,00	0,1	0,01	3,20	0,60	94,80	0,30	8,00
A96	Verdial	1138,00	0,10	0,01	3,20	0,60	95,00	0,30	7,30



**Figura 4.7.** Contenido medio de los distintos esteroides (1. Esteroides Totales, 2. Colesterol, 3. Brasicasterol, 4. Campesterol, 5. Estigmasterol, 6.  $\beta$ -Sitosterol, 7.  $\Delta$ -7-Estigmasterol, 8. Eritrodiol+Uvaol) en las cuatro zonas de estudio (Niebla, Sanlúcar del Guadiana, Beas y Gibraleón). Los valores con la misma letra indican que no existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) según el test LSD.

En la figura 4.7 se representa comparativamente los valores de los distintos esteroides analizados en las muestra de las cuatro zonas de producción estudiadas, las diferentes letras sobre las barras indican las diferencias significativas entre los grupos obtenidas al aplicar el análisis de la varianza a los datos. Las diferencias significativas entre las medias de cada grupo fueron evaluadas mediante el test LSD de Fisher. Se observa como la zona de cultivo tiene un efecto significativo ( $p < 0.05$ ) sobre el contenido en esteroides totales, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol,  $\Delta$ 7-estigmasterol, eritrodiol+ uvaol. En las muestras procedentes de Sanlúcar de Guadiana, el contenido en esteroides totales difiere significativamente del de las muestras de Gibraleón y Niebla siendo mayor en esta última. El contenido en el esteroide mayoritario ( $\beta$ -sitosterol) en las

muestras procedentes de Niebla presenta diferencias significativas con las muestras procedentes de Beas y Gibraleón. Para el estigmasterol, las muestras de Beas tienen diferencias significativas con las de Gibraleón, mientras que para el contenido en  $\Delta$ -7-estigmasterol son las muestras procedentes de Gibraleón las que presentan diferencias significativas con las de Niebla y Beas. La suma de eritrodiol y uvaol en los aceites de Beas es significativamente más pequeña que Niebla y Sanlúcar de Guadiana.

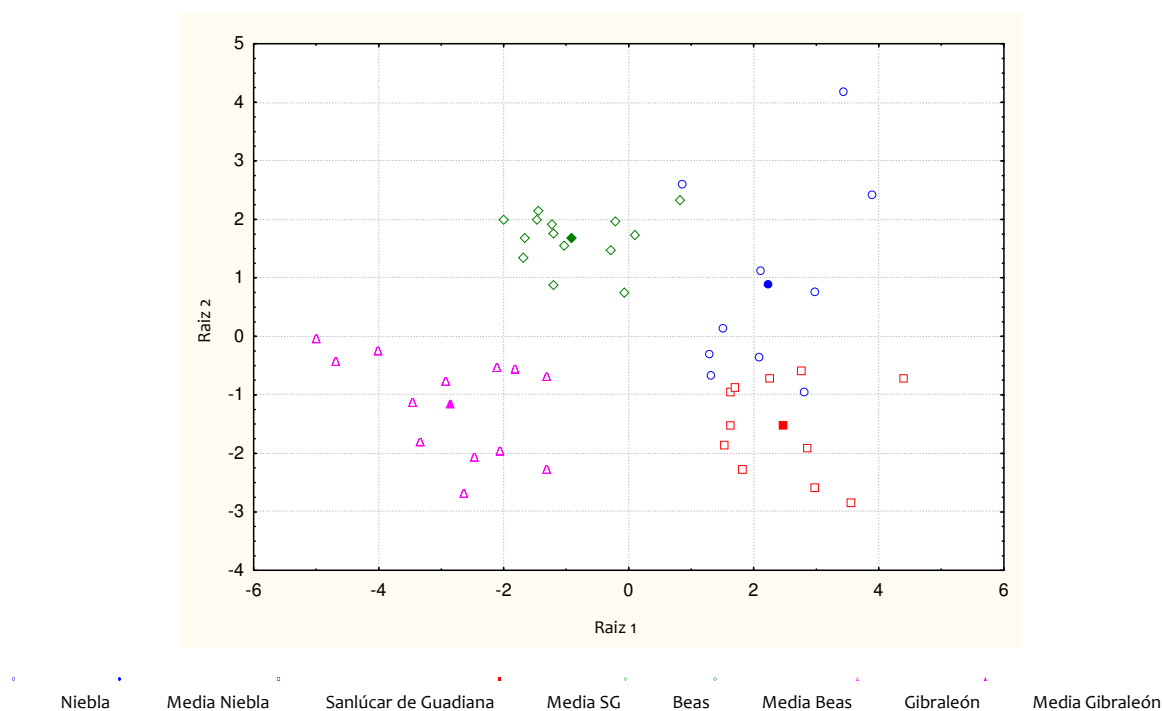
La aplicación del LDA a los resultados obtenidos para el contenido en ácidos grasos y esteroides (utilizando criterios de selección sucesiva de variables y F entrada =1), muestra un porcentaje de clasificaciones correctas del 93,75 % tal como puede observarse en la matriz de clasificación mostrada en la Tabla 4.12. Sólo dos muestras procedentes de Sanlúcar de Guadiana y una de Niebla no se clasifican correctamente en su grupo.

**Tabla 4.12.-**Matriz de Clasificación resultante del análisis discriminante.

	Porcentaje correcto	Niebla p=,20833	Sanlúcar de Guadiana p=,22917	Beas p=,29167	Gibraleón p=,27083
<b>Niebla</b>	90,0000	9	1	0	0
<b>Sanlúcar de Guadiana</b>	81,8182	2	9	0	0
<b>Beas</b>	100,0000	0	0	14	0
<b>Gibraleón</b>	100,0000	0	0	0	13
<b>Total</b>	93,7500	11	10	14	13

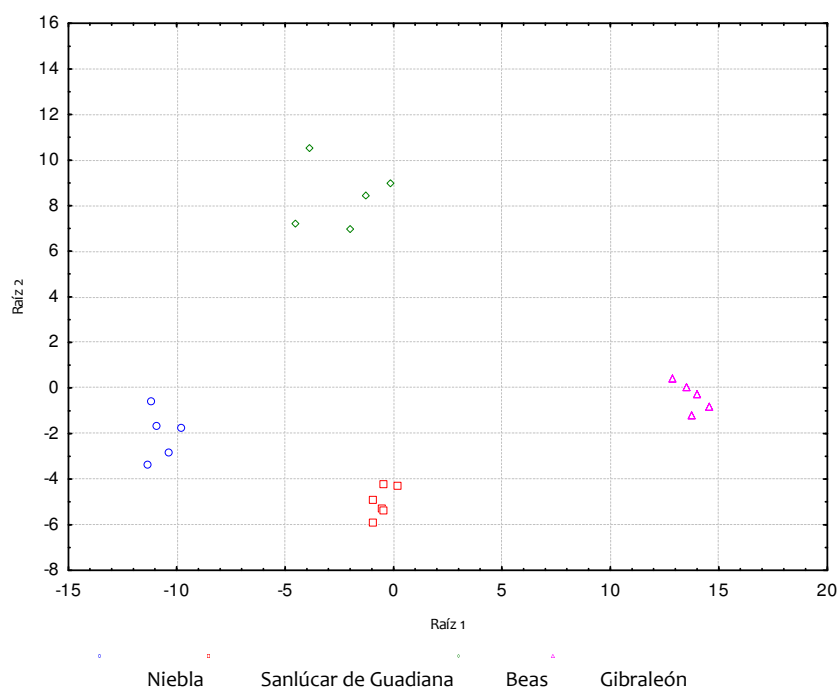
Las funciones discriminantes calculadas permiten diferenciar los cuatro grupos de muestras, de forma que cada uno de ellos aparece en un cuadrante del plano definido por las dos primeras funciones canónicas (Figura 4.8). Así la función 1 separa las muestras de Niebla y Sanlúcar de Guadiana (scores positivos) de Beas y Gibraleón (scores negativos), y cada pareja a su vez es separada por la función 2. Las variables con mayor poder de discriminación fueron los ácidos esteárico, gadoleico, behénico, palmitoleico y linolénico (correlacionados con la Función 1) y el ácido araquídico, el

campesterol, el ácido palmitoleico y el estigmasterol (correlacionados con la función 2).

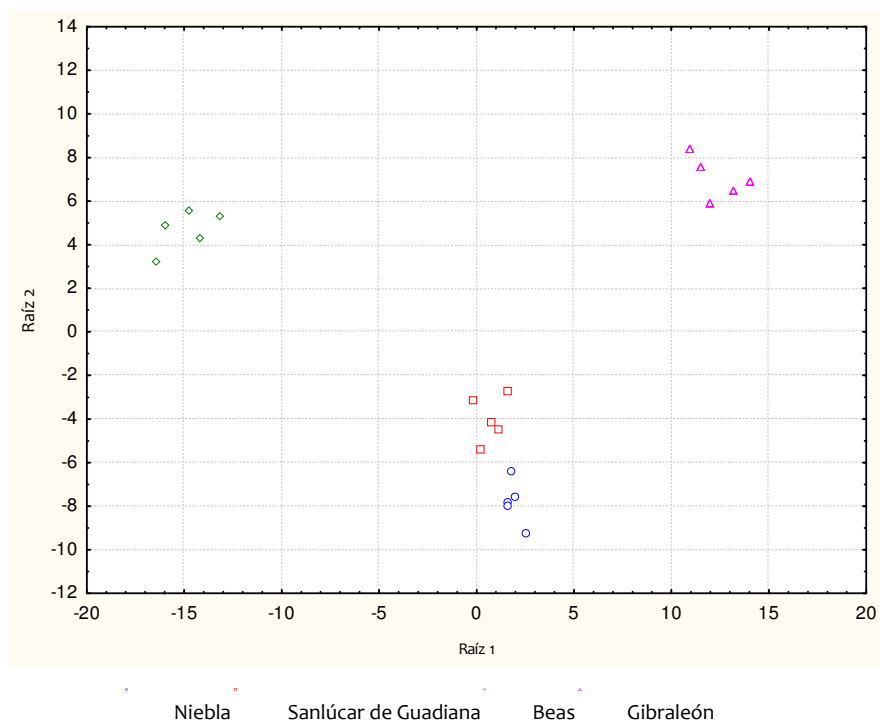


**Figura 4.8.** Representación de las funciones discriminante obtenidas para el conjunto de todas las muestra en base a los contenidos de ácidos grasos y esteroides.

Cuando se aplica el análisis discriminante estándar para cada una de las variedades de manera independiente, utilizando las variables seleccionadas como significativas por el MANOVA, se observa una buena separación entre los cuatro grupos cuando las muestras se representaron en el plano definido por las funciones canónicas principales (Figuras 4.9 y 4.10). En el caso de la variedad Picual, los aceites procedentes de Beas son los que se muestran más diferentes del resto, mientras que para la variedad Arbequina, las mayores diferencias las encontramos para las muestras de Gibraleón.



**Figura 4.9.-** Representación de las funciones discriminantes obtenidas para el conjunto de Muestras de la variedad Arbequina en base a sus contenidos en ácidos grasos y esteroides.



**Figura 4.10.-** Representación de las funciones discriminantes obtenidas para el conjunto de muestras de la variedad Picual en base a sus contenidos en ácidos grasos y esteroides.

## **4.2.- Trazabilidad sensorial**

Determinados compuestos relacionados con el aroma y el sabor son biomarcadores de cualquier manipulación o mal procesamiento que haya sufrido la aceituna. Por tanto, es necesario desarrollar sistemas que garanticen que los marcadores de los diversos estadios en la vida de un alimento puedan ser rastreados de forma sencilla y eficaz.

El aceite de oliva virgen extra tiene una composición química muy variable (Boggia, R., y col.2002). Esta variabilidad depende sobre todo de la variedad de la oliva, de las condiciones climáticas, agronómicas (riego, fertilización), del cultivo (cosecha, maduración) y de su elaboración (almacenamiento post-cosecha, extracción, batido) (Aparicio, R, y col., 2002). Estos factores pueden afectar sustancialmente la composición fenólica y a los compuestos volátiles (Aparicio-Ruíz, R. y col., 2000)

La concentración y composición de los compuestos fenólicos y aromáticos unida al análisis multivariante ha sido utilizada por diversos autores para la clasificación de los aceites en función de su variedad y de su procedencia geográfica. (Ouni Y. y col., G. Luna y col., Ouni Y. y col, Alkan D. y col.)

### **4.2.1.- Análisis de fenoles mediante HPLC-DAD**

Para la determinación del perfil fenólico de las distintas muestras de aceites se aplicó el método descrito en el Capítulo 3, apartado 3.5.

Las Figuras 4.11- 4.13, muestran los cromatogramas correspondientes a una muestra de aceite de oliva virgen extra tras someterla al proceso de extracción, registradas a distintas longitudes de onda, 280, 320 y 360 nm respectivamente. La identificación de los picos se realizó mediante comparación de los tiempos de retención y de los espectros con los de los estándares puros.

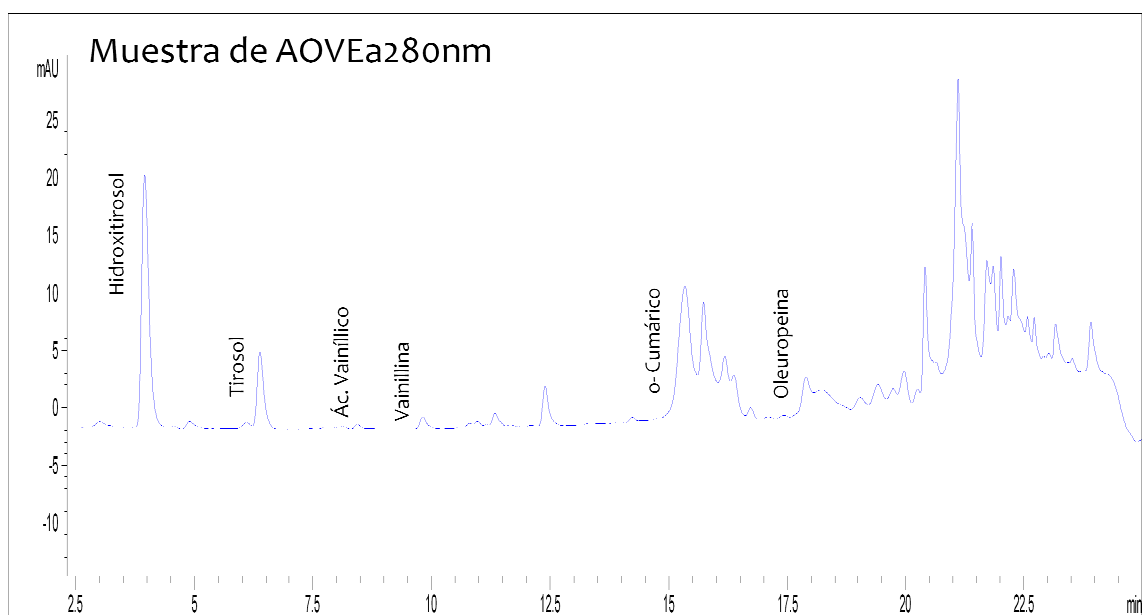


Figura 4.11.-Cromatograma a 280 nm de una muestra de aceite de oliva.

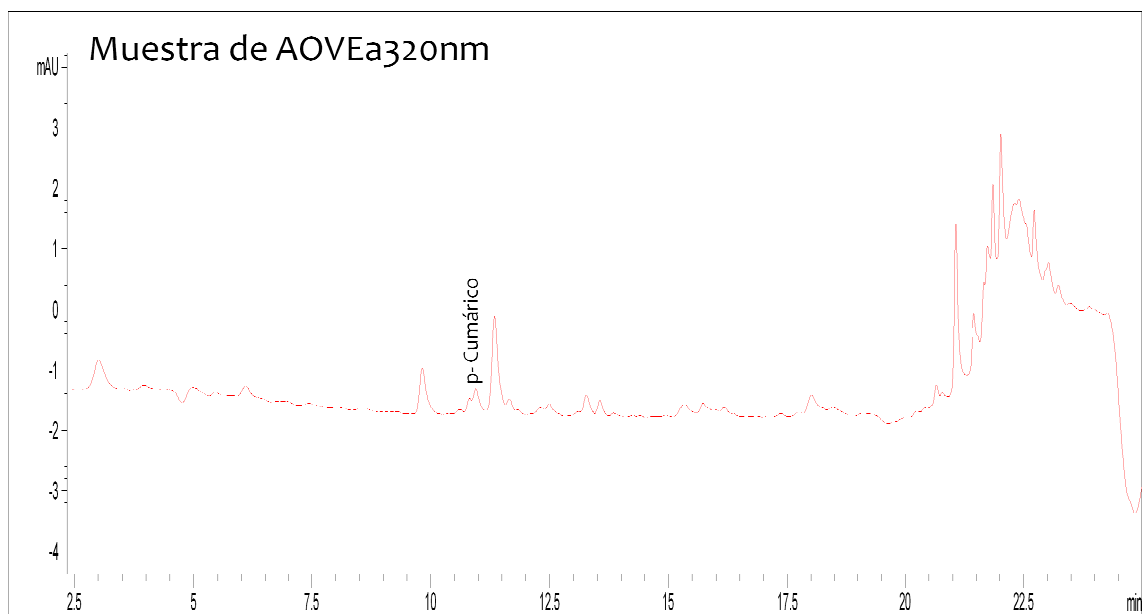


Figura 4.12.-Cromatograma a 320nm de una muestra de aceite de oliva.

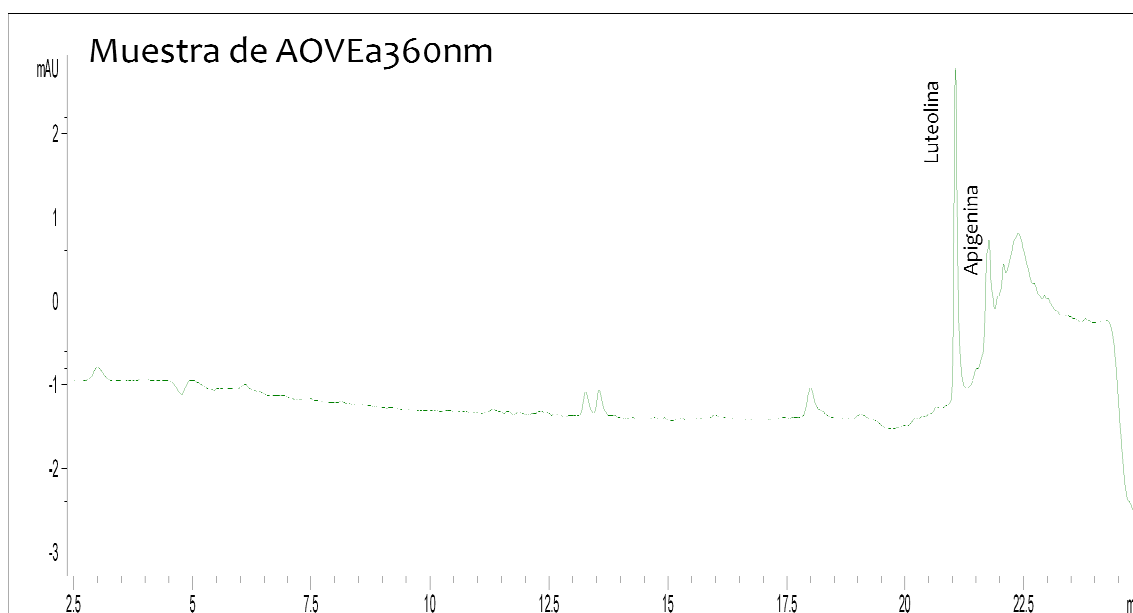


Figura 4.13.-Cromatograma a 360 nm de una muestra de aceite de oliva.

Los compuestos identificados en las muestras fueron: el hidroxitirosol, tirosol, ácido vainílico, vainillina, ácido p-cumárico, ácido o-cumárico, luteolina y apigenina.

Los compuestos fenólicos identificados en las muestras de aceite de oliva virgen extra analizadas se recogen en la Tabla 4.13.

**Tabla 4.13.-**Características cromatográficas de los compuestos fenólicos identificados en las muestras.

Compuestos fenólicos	$\lambda$ (nm)	$t_R$ (minutos)
Hidroxitirosol	280	2.3
Tirosol	280	4.0
Ácido vainílico	280	6.5
Vainillina	280	8.2
Ácido p-cumárico	320	11.5
Ácido o-cumárico	280	15.0
Oleuropeina	280	17.3
Luteolina	360	21.1
Apigenina	360	21.7

Los resultados de los compuestos fenólicos obtenidos para las distintas muestras analizadas, se presentan en las Tablas 4.14- 4.16.

**Tabla 4.14.-** Contenido de los compuestos fenólicos individuales de las muestras procedentes de Niebla determinados mediante HPLC-DAD (mg Kg<sup>-1</sup>)

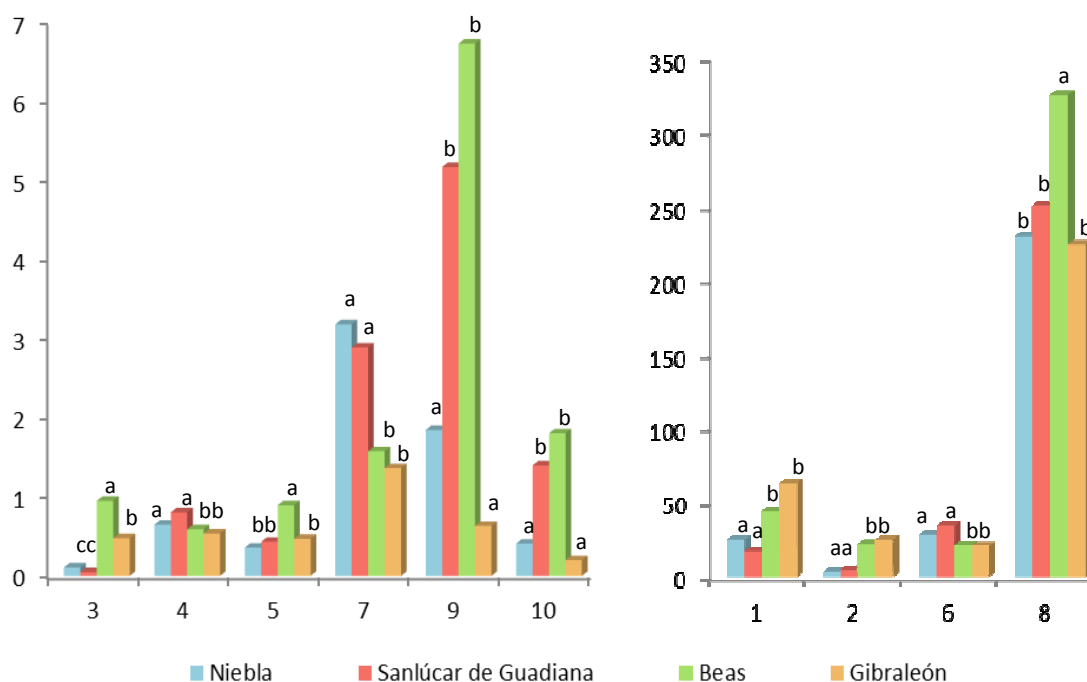
Muestras	Hidroxitirozol	Tirozol	Ac. Vainillico	Vainillina	Ac. p-Cumarico	Ac. o-Cumarico	Rutina	Oleuropeina	Luteolina	Apigenina
A1	6,5416	0,6055	nd	0,6342	nd	22,7031	3,5049	223,3577	3,5794	1,0794
A2	6,0448	nd	nd	0,6345	nd	55,3799	3,8538	135,6572	1,7526	0,1564
A3	6,6657	0,3571	nd	0,5896	nd	91,3085	3,8732	197,2993	0,7012	nd
A4	5,1385	nd	nd	0,3000	0,3789	73,5452	2,4078	230,8221	8,4551	1,7199
A5	5,3279	nd	nd	0,4890	0,1251	56,9016	2,3598	186,3278	4,8693	0,9974
A6	4,4755	nd	nd	0,8909	0,0485	23,1964	4,6336	278,1549	3,6200	0,7611
A7	4,1998	nd	nd	0,6584	0,0283	25,4235	4,6401	332,7051	3,5594	0,9700
A8	5,1536	nd	nd	0,6802	0,1902	38,2505	4,8447	292,0458	3,3837	0,9342
A9	8,3301	nd	nd	0,1367	0,2802	40,4726	1,6323	127,8301	4,4821	0,5357
A37	9,3919	0,0947	nd	0,2977	0,0474	24,9613	2,6762	358,7012	2,4491	nd
A38	8,5759	0,2353	nd	0,3710	nd	21,7782	2,4599	320,5345	2,3414	0,6142
A44	5,1414	nd	nd	0,7631	nd	29,8837	4,1796	253,7930	8,2432	2,8406
A45	4,5271	3,3027	nd	1,1067	0,8280	14,6710	5,4212	247,6818	nd	nd
A46	3,4725	2,1984	nd	1,0142	0,5157	4,3084	5,1241	167,5575	nd	nd
A47	4,7266	2,5536	nd	1,2499	0,5018	17,3628	5,4020	229,1496	nd	nd
A48	4,1321	1,6972	nd	0,8808	0,5072	3,3261	5,1578	158,1324	0,0118	nd
A49	6,6881	1,7830	nd	0,8016	0,4217	18,4068	3,9513	261,1571	nd	nd
A50	3,9586	nd	nd	0,9022	0,0730	9,6566	4,3653	189,7326	nd	nd
A51	4,4025	0,0712	nd	0,9077	0,0498	9,4302	4,3422	187,1829	nd	nd
A52	7,2884	1,5962	nd	0,7173	0,5001	21,9176	2,7385	282,9639	nd	nd
A61	31,7161	13,3381	0,5436	0,5005	1,5012	14,1424	1,1901	157,4649	nd	nd
A62	317,6810	12,7543	1,1482	0,5454	1,4609	13,7510	1,1009	138,1924	0,1194	nd
A63	34,3373	13,5986	0,4422	0,5579	1,4581	14,3761	1,1340	155,6535	0,3512	nd
A64	48,8285	11,9730	0,3033	0,3546	0,1138	28,1444	nd	265,7705	nd	nd
A65	63,4618	11,9675	0,3293	0,3674	0,1822	32,6480	0,6519	317,6985	nd	nd
A66	41,6686	7,8277	nd	0,4774	0,0710	34,1778	0,9855	278,1787	nd	nd

Tabla 4. 15.-Contenido de los compuestos fenólicos individuales de las muestras procedentes de Beas determinados mediante HPLC-DAD (mg Kg<sup>-1</sup>)

Muestras	Hidroxitiroso	Tiroso	Ac. Vainilico	Vainillina	Ac. p-Cumarico	Ac. o-Cumarico	Rutina	Oleuropeina	Luteolina	Apigenina
A17	11,0103	0,7984	0,2736	0,8713	0,7333	25,8257	2,5032	379,5461	18,7576	4,1672
A18	8,4837	0,7578	0,6347	0,9645	0,8428	26,0786	2,7458	403,6480	14,0006	3,3941
A19	9,2892	1,3654	1,0098	1,2548	1,0895	31,8127	3,4264	469,7790	13,1329	3,2623
A20	9,3177	0,4342	1,0357	0,8943	0,7477	25,3752	1,9716	167,7282	10,2110	2,5440
A21	9,4557	1,2960	0,8150	1,0130	0,8258	24,3513	2,7396	169,7050	11,3342	2,8864
A22	9,9109	0,0697	0,8651	0,8181	0,5966	29,7126	2,5710	215,6607	10,2298	2,4549
A23	10,4281	2,0284	0,8026	0,8963	0,4160	29,9157	2,6029	214,8339	10,6360	2,4927
A24	8,6946	0,0228	0,7947	0,8916	0,5286	32,1041	2,4101	229,6186	11,4337	2,6487
A25	11,8870	2,5897	1,5806	1,1262	1,1538	23,1688	3,2086	168,5399	13,4023	3,2094
A26	12,5319	3,7880	1,9520	1,4603	1,5465	30,0119	4,0776	210,0919	16,3181	3,9503
A27	23,8559	6,1983	0,4556	0,6282	0,8147	15,0272	1,2664	198,4450	5,6354	1,6722
A28	25,1973	7,2619	0,5128	0,6558	0,9372	16,9785	1,3534	223,9558	6,5948	2,0251
A29	31,2053	9,4141	0,9477	0,5692	1,0684	16,7880	1,0783	218,6668	6,4651	1,9882
A30	28,9216	8,0438	1,0084	0,4933	0,9615	15,9404	1,0118	209,5087	6,5442	1,9318
A31	32,4490	9,1953	1,0129	0,5874	1,1404	17,9253	1,2001	233,2696	6,7579	2,0695
A32	23,8258	13,3463	1,8330	0,2527	0,7231	10,5662	1,3022	194,2212	8,5703	2,2581
A33	22,1893	10,6768	1,8137	0,3787	0,7347	12,7444	1,1694	197,6190	8,2441	2,2455
A34	17,9453	9,4846	1,0559	0,3689	0,5884	11,7750	1,2323	306,5469	7,7776	2,2768
A35	21,8802	6,5077	0,6746	0,7394	0,9444	13,0379	1,3818	166,4649	7,0472	3,2393
A36	20,5867	9,8006	1,5409	0,4077	0,7223	11,6900	0,8347	400,0055	6,3606	1,5666
A88	71,2047	47,7022	0,7530	0,3452	0,5336	22,7433	0,8674	557,5485	0,1622	0,0948
A89	79,9208	46,7959	0,1426	0,2537	0,6708	25,5353	0,7617	571,1905	0,2027	0,1627
A90	78,8549	46,0677	0,2874	0,2728	0,6515	24,9684	0,8014	552,0189	nd	nd
A91	108,7305	55,5066	0,2505	0,2457	0,8303	22,8322	0,6885	528,3977	0,1750	0,1360
A92	112,3933	66,5452	1,1544	0,2015	1,3286	22,0138	0,8086	413,4429	0,0819	0,0017
A93	111,5338	66,0399	1,1708	0,1971	1,3505	22,3726	0,6318	420,7395	0,1563	0,1444
A94	123,3459	65,3661	0,6883	0,1588	1,3393	23,1539	0,6081	436,8406	0,6083	0,4262
A95	92,2564	56,1536	0,9994	0,3120	0,9389	20,7604	0,7072	456,8896	0,3558	0,3141
A96	95,7129	56,5973	1,3539	0,2735	1,0435	17,3966	0,5996	372,4818	0,4890	0,5080
A97	96,2305	57,1119	1,0280	0,1616	0,9884	16,7791	0,6527	460,8073	0,0438	nd

**Tabla 4.16.** Contenido de los compuestos fenólicos individuales de las muestras procedentes de Sanlúcar de Guadiana y Gibraleón determinados mediante HPLC-DAD (mg Kg<sup>-1</sup>)

	Hidroxitirosol	Tirosol	Ac. Vainillico	Vainillina	Ac. p-Cumarico	Ac. o-Cumarico	Rutina	Oleuropeina	Luteolina	Apigenina
A10	7,0956	nd	nd	1,0152	0,1791	51,3460	3,9862	249,8171	4,6687	1,4848
A11	4,5105	nd	nd	1,3502	0,3436	42,4105	5,0246	245,6764	9,7519	2,5110
A12	4,8186	nd	nd	1,2099	0,0099	54,1962	5,3861	221,4677	6,3042	1,7177
A13	9,9563	nd	nd	0,8067	nd	58,4764	4,2702	144,7476	8,4369	1,6636
A14	4,4397	nd	nd	1,1726	0,3743	40,4013	4,5653	164,0269	9,3698	2,2253
A15	6,4069	nd	nd	1,0178	0,2036	61,5617	3,9294	158,1204	10,1428	2,5397
A16	8,2513	1,1977	nd	0,6841	0,6965	52,9236	2,8672	172,5609	13,9392	3,2361
A39	9,7819	2,2882	nd	0,8255	0,5649	23,5928	3,4128	309,9078	7,7020	2,1987
A40	8,5953	3,4341	nd	0,8726	0,6390	28,2112	3,4347	361,9090	9,1170	2,5019
A41	6,1459	1,6089	nd	0,8660	0,4217	16,2360	3,2535	235,6122	8,9019	2,7856
A42	4,9741	nd	nd	0,7441	0,0366	30,7017	3,9823	258,2513	7,5362	2,5727
A43	5,8316	nd	nd	0,7012	nd	31,2268	4,1081	266,1782	6,9322	2,4705
A53	25,7921	6,6986	nd	0,6783	0,2921	40,7831	1,4624	434,7635	nd	nd
A54	27,0136	7,1445	nd	0,6678	0,2379	41,0987	1,2199	431,2983	nd	nd
A55	34,9296	12,4093	0,5131	0,6151	0,6315	12,8709	1,0665	216,6077	nd	nd
A56	45,6330	14,3796	0,0593	0,4794	0,8424	16,7182	0,9997	179,2860	nd	nd
A57	32,0202	10,4495	nd	0,5521	0,9060	15,9591	0,9635	169,7382	0,3418	nd
A58	23,9565	8,6937	nd	0,6505	0,5471	42,8335	1,6040	486,6284	nd	nd
A59	29,0772	11,5747	0,3849	0,5144	0,8372	12,1755	1,2931	151,2198	0,0177	nd
A60	36,6980	11,3446	nd	0,6297	0,8664	16,1789	0,8903	162,0299	0,1270	nd
A72	30,9429	2,8981	nd	0,7715	nd	25,7873	2,5652	116,3070	0,9526	0,3794
A73	20,1772	0,5726	nd	0,6948	nd	25,4358	2,1068	123,8514	0,5518	0,1366
A74	14,7056	nd	nd	0,4975	nd	26,3191	2,0583	133,0702	0,4815	0,0271
A75	15,2691	nd	nd	0,5023	nd	28,7659	1,8852	150,4404	1,9673	0,4653
A76	13,4485	nd	nd	0,7357	nd	34,0432	2,3876	214,2499	0,7584	0,1800
A77	87,6806	17,6136	1,6829	0,2456	0,1315	8,2045	0,6450	106,6292	1,7187	0,3174
A78	72,3348	20,2590	0,2105	2,0382	0,1355	11,8635	1,1007	158,0488	0,5401	0,0383
A79	62,7221	12,5894	0,6207	0,4799	0,8396	19,5654	1,2837	192,3346	0,3154	0,0397
A80	53,4573	12,0266	1,2348	0,4178	0,6859	22,3824	1,1194	190,5117	nd	nd
A81	102,3147	15,4093	2,3621	0,5103	0,7809	27,7418	1,9917	359,3842	0,3258	0,0012
A67	124,6020	74,8783	0,7280	0,2285	1,7685	13,9155	0,6353	282,2852	0,5494	0,5218
A68	79,9949	51,3672	0,2682	0,5068	0,9631	24,9041	0,6009	445,1501	0,2840	0,1741
A69	76,7364	59,6620	nd	0,1098	0,7254	13,0020	0,6898	302,6670	0,2723	0,2504
A70	85,0697	63,9519	0,0226	0,1914	0,9586	10,4138	0,6509	242,8574	nd	0,0420
A71	106,6291	46,1887	nd	0,1030	0,0396	17,3500	0,7096	347,3572	0,7657	0,4229



**Figura 4.14.**-Contenido medio de los distintos fenoles (1. Hidroxitirosol, 2. Tirosol, 3. Ác. Vainillico, 4. Vainillina, 5. Ác. p-cumárico, 6. Ác. o-cumárico, 7. Rutina, 8. Oleuropeina, 9. Luteolina, 10. Apigenina) en las cuatro zonas de estudio (Niebla, Sanlúcar del Guadiana, Beas y Gibraleón). Los valores con la misma letra indican que no existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) según el test LSD.

La figura 4.14, muestra los valores de las medias para cada uno de los compuestos fenólicos analizados, indicando las distintas letras sobre las barras la existencia de diferencias significativas entre las zonas de procedencia de las muestras. Se observa como para el contenido en apigenina y luteolina, las muestras procedentes de Niebla y Gibraleón difieren significativamente de las de Beas y Sanlúcar de Guadiana. El contenido en flavonas es mayor en las muestras de Sanlúcar de Guadiana y Beas. Para la vainillina y el ácido o-cumárico son las muestras de Sanlúcar de Guadiana las que presentan un contenido significativamente mayor que las de Beas y Gibraleón. Las muestras procedentes de Niebla y Sanlúcar de Guadiana difieren significativamente de las de Beas y Gibraleón en sus contenidos de hidroxitirosol, tirosol y rutina, siendo mayor el contenido en hidroxitirosol y tirosol en las muestras de

Beas y Gibraleón mientras que el contenido en rutina es mayor en las muestras de Niebla y Sanlúcar de Gadiana. Para los valores de p-cumárico y oleuropeína, las muestras de Beas difieren del resto de zonas, presentando mayor concentración de estos componentes. Por último, para el contenido en ácido vainílico las muestras de Beas también mostraron contenidos significativamente más altos que el resto, seguido por Gibraleón.

Cuando se aplicó el análisis discriminante a los valores obtenidos para estos compuestos (utilizando criterios de selección sucesiva de variables y  $F$  entrada =1), y su correspondiente análisis canónico, se obtiene un modelo con 10 variables que permite un 80,6 % de clasificaciones correctas (Tabla 4.17) para las diferentes zonas de estudio. No obstante las muestras procedentes de Gibraleón sólo se clasifican correctamente en un 43%. Como se observa en las Figura 4.15, la representación gráfica de los valores obtenidos para las dos funciones canónicas principales, muestran una tendencia a la separación de las muestras de Beas con respecto al resto de las zonas que aparecen relativamente mezcladas a pesar de que los valores medios se encuentran separados a lo largo de la raíz 1. Estos resultados nos llevaron a pensar que el empleo de un mayor número de variables incluidas dentro del perfil sensorial de las muestras (otros compuestos fenólicos y aromas) podría arrojar resultados más satisfactorios en la trazabilidad de las muestras. Por este motivo se procedió al análisis de un grupo representativo de muestras con técnicas que permitiesen detectar un mayor número de compuestos fenólicos (UHPLC-MS/MS) así como compuestos volátiles (SPME- GC-FID).

Tabla 4.17.- Matriz de Clasificación resultante del análisis discriminante.

	Porcentaje Correcto	Niebla p=,28571	Beas p=,32653	Sanlúcar de Guadiana - p=,22449	Gibraleón p=,16327
Niebla	78,5714	22	0	5	1
Beas	100,0000	0	32	0	0
Sanlúcar de Guadiana	81,8182	3	0	18	1
Gibraleón	43,7500	6	3	0	7
Total	80,6122	31	35	23	9

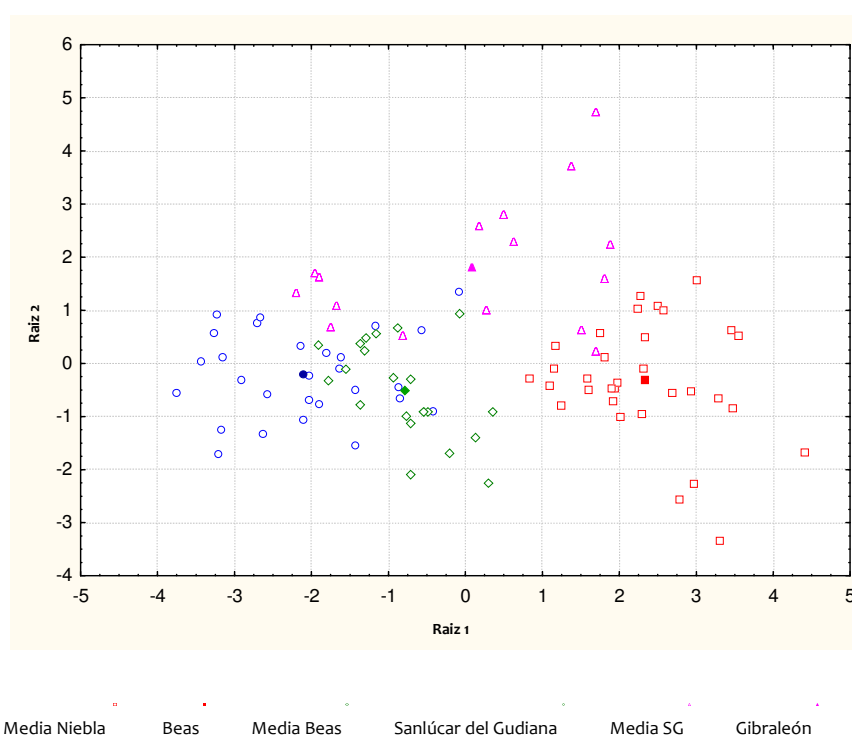


Figura 4.15.- Representación de las funciones discriminantes obtenidas para el conjunto de muestra en base a su perfil fenólico obtenido mediante HPLC-DAD.

#### 4.2.2.- Análisis de fenoles mediante UHPLC-MS y volátiles

Las muestras utilizadas tanto para el estudio del perfil fenólico como para el contenido en compuestos volátiles se recogen en la tabla 4. 18.

Para la determinación del perfil fenólico y el contenido en volátiles de las distintas muestras de aceites se aplicaron los métodos descritos en los apartados 3.4.5 y 3.4.6 respectivamente. En las siguientes tablas se muestran el contenido de los fenoles individuales así como de los compuestos volátiles de las diferentes muestras analizadas.

**Tabla 4.18.-** Descripción de las muestras utilizadas para la determinación del perfil fenólico y para el contenido en volátiles.

<b>MUESTRA</b>	<b>PROCEDENCIA</b>	<b>VARIEDAD</b>
<b>A5</b>	Niebla	Arbequina
<b>A11</b>	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina
<b>A15</b>	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina
<b>A16</b>	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina
<b>A17</b>	Beas	Arbequina
<b>A23</b>	Beas	Arbequina
<b>A30</b>	Beas	Picual
<b>A31</b>	Beas	Picual
<b>A34</b>	Beas	Picual
<b>A39</b>	Sanlúcar de Guadiana	Arbequina
<b>A50</b>	Niebla	Arbequina
<b>A63</b>	Niebla	Picual
<b>A64</b>	Niebla	Picual
<b>A70</b>	Gibraleón	Verdial
<b>A73</b>	Gibraleón	Arbequina
<b>A88</b>	Beas	Verdial
<b>A46</b>	Niebla	Arbequina
<b>A55</b>	Sanlúcar de Guadiana	Picual
<b>A67</b>	Gibraleón	Verdial
<b>A81</b>	Gibraleón	Picual
<b>A92</b>	Beas	Verdial
<b>A95</b>	Beas	Verdial
<b>A96</b>	Beas	Verdial

**Tabla 4.19.-**Contenido de los compuestos fenólicos individuales de las diferentes muestras determinados mediante HPLC-UPLC-Ms (mg Kg<sup>-1</sup>)

	Ácido gálico	Ácido protocatéquico	Hidroxitirosol	Ácido p-hidroxibenzoico	Tirosol	Ácido p-hidroxifenilacético	Ácido vainílico	Vainillina	Ácido p-cumárico	Ácido ferúlico	Ácido cinámico	Luteolina	Pinoresinol	Apigenina
A5	0,1205	0	1,0895	0	0	0	0,0715	0,0464	0,0569	0,0273	0,0537	0,4072	4,2405	0,1468
A11	0,1217	0	3,2520	0	1,6595	0	0,2149	0,4806	0,1488	0,0887	0,1058	0,2185	10,2919	0,0916
A15	0,1183	0	2,7208	0	2,4802	0	0,1781	0,4216	0,1827	0,0964	0,0578	0,3105	4,2257	0,1166
A16	0,1198	0	10,7937	0	9,9811	0	0,2870	0,3434	0,2243	0,1017	0,0753	0,3645	5,4851	0,1353
A17	0,1186	0	2,5375	0	3,8064	0	0,4633	0,3860	0,2390	0,2258	0,2615	0,4881	10,2442	0,1576
A23	0,1187	0	47,4603	0	4,7726	0	0,3669	0,3254	0,2572	0,1970	0,2192	0,5576	8,3541	0,1836
A30	0,1181	0,1558	48,1981	0,0842	29,6731	0	0,3435	0,2551	0,3336	0,2318	0,2722	0,3123	0,4318	0,1189
A31	0,1189	0,1595	33,5049	0,0899	30,3945	0	0,3368	0,2651	0,3409	0,2079	0,2813	0,2768	0,4905	0,1055
A34	0,1187	0	2,4489	0,1002	38,1407	0	0,3116	0,2101	0,2700	0,1455	0,3686	0,1755	0,4965	0,0670
A39	0,1196	0	1,2679	0	7,3809	0	0,3323	0,3260	0,2451	0,1918	0,1460	0,4389	5,3339	0,1601
A46	0,1167	0	0,1378	0	4,7418	0	0,2164	0,3579	0,2948	0,2262	0,2518	0,2525	7,1155	0,0960
A50	0,1196	0	2,2395	0	0,5420	0	0,1696	0,3225	0,2092	0,1608	0,1326	0,2864	4,6148	0,0927
A55	0,1166	0	43,0349	0,0845	27,2935	0	0,3941	0,2593	0,3213	0,1664	0,1699	0,3432	1,2035	0,1273
A63	0,1242	0	45,0597	0,1146	25,6806	0	0,3895	0,2507	0,3745	0,2112	0,3283	0,1540	4,2563	0,0568
A64	0,1195	0	67,1751	0,0742	31,7162	0	0,1413	0,2036	0,1867	0,0942	0,5898	0,1880	2,0485	0,0454
A67	0,1186	0	112,2799	0,2640	126,0876	0,0426	0,2530	0,1244	0,4419	0,4912	0,1983	0,2810	0,9644	0,1472
A70	0,1194	0	82,1223	0,1986	108,2484	0,1132	0,3805	0,1387	0,3112	0,2656	0,1601	0,5247	0,9425	0,2497
A73	0,1179	0	15,4488	0	3,6993	0	0,2718	0,2283	0,1063	0,1323	0,1065	0,7964	5,1408	0,2628
A81	0,1186	0	119,1848	0,1470	82,1447	0,0000	0,2142	0,2260	0,2348	0,1449	0,3888	0,4020	2,2852	0,1128
A88	0,1187	0	54,4537	0,1461	79,6113	0,0512	0,2382	0,1647	0,1954	0,1694	0,1696	0,2962	0,7959	0,1384
A92	0,1185	0	70,2608	0,1855	93,3272	0,1023	0,2783	0,1396	0,3235	0,3022	0,3250	0,4004	0,7315	0,1855
A95	0,1201	0	73,5594	0,1504	81,4738	0,0457	0,2700	0,1497	0,2646	0,2523	0,2243	0,2868	0,7748	0,1460
A96	0,1194	0	77,2865	0,1789	95,0707	0,0756	0,3051	0,1454	0,2577	0,1971	0,2439	0,4006	0,8184	0,2155

Tabla 4.19.- (Continuación) Contenido de los compuestos fenólicos individuales de las diferentes muestras determinados mediante HPLC-UPLC-MS (mg Kg<sup>-1</sup>)

	1-fenil-6,7-dihidroxi-isocromano (Ácido gálico)	1-(3-metoxi-4-hidroxi)fenil-6,7-dihidroxi-isocromano (Ácido gálico)	3,4-DHPEA-AC (Ácido gálico)	3,4-DHPEA-EDA (Oleuropeína)	3,4-DHPEA-EA (Oleuropeína)	Methyl 3,4-DHPEA-EA (Ácido gálico)	p-HPEA-EA (Ácido gálico)	p-HPEA-EDA (Ácido gálico)	Ácido Homovanillico
A5	19,2195	0,6228	0,6228	261,8844	6,5572	0,6228	1,6526	15,7591	0,1878
A11	33,1222	0,6352	2,0993	133,3854	4,9169	0,6352	1,0579	4,5235	0,1396
A15	38,8930	0,6367	3,4087	177,8510	7,3983	0,6367	2,6472	7,6123	0,1101
A16	27,6116	0,6350	2,4425	171,7824	11,1686	0,6588	5,1131	4,6117	0,1202
A17	15,2812	0,6459	7,2747	128,0583	4,5038	0,6459	0,8952	4,0887	0,1147
A23	21,6308	0,6418	7,0787	124,9945	4,6679	0,6418	1,0860	4,8949	0,0929
A30	46,4049	0,6382	2,3304	69,7353	54,9578	0,6382	22,3430	5,7848	1,3999
A31	50,1350	0,6419	2,3927	72,4028	55,8444	0,6419	22,2713	0	1,1783
A34	50,7825	0,6428	1,8502	58,3142	55,8132	0,6428	25,6697	5,4028	0,7744
A39	36,1549	0,6472	2,1535	120,2791	6,0138	0,6472	2,6769	6,0359	0,0800
A46	12,3722	0,6305	1,7557	32,9572	3,8791	0,6305	0,7284	3,3446	0,0420
A50	11,2549	0,6457	1,6778	57,4501	4,1779	0,6457	0,9262	3,8773	0,0355
A55	51,0869	0,6321	0,9120	55,2193	62,0953	0,6504	24,3931	4,6066	1,0378
A63	2,6935	0,6410	1,5455	58,5459	69,3630	0,6523	16,9181	3,2795	0,8316
A64	30,2495	0,6442	1,7662	62,8517	70,7373	0,6442	16,9608	3,0622	5,6523
A67	44,9926	0,6475	1,4494	52,6807	67,7299	0,6648	27,9954	5,8066	0,7187
A70	44,5780	0,6459	1,9287	56,4673	59,3290	0,6459	29,3677	6,9743	0,6857
A73	8,6670	0,6499	1,2039	117,8346	4,8197	0,6631	1,1910	3,2564	0,0741
A81	25,5692	0,6455	1,4062	9,4627	44,0654	0,6455	13,6728	3,8421	1,1860
A88	36,1078	0,6445	1,4992	63,6275	44,4785	0,6445	26,7053	7,6207	1,3015
A92	42,3652	0,6421	1,6419	57,6513	48,0734	0,6421	22,5644	5,9267	1,0904
A95	40,7387	0,6489	1,6644	52,5395	54,8378	0,6489	27,4684	6,4376	0,8926
A96	33,3817	0,6427	1,5844	34,1811	46,4469	0,6427	20,4965	4,3064	3,8312

**Tabla 4.20.-** Contenido en compuestos volátiles de las diferentes muestras de las diferentes muestras determinados mediante GC-FID (mg Kg<sup>-1</sup>)

	OCTANO	ACETATO DE METILO	E-2-OCTENO	BUTANAL	ACETATO DE ETILO	2-BUTANONA	3-METILBUTANAL	ETANOL	3-PENTANONA	PENTANAL
A5	0,0347	0,0230	0,0198	0,0088	0,0646	0,0441	0,0620	0,8565	0,2396	0,5606
A11	0,0398	0,0419	0,0307	0	0,2798	0,0801	0,5172	1,2841	0,2796	0,6892
A15	0,0256	0,0285	0,0224	0,0058	0,3659	0,1026	0,0954	1,4005	0,5048	0,9986
A16	0,0322	0,0197	0,0178	0,0042	0,0468	0,0587	0,0820	0,4602	0,4759	0,8739
A17	0,1140	0,0261	0,1499	0,0071	0,6450	0,1397	0,0304	1,0197	0,3746	0,5529
A23	0,0582	0,0185	0,1564	0,0099	0,6027	0,1194	0,0255	1,0890	0,3244	0,5342
A30	0,0608	0,1038	0,2892	0,0044	1,4783	0,3462	0,0164	2,4328	0,3710	0,6551
A31	0,0934	0,1256	0,3050	0,0107	1,8050	0,3865	0,0055	3,1777	0,5699	1,0539
A34	0,0943	0,0288	0,0941	0,0055	0,6503	0,1787	0,0029	2,4651	0,2907	0,5744
A39	0,0678	0,0270	0,0398	0,0100	0,5133	0,1487	0,0851	2,8542	0,4132	0,6930
A46	0,2062	0,0648	0,0665	0,0113	0,3137	0,1246	0,4517	2,6333	0,4066	0,3947
A50	0,0800	0,0329	0,1163	0,0085	0,1587	0,1445	0,3555	2,1686	0,3623	0,6171
A55	0,0639	0,1546	0,0276	0,0072	0,2867	0,1219	0,0269	2,7366	0,6018	1,0157
A63	0,0925	0,0556	0,0557	0,0058	0,3805	0,0779	0,0075	2,8330	0,3236	0,5247
A64	0,1306	0,0205	0,0270	0,0033	0,2537	0,0767	0,0224	3,1760	0,1567	0,4024
A67	0,4312	0,1496	0,1540	0,0078	0,3607	0,1940	0,0039	4,1457	0,2435	0,1930
A70	0,5869	0,1307	0,2521	0,0060	0,4220	0,2324	0	3,5100	0,8299	0
A73	0,0951	0,0387	0,0479	0,0041	0,2261	0,0583	0,0085	1,3711	0,5030	0,2747
A81	0,6354	0,0953	0,0711	0,0078	0,5495	0,1984	0,0699	3,3249	0,1341	0,2340
A88	0,5327	0,0248	0,0681	0,0069	0,3016	0,2575	0	2,0101	0,1784	0,2283
A92	0,6119	0,0061	0,0954	0,0065	0,6021	0,1920	0	2,0738	0,1123	0,1432
A95	0,3573	0,0058	0,0452	0,0057	0,2650	0,0926	0	2,3234	0,1302	0,1621
A96	0,3446	0,0120	0,1290	0,0030	0,5046	0,1964	0	1,9715	0,1633	0,1538

Tabla 4.20.- (Continuación) Contenido en compuestos volátiles de las diferentes muestras de las diferentes muestras determinados mediante GC-FID (mg Kg<sup>-1</sup>)

	4-METIL-2-PENTANONA	1-PENTEN-3-ONA	2-BUTANOL	TOLUENO	HEXANAL	2-METIL-1-PROPANOL	E-2-PENTENAL	1-BUTANOL	1-PENTEN-3-OL
A5	0,0079	0,0904	0,0162	0,0111	0,8993	0	0,0226	0	0,1020
A11	0	0,0267	0,0092	0	1,0147	0	0,0144	0,0054	0,0943
A15	0,0038	0,0345	0	0,0108	0,6042	0	0,0164	0	0,1008
A16	0,0065	0,0411	0	0	1,1726	0	0,0161	0,0075	0,0816
A17	0,0086	0,0663	0,0231	0,0145	1,6991	0	0,0311	0	0,0965
A23	0,0065	0,0337	0,0128	0,0145	0,9913	0,0077	0,0190	0	0,0540
A30	0	0,0089	0,0161	0,0174	0,2303	0,0203	0,0033	0,0092	0,0350
A31	0	0,0158	0,0169	0	0,4117	0,0268	0,0083	0,0167	0,0732
A34	0	0,0077	0,0264	0,0173	0,2112	0,0229	0,0028	0,0083	0,0298
A39	0,0076	0,0589	0,0093	0,0244	1,6556	0	0,0309	0,0122	0,1122
A46	0	0,0385	0,0047	0	0,8381	0	0,0315	0,0087	0,0915
A50	0	0,0299	0,0098	0,0259	0,5520	0	0,0230	0,0103	0,0837
A55	0	0,0282	0	0	0,4841	0	0,0236	0	0,0752
A63	0	0,0157	0,0179	0	0,5370	0	0,0186	0,0555	0,0310
A64	0	0	0,0250	0	0,1509	0	0,0045	0,0184	0,0109
A67	0	0,0049	0,0067	0,0298	0,6453	0	0,0114	0,0511	0,0511
A70	0,0072	0,0309	0,2040	0	0,8091	0	0,0088	0	0,0681
A73	0	0,0209	0	0	1,6778	0	0,0189	0,0142	0,1035
A81	0	0	0,1156	0,0756	0,2906	0,2768	0,0229	0,0207	0,0158
A88	0	0,0151	0,1117	0	0,5386	0,0155	0,0059	0,0283	0,0472
A92	0	0,0048	0,0222	0,0138	0,1495	0,0141	0	0,0116	0,0095
A95	0	0,0115	0,0039	0	0,2200	0	0	0,0128	0,0172
A96	0	0,0105	0,0111	0	0,2231	0	0	0,0135	0,0116

Tabla 4.20. -(Continuación) Contenido en compuestos volátiles de las diferentes muestras de las diferentes muestras determinados mediante GC-FID (mg Kg<sup>-1</sup>)

	ACETATO											
	HEPTANAL	LIMONENO	2-METIL-1-BUTANOL	E-2-HEXENAL	3-OCTANONA	DE HEXILO	2-OCTANONA	OCTANAL	E-2-HEPTENAL	AC. HEPTANOICO	AC.OCTANOICO	AC.NONANOICO
A5	0	0	0,0365	1,7602	0,0703	0,0748	0,0049	0	0,0616	0	0,0051	0,0139
A11	0	0	0,1564	1,0792	0,0832	0,0414	0,0053	0,0081	0,0168	0	0,0043	0,0117
A15	0	0	0,0337	0,3684	0,1173	0,1038	0,0092	0	0,0424	0	0,0055	0,0152
A16	0	0	0,0651	1,0192	0,0949	0,2116	0,0124	0	0,0663	0	0,0066	0,0167
A17	0	0	0,1017	2,1309	0,0926	0,1303	0,0035	0	0,0674	0,0051	0,0081	0,0200
A23	0	0,0040	0,0825	0,6821	0,0825	0,0517	0,0049	0	0,0367	0	0,0052	0,0149
A30	0	0	0,0680	0,0559	0,0840	0,1188	0,0021	0,0072	0,0463	0	0,0072	0,0131
A31	0	0	0,1090	0,1145	0,1203	0,1479	0,0044	0,0132	0,0930	0	0,0104	0,0213
A34	0	0	0,1162	0,0602	0,0625	0,1080	0	0,0100	0,0428	0,0028	0,0110	0,0254
A39	0	0	0,0804	2,2977	0,0918	0,2038	0,0079	0,0048	0,1725	0,0075	0,0054	0,0159
A46	0,0090	0	0,3946	1,1125	0,0795	0,3885	0	0,0133	0,2293	0,0110	0,0115	0,0209
A50	0	0	0,3649	0,5084	0,0973	0,8295	0	0,0126	0,4322	0,0055	0,0080	0,0176
A55	0	0	0,1355	0,1564	0,1079	0,6269	0,0050	0,0094	0,3355	0,0097	0,0107	0,0174
A63	0	0,0085	0,1061	0,2110	0,0646	0,2932	0	0,0138	0,1377	0,0049	0,0044	0,0190
A64	0	0	0,1316	0,0459	0,0393	0,1781	0	0,0127	0,0659	0	0,0061	0,0176
A67	0	0	0,3150	0,3100	0,0590	0,3168	0	0,0092	0,1456	0	0,0052	0,0106
A70	0,0064	0	0,2209	0,4718	0,1199	0,2820	0,0083	0,0054	0,1701	0,0108	0,0126	0,0249
A73	0	0	0,1077	3,1713	0,0956	0,1529	0,0097	0	0,0883	0,0055	0,0087	0,0200
A81	0,0072	0	0,6314	0,1317	0,0482	0,0542	0	0,0429	0,0242	0	0,0067	0,0131
A88	0,0055	0	0,1298	0,3963	0,0576	0,2456	0	0	0,1590	0	0,0049	0,0117
A92	0,0095	0	0,1105	0,0363	0,0427	0,4221	0	0,0081	0,2070	0,0156	0,0176	0,0238
A95	0,0071	0	0,0757	0,0776	0,0496	0,3199	0	0,0057	0,1806	0,0105	0,0138	0,0192
A96	0,0068	0	0,0774	0,0689	0,0570	0,3123	0	0,0066	0,1422	0,0084	0,0101	0,0168

La matriz de datos obtenida se analizó mediante técnicas de análisis multivariante. El análisis múltiple de la varianza puso de manifiesto que el origen de los aceites tiene un efecto significativo ( $p < 0.001$ ). Siete compuestos fenólicos (hidroxitirosol, p-hidroxibenzoico, tirosol, vainillina, 1-phenyl-6,7-dihydroxy-isochroman, 1-(3-methoxy-4-hydroxy)phenyl-6,7-dihydroxy-isochroman y apigenina) y nueve compuestos volátiles (octano, E-2-octeno, acetato, 2-butanona, pentanal, 2-metil-1-butanol, 2-octanona, 1-Hexanol y Z-3-hexen-1-ol) fueron los que mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre los cuatro grupos de muestras (Tabla 4.21).

Las diferencias entre las medias de cada grupo fueron evaluadas mediante la aplicación del test LSD de Fisher. Así, el contenido de hidroxitirosol, ácido p-hidroxibenzoico, tirosol, ácido ferúlico, apigenina, luteolina, 1-(3-metoxi-4-hidroxi)fenil-6,7-dihidroxi-isocromano (ácido gálico) y metil 3,4-DHPEA-EA (ácido gálico) es mayor en los aceites procedentes del término de Gibraleón, mientras que la concentración de ácido vainílico y vainillina es mayor en los aceites de Beas y Sanlúcar de Gadiana, respectivamente, tal como se comentó anteriormente.

Con respecto a los compuestos volátiles también se observa que los aceites de Gibraleón muestran un contenido significativamente mayor de octano, alcoholes como etanol, 2-butanol y 2-metil-1-butanol y ácidos como el propanoico. Por otra parte, E-2-octeno, acetato de etilo y 2-butanona se presentan en mayor concentración en los aceites de Beas, y pentanal y 2-octanona en los de Sanlúcar de Gadiana. Por último los aceites procedentes de Niebla son más ricos en alcoholes como 1-Hexanol y z-3-hexen-1-ol.

Tabla 4.21.- Contenido medio de compuesto fenólicos y resultados del MANOVA.

Compuestos	Niebla	Sanlúcar de Guadiana	Beas	Gibraleón	p-valor
ÁCIDO GÁLICO	0,1201	0,1192	0,1189	0,1186	0,4683
ÁCIDO PROTOCATÉQUICO	0	0	0,035	0	0,373
HIDROXITIOSOL	23,1403 <sup>a</sup>	12,2139 <sup>a</sup>	45,5233 <sup>ab</sup>	82,2590 <sup>b</sup>	0,0161
ÁCIDO P-HIDROXIBENZOICO	0,0378 <sup>ab</sup>	0,0169 <sup>a</sup>	0,1039 <sup>bc</sup>	0,1524 <sup>c</sup>	0,0293
TIOSOL	12,5361 <sup>ab</sup>	9,7590 <sup>a</sup>	50,6967 <sup>bc</sup>	80,0450 <sup>c</sup>	0,0123
ÁCIDO P-HIDROXIFENILACÉTICO	0	0	0,0305	0,0389	0,1599
ÁCIDO VAINÍLLICO	0,1977 <sup>a</sup>	0,2813 <sup>ab</sup>	0,3237 <sup>b</sup>	0,2799 <sup>ab</sup>	0,104
VAINILLINA	0,2362 <sup>a</sup>	0,3662 <sup>b</sup>	0,2268 <sup>a</sup>	0,1793 <sup>a</sup>	0,0302
ÁCIDO P-CUMÁRICO	0,2244	0,2245	0,2758	0,2736	0,6203
ÁCIDO FERÚLICO	0,1439 <sup>ab</sup>	0,1290 <sup>a</sup>	0,2143 <sup>ab</sup>	0,2585 <sup>b</sup>	0,093
ÁCIDO CINÁMICO	0,2713 <sup>a</sup>	0,1109 <sup>b</sup>	0,2628 <sup>a</sup>	0,2134 <sup>ab</sup>	0,1185
LUTEOLINA	0,2576 <sup>a</sup>	0,3351 <sup>ab</sup>	0,3549 <sup>ab</sup>	0,5010 <sup>b</sup>	0,0783
PINORESINOL	4,4551	5,308	2,5709	2,3332	0,3504
APIGENINA	0,0875 <sup>a</sup>	0,1262 <sup>ab</sup>	0,1464 <sup>bc</sup>	0,1931 <sup>c</sup>	0,0241
1-FENIL-6,7-DIHDROXI-ISOCROMANO (Ác. galico)	15,1579 <sup>a</sup>	37,3737 <sup>b</sup>	37,4253 <sup>b</sup>	30,9517 <sup>ab</sup>	0,0219
1-(3-METOXI-4-HIDROXI)FENIL-6,7-DIHDROXI-ISOCROMANO (Ác. galico)	0,6369 <sup>a</sup>	0,6373 <sup>a</sup>	0,6432 <sup>ab</sup>	0,6472 <sup>b</sup>	0,0299
3,4-DHPEA-AC (Ác. galico)	1,4736	2,2032	3,0352	1,497	0,0276
3,4-DHPEA-EDA (Oleuropeína)	94,7378	131,7034	73,5005	59,1113	0,2223
3,4-DHPEA-EA (Oleuropeína)	30,9429	18,3186	41,0693	43,986	0,4141
Metil 3,4-DHPEA-EA (Ác. galico)	0,6391 <sup>a</sup>	0,6457 <sup>ab</sup>	0,6432 <sup>a</sup>	0,6548 <sup>b</sup>	0,0724
p-HPEA-EA (Ác. galico)	7,4372	7,1776	18,8333	18,0567	0,1205
p-HPEA-EDA (Ác. galico)	5,8645	5,478	4,9403	4,9699	0,9474
ÁCIDO HOMOVAINILLICO	1,3498	0,2975	1,1862	0,6661	0,5708
OCTANO	0,1088 <sup>ab</sup>	0,0459 <sup>a</sup>	0,2519 <sup>bc</sup>	0,4371 <sup>c</sup>	0,0145
ACETATO DE METILO	0,0393	0,0543	0,0391	0,1036	0,12
E-2-OCTENO	0,0570 <sup>ac</sup>	0,0277 <sup>a</sup>	0,1480 <sup>bc</sup>	0,1313 <sup>c</sup>	0,0268
BUTANAL	0,0075	0,0054	0,0066	0,0064	0,7064
ACETATO DE ETILO	0,2342 <sup>a</sup>	0,2985 <sup>a</sup>	0,7616 <sup>b</sup>	0,3896 <sup>ab</sup>	0,0487
2-BUTANONA	0,0936 <sup>a</sup>	0,1024 <sup>a</sup>	0,2121 <sup>b</sup>	0,1708 <sup>ab</sup>	0,0313
3-METILBUTANAL	0,1798 <sup>a</sup>	0,1613 <sup>ab</sup>	0,0090 <sup>b</sup>	0,0206 <sup>ab</sup>	0,0774
ETANOL	2,3335 <sup>ab</sup>	1,7471 <sup>a</sup>	2,0625 <sup>ab</sup>	3,0879 <sup>b</sup>	0,1787

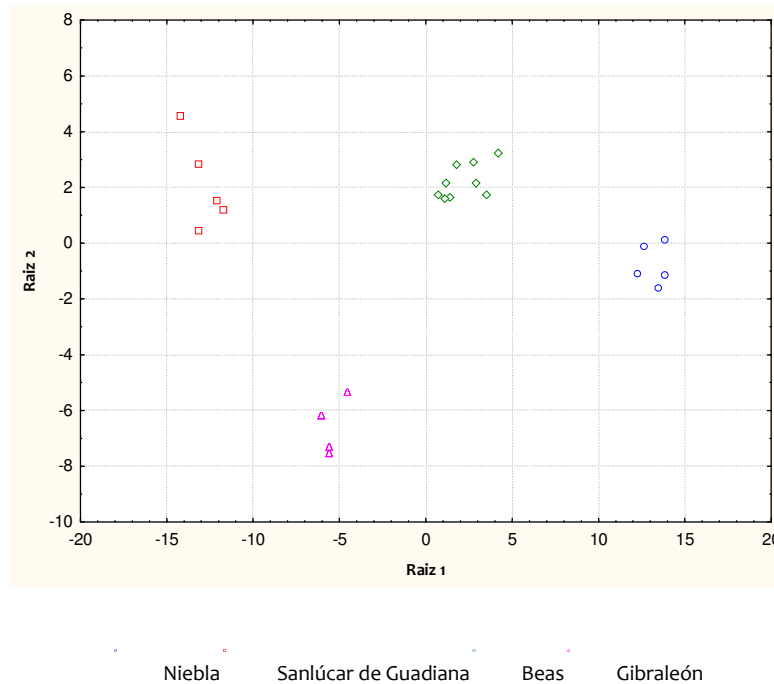
\* Letras distintas dentro de una misma fila, indican diferencias estadísticas significativas (  $p < 0,05$  ) según el test LSD.

Tabla 4.21.- (continuación) Análisis múltiple de la varianza

Compuestos	Sanlúcar de				p-valor
	Niebla	Guadiana	Beas	Gibraleón	
3-PENTANONA	0,2978	0,455	0,2794	0,4276	0,2343
<b>PENTANAL</b>	0,4999 <sup>a</sup>	0,8541 <sup>b</sup>	0,4509 <sup>ac</sup>	0,1754 <sup>c</sup>	<b>0,002</b>
4-METIL-2-PENTANONA	0,0016	0,0036	0,0017	0,0018	0,758
1-PENTEN-3-ONA	0,0349	0,0379	0,0194	0,0142	0,2623
2-BUTANOL	0,0147 <sup>a</sup>	0,0037 <sup>a</sup>	0,0271 <sup>ab</sup>	0,0816 <sup>b</sup>	0,0815
TOLUENO	0,0074	0,0071	0,0086	0,0263	0,29
HEXANAL	0,5955	0,9862	0,5194	0,8557	0,326
2-METIL-1-PROPANOL	0	0	0,0119	0,0692	0,2411
E-2-PENTENAL	0,0200 <sup>a</sup>	0,0203 <sup>a</sup>	0,0078 <sup>ab</sup>	0,0155 <sup>b</sup>	0,0643
1-BUTANOL	0,0186	0,005	0,0112	0,0215	0,3159
1-PENTEN-3-OL	0,0638 <sup>ab</sup>	0,0928 <sup>a</sup>	0,0415 <sup>b</sup>	0,0596 <sup>ab</sup>	0,0588
HEPTANAL	0,0018	0	0,0032	0,0034	0,3826
LIMONENO	0,0017	0	0,0004	0	0,491
<b>2-METIL-1-BUTANOL</b>	0,2067 <sup>ab</sup>	0,0942 <sup>a</sup>	0,0967 <sup>a</sup>	0,3188 <sup>b</sup>	<b>0,0238</b>
E-2-HEXENAL	0,7276	0,9842	0,4025	1,0212	0,5673
3-OCTANONA	0,0702	0,099	0,0721	0,0807	0,2065
ACETATO DE HEXILO	0,3528	0,2375	0,2063	0,2015	0,5621
2-OCTANONA	0,0010 <sup>a</sup>	0,0080 <sup>b</sup>	0,0017 <sup>a</sup>	0,0045 <sup>b</sup>	0,0045
OCTANAL	0,0105	0,0045	0,0056	0,0144	0,3129
E-2-HEPTENAL	0,1853	0,1267	0,1083	0,107	0,5901
6-METIL-5-HEPTEN-2-ONA	0,0113	0,0037	0,0045	0,012	0,0746
<b>1-HEXANOL</b>	1,3672 <sup>a</sup>	0,6994 <sup>b</sup>	0,7634 <sup>b</sup>	1,0327 <sup>ab</sup>	<b>0,0098</b>
<b>Z-3-HEXEN-1-OL</b>	0,3300 <sup>a</sup>	0,0913 <sup>b</sup>	0,1810 <sup>b</sup>	0,2927 <sup>a</sup>	<b>0,001</b>
AC. ACÉTICO	0,4553	0,1535	0,9904	0,2686	0,1884
AC. PROPIÓNICO	0,0123 <sup>ab</sup>	0,0074 <sup>a</sup>	0,0072 <sup>a</sup>	0,0197 <sup>b</sup>	0,0566
AC. BUTANOICO	0,0143	0,0102	0,0109	0,0178	0,2933
AC. PENTANOICO	0,0087	0,0063	0,0063	0,0077	0,8388
AC. HEXANOICO	0,0518	0,0308	0,0381	0,0465	0,351
AC. HEPTANOICO	0,0043	0,0034	0,0047	0,0041	0,9782
AC. OCTANOICO	0,007	0,0065	0,0098	0,0083	0,3056
AC. NONANOICO	0,0178	0,0154	0,0185	0,0171	0,6394

\*Letras distintas dentro de una misma fila, indican diferencias estadísticas significativas (  $p < 0,05$  ) según el test LSD.

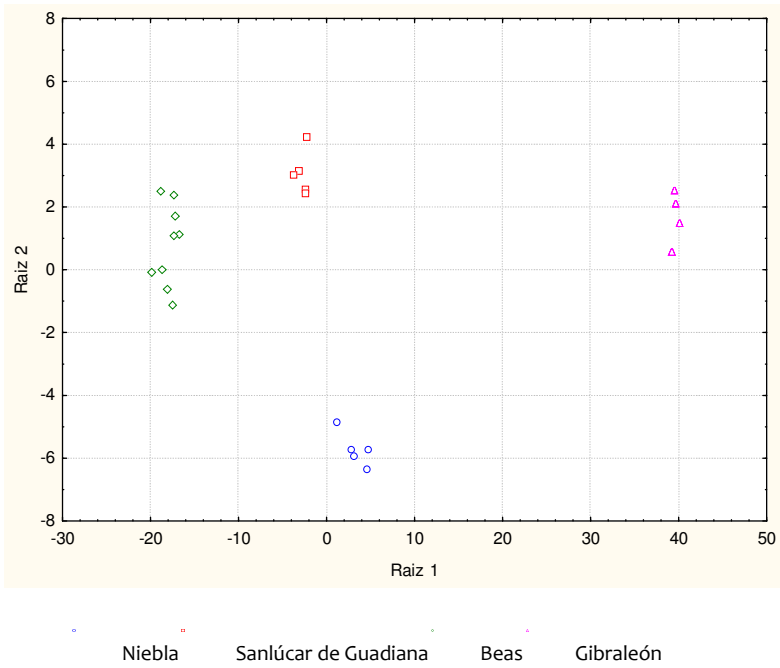
Estos resultados se confirmaron mediante técnicas de reconocimiento de patrones tales como análisis discriminante lineal. En el análisis discriminante a partir de las variables seleccionadas como significativas por el MANOVA se obtuvieron tres funciones canónicas, y se observó que las dos funciones principales permiten la diferenciación de los aceites procedentes de los cuatro municipios onubenses, independientemente de su variedad, siendo el ácido p-hidroxibenzóico, el e-2-octeno, la 2-octanona, el acetato de etilo y la vainillina los que presentan valores más altos para función canónica uno y el ácido p-hidroxibenzóico y el tirosol para la raíz 2. (Figura4.16).



**Figura 4.16.-** Representación de las funciones canónicas con las variables Seleccionadas como significativas por el MANOVA.

Además, se realizó un análisis discriminante por pasos a partir de todas las variables originales con una F de entrada de 4 y una F de salida igual a 1. La representación gráfica de las funciones canónicas principales muestra una correcta clasificación de todas las muestras. En este caso fueron los compuestos volátiles

(acetato de metilo, 2-octanona y z-3-hexen-1-ol) los que tienen mayor peso en las dos funciones canónicas principales (Figura 4.17).



**Figura 4.17.-** Representación de las funciones canónicas de todas las variables originales con una F de entrada de 4 y una F de salida igual a 1.



## **CAPÍTULO 5.**

***Resumen y Conclusiones Finales***



A tenor de los resultados obtenidos se pueden extraer el siguiente resumen y conclusiones:

- 1.- Se ha desarrollado un método para las digestiones ácidas en etapas sucesivas de las muestras de suelos utilizando reactores de teflón, ácidos fluorhídrico y nítrico en placa calefactora a distintas temperaturas y tiempos.
  - ✦ Se ha llevado a cabo un método para la disolución de las muestras de alperujos previamente liofilizados, mediante dos digestiones sucesivas con microondas. Una primera etapa con ácido nítrico, peróxido de hidrógeno y ácido fluorhídrico con una rampa de temperatura durante 12 minutos hasta alcanzar 210°C y 40 bares de presión y una segunda etapa con ácido bórico y una rampa de temperatura de 5 minutos hasta llegar a 210°C y 40 bares de presión.
  - ✦ Se ha puesto a punto un método para la digestión por microondas de las muestras de aceites con ácido nítrico, peróxido de hidrógeno y ácido clorhídrico con una rampa de 15 minutos hasta alcanzar 280 °C y 80 bares de presión.
  - ✦ Se ha desarrollado y optimizado un método para la determinación de metales mayoritarios en las distintas muestras de suelos, alperujos y aceites mediante fotometría de emisión de plasma con detector óptico, obteniéndose valores de repetitividad comprendidos entre el 0.7 al 6.5%, mientras que para la reproducibilidad el intervalo estuvo entre el 1.5 y 5.7%. Los límites de detección oscilaron entre 0.0002 del Mn y 0.0088 µg/ml del Na, mientras que los límites de cuantificación fueron desde 0.0007 hasta 0.0293 µg/m para el Mn y el Na respectivamente.
  - ✦ Se ha llevado a cabo un método para la determinación de los elementos trazas tanto en suelo como en alperujos y aceites mediante fotometría de emisión de plasma con detector de masas, la repetitividad y la reproducibilidad fueron inferiores al 0.6% y los límites de detección oscilaron entre 0.0171 del Co y 0.6292 µg/ml del Zn, mientras que los límites de cuantificación fueron desde 0,0402 del Ta al 2.0952 µg/m del Zinc.

- ✿ Se ha estudiado la correlación de la composición elemental de las distintas muestras de suelos, alperujos y aceites con su origen geográfico. La aplicación del análisis multivariante muestra una coincidencia en la selección de elementos para la clasificación de suelos (W, Fe, y Na), alperujos (W, Fe, Na, Mg, Mn, Ca, Ba y Li) y aceites (W, Fe, Na, Mg, Mn, Ca, Ba, Li, Bi y Cu) de acuerdo a su procedencia geográfica. Esto indica que algunos elementos presentes en el suelo de las zonas de cultivo, pueden detectarse en las aceitunas así como en los aceites de oliva, procedentes de los olivos plantados en ellas, aunque en bajas concentraciones. Por tanto, el análisis de elementos por ICP unido al análisis multivariante resulta una poderosa herramienta para establecer la trazabilidad hacia atrás de las muestras de aceite.
- 2.- Se ha optimizado y validado el método propuesto por el Anexo X del Reglamento CEE 2568/91. para la determinación de los ácidos grasos del aceite por cromatografía de gases previa derivatización de los mismos a ésteres metílicos. El método presenta una elevada repetitividad con valores de RSD inferiores al 1.74% (ácido mirístico), mientras que para la reproducibilidad se observa una mayor dispersión, presentando unos valores entre el 0.03% del ácido oleico y el 5.55% del ácido margárico. Así mismo, se ha aplicado el método propuesto en anexo V del Reglamento CEE/2568/91 de la Comisión de las Comunidades Europeas para la determinación del contenido en esteroides, eritrodol y uvaol.
- ✿ La aplicación del SLDA a los resultados obtenidos para el contenido en ácidos grasos y esteroides ha permitido un 93,75% de clasificaciones correctas del total de muestras analizadas de acuerdo a su procedencia geográfica, siendo el contenido en ácido esteárico, gadoleico, behénico, palmitoleico, linolenico y araquídico así como en campesterol y estigmasterol las variables con mayor poder de discriminación. Cuando se aplicó este análisis a las muestras de las variedades Arbequina y Picual de manera independiente, se obtuvo un 100% de clasificaciones correctas. Se concluye, por tanto, que el contenido en esteroides y ácidos grasos contribuye al establecimiento de la trazabilidad geográfica de las muestra de aceite estudiadas.

3.- Se ha propuesto un método para la determinación del perfil fenólico mediante cromatografía líquida con detector UV de diodos, utilizando una columna Ultrabase C18 2.5 $\mu$ m, (100 mm x mm de diámetro interno). Las condiciones cromatográficas ensayadas permiten la detección y cuantificación de 11 compuestos fenólicos en 25 minutos. El procedimiento analítico fue validado encontrándose que muestra buenas características analíticas para la determinación cuantitativa de los compuestos estudiados: buena precisión, amplio intervalo lineal, valores de coeficientes de correlación altos y bajos límites de detección.

✿ Los resultados obtenidos cuando se aplicó el análisis discriminante al contenido en compuestos fenólicos obtenidos por HPLC-DAD para la separación de las muestras analizadas de acuerdo a su origen, no fueron concluyentes; ya que a pesar de que los valores medios de cada grupo aparecieron separados a lo largo de la función canónica principal, las muestras procedentes de Gibraleón sólo se clasificaron correctamente en un 43%.

4.- Se ha aplicado el método descrito por Becerra y col. para la determinación de compuestos fenólicos por UHPLC-ESI-MS/MS a un conjunto representativo del total de las muestras. El uso del MS/MS en el modo MRM dinámico ha permitido una correcta y fiable identificación y una cuantificación reproducible en un amplio rango de concentraciones de un mayor número de compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva que los determinados por HPLC-DAD. Así mismo, se ha aplicado el método descrito por Tena y col. 2007, para la determinación de los compuestos volátiles en estas mismas muestras.

✿ El tratamiento estadístico multivariante de manera conjunta a los datos obtenidos para el contenido en compuestos fenólicos y en volátiles de los aceites analizados, ha puesto de manifiesto el potencial de estos compuestos, principalmente los volátiles para la discriminación de las muestras atendiendo sólo a su origen con un 100% de clasificaciones correctas, estableciendo lo que podría denominarse como trazabilidad sensorial.





## **CAPÍTULO 6.**

***Referencias bibliográficas***





**Alarcón de la Lastra, C.,** Barranco, M.D., Motilva, V., Herrerias, J.M. (2001). Mediterranean diet and health: biological importance of olive oil. *Current Pharmaceutical Design*, 7, 933-50.

**Alkan, D.,** Tokatli, F., Ozen, B. (2012). Phenolic Characterization and Geographical Classification of Commercial Extra Virgin Olive Oils Produced in Turkey. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 89, 261-268.

**Allalout, A.,** Krichène, D., Methenni, K., Taamalli, A., Oueslati, I., & Daoud, D. (2009). Characterization of virgin olive oil from super intensive Spanish and Greek varieties grown in Northern Tunisia. *Scientia Horticulturae*, 120, 77-83.

**Alonso Garcia, M. V.,** & Aparicio Lopez, R. (1993). Characterization of European virgin olive oils using fatty acids. *Grasas y Aceites*, 44(1), 18-24.

**Andejelkovic, M.,** Van Camp, J., Pedra, M., Renders, K., Socaciu, C., & Verhé, R. (2008). Correlations of the phenolic compounds and the phenolic content in some Spanish and French olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 5181-5187.

**Ansari, R.,** Kazi, T. G., Jamali, M. K., Arain, M. B., Wagan, M. D., Jalbani, N., et al. (2009). Variation in accumulation of heavy metals in different varieties of sunflower seed oil with the aid of multivariate technique. *Food Chemistry*, 115, 318-323.

**Anthemidis, A. N.,** Arvanitidis, V., & Stratis, J. A. (2005). On-line emulsion formation and multi-element analysis of edible oils by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 537, 271-278.

**Aparicio, R.** (1988). An Approach for Building Decision Rules by Chemometric Analysis: An Application on Olive Oil. *Journal of Chemometrics*, 3, 175-192.

**Aparicio, R.,** Alonso, V., Morales, M. T. (1994). Detailed and exhaustive study of the authentication of European virgin olive oils by SEXIA expert system. *Grasas Aceites*, 45, 241-252.

**Aparicio, R.** (2000) Characterization: *Mathematical procedures* for Chemical Analysis. In: *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties* (J.L. Harwood and R. Aparicio, eds) Gaithersburg MA. Aspen. pp. 285-354.

**Aparicio, R.,** Harwood, J. (2003). Manual del aceite de oliva. 1ª Edición. Ediciones A. Madrid Vicente y Ediciones Mundi-Prensa.

**Aparicio, R.,** Roda, L.; Albi, M.A., Gutierrez, F. (1999). Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by rancimat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4150-4155.

**Aparicio, R.,** Aparicio-Ruíz, R. (2000). Authentication of vegetable oils by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, 881, 93-114.

**Aparicio, R.,** Luna, G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 104, 614-627.

**Araghipour, N.,** Colineau, J., Koot, A., Akkermans, W., Moreno Rojas, J. M. Beauchamp, J., Wisthaler, A., D. Ma`rk, T., Downey, G., Guillou, C., Manninag, L., Saskia van Ruth. (2008). Geographical origin classification of olive oils by PTR-MS. *Food Chemistry*, 108, 374-383.

**Artajo, L.S.,** Romero, M.P.; Motilva, M.J. (2006). Transfer of phenolic compounds during olive oil extraction in relation to ripening stage of the fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 518-527.

**Arunachalam, J.,** Mohl, C., Ostapczuk, P. & Emons, H. (1995). Multielement characterization of soil samples with ICP-MS for environmental studies. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 352, 577-581.

# B

**Bakircioglu, D.**, Kurtulus, Y.B. & Yurtsever, S. (2013). Comparison of extraction induced by emulsion breaking, ultrasonic extraction and wet digestion procedures for determination of metals in edible oil samples in Turkey using ICP-OES. *Food Chemistry*, 138, 770-775.

**Baldioli, M.**, Servili, M., Perretti, G., Montedoro, G.(1996). Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 73, 1589-1593.

**Barranco, D.**, Fernández-Escobar, R., Rallo, L. (2008). El cultivo del olivo. Madrid Ediciones Mundi-Prensa y Junta de Andalucía 6ª Edición.

**Barranco, D.**, Ercan, H., Muñoz-Díez, C., Belaj, A. & Arquero, O. (2010). Factors influencing the efficiency of foliar sprays of monopotassium phosphate in the olive. *International Journal of Plant Production*, 4, 1735-8043.

**Beaufoy, G.** (2002) The environmental impact of olive oil production in the European Union. European Forum on Nature Conservation and Pastoralism. Asociación para el Análisis y Reforma de la Política Agrorural. Available on:

<http://ec.europa.eu/environment/agriculture/pdf/oliveoil.pdf>

**Benincasa, C.**, Lewis, J., Perri, E., Sindona, G., & Tagarelli, A. (2007). Determination of trace element in Italian virgin olive oils and their characterization according to geographical origin by statistical analysis. *Analytica Chimica Acta*, 585, 366-370.

**Bianco, A.**, Coccioli, F., Guiso, M., Marra, C. (2002). The occurrence in olive oil of a new class of phenolic compounds: hydroxy-isochromans. *Food Chemistry* 77, Issue 4, 405-411.

**Blanch, G. P.**, Villén, J., & Herraiz, M. (1998). Rapid analysis of free erythrodiol and uvaol in olive oils by coupled reversed phase liquid chromatography-gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1027-1030.

**Boggia, R.,** Zunin, P., Lanteri, S., Rossi, N., Evangelisti, F. (2002). Classification and class-modeling of "Riviera Ligure" extra-virgin olive oil using chemical-physical parameters. *J. Agric. Food Chem.* 50, 2444.

**Bonilla, A.,** Murillo, J. J., González, J., Sanz, B. (1999). Variaciones de los ácidos grasos y otros parámetros de calidad de aceite de oliva virgen sometidos a proceso de refinado. *Nutrición Hospitalaria.*, XII 6, 319-311.

**Bonoli, M.** (2003). Fast separation and determination of tyrosol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 1011, 163-172.

**Boqué, R.,** Maroto, A, Riu, J. & Rius F.X. (2002). Validation of analytical methods. *Grasas y Aceites*, 53, 128-143.

**Boskou, D.** (1998). “Composición del aceite de oliva”, en Química y tecnología del aceite de oliva, Boskou, D. (Ed.). AMV Ediciones, 1998, 67-103.

**Boumans, P. W. J. M.** (1987). Basic concepts and characteristics of ICP-AES, inductively coupled plasma emission spectroscopy. Part I, methodology, instrumentation, and performance, In P. W. J. M. Boumans (Ed.), New York: Wiley.

**Brenes, M.,** García, A., García P., Et Al. (1999). Phenolic compounds in Spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3535-40.

**Bucci, R.,** Magri, A. D., Magri, A. L., Marini, D., & Marini, F. (2002). Chemical authentication of extra virgin olive oil varieties by supervised chemometric procedures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 413-418.



**Camín, F.,** Larcher, R., Nicolini, G., Bontempo, L., Bertoldi, D., Perini, M., Schlicht, C., Schellenberg, A., Thomas, F., Heinrich, K., Voerkelius, S., Horacek, M., Ueckermann, H., Froeschl, H., Wimmer, B., Heiss, G., Baxter, M., Rossmann, A. & Hoogewerff, J. (2010b).

Isotopic and Elemental Data for Tracing the Origin of European Olive Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 570-577.

**Carrasco Pancorbo, A.**, Cruces Blanco C., Segura Carretero A., Fernández Gutierrez, A. (2004). Sensitive determination of phenolic acids in extra virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 6687–6693.

**Carrasco Pancorbo, A.**, Cerretani, L., Bendini, A., Segura Carretero, A., Gallina Toschi, T., Fernandez Gutiérrez, A. (2005). Analytical determination of polyphenols in olive oils. *Journal of separation science*, 28 (9-10), 837-58.

**Caruso, D.**, Colombo, R., Patelli, R., Giavarini, F., Galli, G. (2000). Rapid Evaluation of Phenolic Component Profile and Analysis of Oleuropein Aglycon in Olive Oil by Atmospheric Pressure Chemical Ionization–Mass Spectrometry (APCI–MS). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 4, 1182-1185.

**Cerrato Oliveros, C.**, Boggia, R., Casale, M., Armanino, C., Forina, M. (2005). Optimisation of a new headspace mass spectrometry instrument Discrimination of different geographical origin olive oils, *Journal of Chromatography A*, 1076, 7-15.

**Cert, A.**, Moreda W., García Moreno, J. (1997). Determinación de esteroides y alcoholes triterpénicos en aceite de oliva mediante separación de la fracción por cromatografía líquida de alta eficacia y análisis por cromatografía de gases. Estandarización del método analítico. *Grasas y aceites*, 48, 207-218.

**Choe, E.**, & Min, D. B. (2006). Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5, 169-186.

**Christopoulou, E.**, Lazaraki, M., Alexiou, F., Synouri Frangiscos, E. (1996). Influence of certain factors on the composition of olive-pomace oils. Part II Sterol, triterpenic dialcohols and aliphatic alcohols. *La rivista italiana delle sostanze grasse*. LXXIII, Maggio, 201-211.

**Civantos, L.**, Contreras, R., Grana, R. (1992). Obtención del aceite de oliva virgen. 2ª Edición. Editorial Agrícola Española, S.A. Madrid.

**Civantos, L.** (1999). Obtención del aceite de oliva virgen. 2nd edición. *Editorial Agrícola Española, S.A. Artes Gráficas COIMOFF, S.A., Madrid, España.*

**Cosio, M. S.,** Ballabio, D., Benedetti, S., Gigliotti, C. (2006). Geographical origin and authentication of extra virgin olive oils by an electronic nose in combination with artificial neural networks. *Analytica Chimica Acta*, 567, 202-210.

## D

**D’Imperio, M.,** Mannina, L., Capitani, D., Bidet, O., Rossi, E., Bucarelli, F.M., Quaglia, G.B., Segre, A. (2007). NMR and statistical study of olive oils from Lazio: A geographical, ecological and agronomic characterization. *Food Chemistry* 105, 1256-1267.

**De Felice, M.,** Gomes, T., Catalano, M. (1979). Oil extraction from olives by continuous industrial processing. *La revista Italiana delle Sostanze Grasse*, 56, 361.

## F

**Fedelli, E.,** Conesi, N. (1993). Quality, origin and technology of virgen olive oils. *La revista Italiana delle Sostanze Grasse*, 70, 419.

**Fedelim, E.** (1977). Lipids of olives. *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids*, 15, 57.

**Fernández, J.E.,** Moreno, F., Cabrera, F., Arrue, J.L. & Martín-Aranda, J. (1991). Drip irrigation, soil characteristics and the root distribution and root activity of olive trees. *Plant and Soil*, 133, 239-251.

**Fernández Rabascall, N. H.,** Riera, J. B. (1987). Variations of the Tocopherols and Tocotrienols Content in the Obtention, Refining and Hydrogenation Processes of Edible Oils. *Grasas y Aceites*, 38, 145-148.

**Forina, M.;** Tiscornia, E. (1982). Pattern recognition method in the prediction of Italian olive oil origin by their fatty acid content. *Annali di Chimica*, 72, 143-155.



**García-González, D.L.,** Aparicio, R.(2008). A Comprehensive Study of Sensor Responses to Fat Food Aroma: The Particular Case of Virgin Olive Oil. In *Intelligent Systems: Techniques and Applications*, Ed. Hynes et al., Shaker, Maastricht, The Netherlands.

**Gimeno, E.,** Castellote, A.I., Lamuela Raventós R.M., De La Torre Boronat, M.C., López Sabater, M.C. (2002). The effects of Harvest and extraction method of antioxidants (phenolic,  $\alpha$ -tocopherol and  $\beta$ -carotene) content in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 78, 207-211.

**Gómez Alonso, S.,** Salvador, M. D., Fregapane G. (2002). Phenolic compounds profile of Cornicabra virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 6812-6817.

**Gómez-Rico, A.,** Fregapane, G., Salvador, M.D. (2008). Effect of Cultivar and Ripening on Minor Components in Spanish Olive Fruits and their corresponding Virgin Olive Oils. *Food Research International*, 41, 433-440.

**Graciani Constante, E.** (2006). Los aceites y grasas: composición y propiedades. Clorofilas. A. Madrid Vicente Ediciones.

**Grubbs, F.** (1969). Procedures for detecting outlying observations in samples. *Technometrics*, 11, 1-21.

**Gutfinger, T.** (1981). Polyphenols in olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58(11), 966-968.

**Gutiérrez, F.,** Jiménez, B., Ruíz A., Albi, M. (1999). Effect of Olive Ripeness on the Oxidative Stability of Virgin Olive Oil Extracted from the Varieties Picual and Hojiblanca and on the Different Components Involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 121-127.

**Gutierrez Rosales F.J.**, Garrido-Fernández F.J., Galliardo-Guerrero L., Gandul-Rojas B. (1992). Action of chlorophylls on the stability of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69, 866.

H

**Haddi, Z.**, Amari, A., Alia, A. O., El Bari, N., Barhoumi, H., Maaref, A., Jaffrezic-Renault, N., Bouchikhi. B. (2011). Discrimination and identification of geographical origin virgin olive oil by an e-nose based on MOS sensors and pattern recognition techniques. *Procedia Engineering* 25, 1137-1140.

I

**Ieggli, C. V. S.**, Bohrer, D., Do Nascimento, P. C., De Carvalho, L. M. (2011). Flame and graphite furnace atomic absorption spectrometry for trace element determination in vegetable oils, margarine and butter after sample emulsification. *Food Additives Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure Risk Assessment*, 28, 640-648.

J

**Jiménez, J.**, Rondón, D., Martínez, L., Y Mataix, J. (2001). Composición química de los aceites de oliva”, en *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario*. Ed. *Universidad de Granada-Puleva Food*, 115-136.

**Juranovic, I.**, Breinhoelderb, P., & Steffan, I. (2003). Determination of trace elements in pumpkin seed oils and pumpkin seeds by ICP-AES. *Journal of Analytical Spectrometry*, 18, 54-58.

# K

**Karleskind, A.** (1992). Manel des corps gras. Sources and monographies des principaux corps gras. *Paris: Technique and Documentacion Lavoisier.*

**Kiritsakis, A. K.,** Dugan, L. R. (1985). Studies in photooxidation of olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 62, 892.

**Kiritsakis, A. K.** (1993). *Olivae: revista oficial del Consejo Oleícola Internacional*, N° 45, 28-33.

**Kiritsakis, A.,** Markakis. (1987). Olive oil a review. *Advances in Food Research*, 31, 453-482.

**Koutsaftakis Gutierrez, F.,** Varona, I., Albi, M.A. (2000). Relation of Acidity and Sensory Quality with Sterol Content of Olive Oil from Stored Fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1106-1110.

# L

**Lagarda, M. J.,** Garca Llatas, G., Farre, R. (2006). Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 486-1496.

**Leardi, R.,** Paganuzzi, V. (1987). Characterization of the origin of extra virgin olive oils by chemometric methods applied to the sterols fraction. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 64, 131-136.

**Lerma-Garcia M.J.,** Lantano C., Chiavaro E., Cerretani L., Herrero-Martinez J.M., Simo-Alfonso E.F. (2009) Classification of extra virgin olive oils according to their biological origin using phenolic compound profiles obtained by capillary electrochromatography. *Food Research International*, 42, 1446-1452

**Liberatore L.**, Procida G., D’Alessandro N., Cichelli A. (2001). Solid-phase extraction and gas chromatographic analysis of phenolic compounds in virgen olive oil. *Food Chemistry*, 73, 119-124.

**Llorent-Martínez, E. J.**, Ortega-Barrales, P., Fernández-de Córdoba, M. L., Domínguez-Vidal, A., Ruiz-Medina, A. (2011a). Investigation by ICP-MS of trace element levels in vegetable edible oils produced in Spain. *Food Chemistry*, 127, 1257-1262.

**Llorent-Martínez, E. J.**, Ortega-Barrales, P., Fernández-de Córdoba, M. L., Ruiz-Medina, A. (2011b). Analysis of the legislated metals in different categories of olive and olive-pomace oils. *Food Control*, 22, 221-225.

**Lopez-Feria D.**, Cardenas S., Garcia-Meas, J.A et al. (2008) Classification of extra virgin olive oils according to the protected designations of origin, olive variety and geographical origin. *Talanta*, 30, 937-943.

**Luna, G.**, Morales, M.T., Aparicio, R. (2006) Characterisation of 39 varietal virgin olive oils by their volatile compositions, *Food Chemistry* 98, 2, 243-242.



**Marfil, R.**, Cabrera-Vique, C., Gimenez, R., Bouzas, P. R., Martinez, O., & Sánchez, J. A. (2008). Metal content and physicochemical parameters used as quality criteria in virgin argan oil: Influence of the extraction method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 7279-7284.

**Mariani, C.**, Venturini, S., Bondioli, P., Fedeli, E., Grob, D. (1992). Valutazione delle variazioni indotte della decolorazione sui principali componenti minori liberi and esterificati dell’Olio di oliva. *Revista Italiana delle Sostanze Grasse*, 69, 393.

**Martínez-Vidal, J. L.**, Garrido-Frenich, A., Escobar-García, M. A., Romero-González, R. (2007). LC-MS determination of sterols in olive oil. *Chromatographia*, 65, 695-699.

**Mataix, F.J.**, Martinez Victoria, E. (1988). Bases para el futuro. El aceite de oliva. Sevilla. España. *Centro de información y documentación agraria*. 1988.

**Mateos Briz, R.**, Espartero Sanchez, J.L., Trujillo Perez-Lanzac, M., Ríos Martín, J.J., León Camacho, M. (2001). Determination of Phenols, Flavones, and Lignans in Virgin Olive Oils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography With Diode Array Ultraviolet Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5, 2185-2192.

**Matos, M. N.**, Campos, R. C. (2006). Determination of copper and nickel in vegetable oils by direct sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 70, 929-932.

**Matos, L.C.**, Pereira, J.A., Andrade, P., Seabra, R., Oliveira, M.B. (2007). Evaluation of a numerical method to predict the polyphenols content in monovarietal olive oils. *Food Chemistry*, 102, 976-983.

**Mendil, D.**, Uluözlü, O. D., Tüzen, M., Soylak, M. (2009). Investigation of the levels of some element in edible oil samples produced in Turkey by atomic absorption spectrometry. *Journal of Hazardous Materials*, 165, 724-728.

**Mercedes Becerra-Herrera**, María Sánchez-Astudillo, Rafael Beltrán , Ana Sayago. (2014). Determination of phenolic compounds in olive oil: New method base don liquid-liquid micro extraction and ultra high performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry, *Food Science and Technology*, 57, 49-57.

**Minguez-Mosquera, M. I.**, Rejano, L., Gandul, B., Sanchez, A. H., & Garrido, J. (1991). Color-pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68, 332-336.

**Montedoro, G.**, Servili, M., Baldioli, M., Miniati, E. (1992). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1571-1576.

**Morales, M. T.**, Aparicio, R., Calvente, J. J. (1996). Influencie of Olive Ripeness on the Concentration of Green Aroma Compounds in Virgin Olive Oil. *Flavour and Fragrance Journal*, 11, 3, 171-178

**Morchio G.R.**, De Anreis, Fedelli, E. (1987). Investigations on total sterols content in the olive oil and their variation during the refining process. *Revista Italiana delle Sostanze Grasse*, 64, 185.

**Murillo, J. J.**, Bonilla, A., González, J., Sanz, B. (1997). Estudio de las diferencias entre rendimientos en contenido graso, diversos parámetros de calidad, ácidos grasos y  $\alpha$ -tocoferol entre nueve variedades de la misma plantación. *Nutrición Hospitalaria*, XII (6), 312-314.

**Myher J. J.**, Kuksis, A. (1995). General strategies in chromatographic analysis of lipids. *Journal Chromatographic B*, 671, 3-33.



**O’Brien Richard, D.** (2004). *Fats and oils: formulating and processing for applications*. CRC Press.

**Ocakoglu, D.**, Tokatli, F., Ozen, B., Korel, F. (2009). Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years. *Food Chemistry*, 113, 401-410.

**Olias, J. M.**, Pérez, A. G., Rios, J. J., Sanz, L. C. (1993). Aroma of virgin olive oil: biogenesis of the “green” odor notes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41, 2368-2373.

**Ollivier, D.**, Artaud, J., Pinatel, C., Durbec, J.P., Guérère, M. (2006). Differentiation of French virgin olive oil RDOs by sensory characteristics, fatty acid and triacylglycerol *Food Chemistry*, 97, 382-393.

**Oueslati, I.**, Faouzia, Haddada M., Manaï, H., Zarrouk, W., Taamalli, W., Fernandez, X., Lizzani Cuvelier, L., Zarrouk, M. (2009). Characterization of volatiles in virgin olive oil produced in the Tunisian area of Tataouine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (17), 7992-7998.

**Ouni Y.,** Taamalli A., Gomez-Caravaca A.M., Segura-Carretero A., Fernandez-Gutierrez A., Zarrouk M. (2011) Characterization and quantification of phenolic compounds of extra virgin olive oils according to their geographical origin by a rapid resolutive LC–ESI–TOF MS method. *Food Chemistry*, 127, 1263-1267

**Ouni Y.,** Flamini G., Issaoui M., Nabil Ben Y., Cioni Pier L., Hammami M., Douja Daoud Zarrouk M.. (2011). Volatile compounds and compositional quality of virgin olive oil from Oueslati variety: Influence of geographical origin, *Food Chemistry*, 124,1770-1776

(a)**Owen, R. W.,** Mier, W., Giacosa, A., Hull, W. E., et al. (2000). Olive-oil consumption and health: The possible role of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 38, 647-659.

(b)**Owen, R.W.,** Giacosa, A., Hull, We et al. (2000a). The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36,1235-1247.

(c)**Owen, R. W.,** Mier W., Giacosa, A., Hull, W. E., Spiegelhalder, B., Bartsch H. (2000). Identification of Lignans as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil. *Clinical Chemistry*, 46, 976-988.

## P

**Paz Antolín, I.,** Molero Meneses, M. (2000). Aplicación de la espectroscopia UV-visible al estudio de la estabilidad térmica de aceites vegetales comestibles. *Grasas y aceites*, 51, 6, 424-428.

**Pérez-Jiménez, F.;** Álvarez De Cienfuegos, G.; Badimon, L. et Al. (2005). International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *European Journal of Clinical Investigation*, 35, 421-424.

**Petrakis, P. V.,** Agiomyrgianaki, A., Christophoridou, S., Spyros, A., & Dais, P. (2008). Geographical characterization of greek virgin olive oils (cv. Koroneiki) using  $^1\text{H}$  and  $^{31}\text{P}$  NMR fingerprinting with canonical discriminant analysis and classification binary trees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3200-3207.

**Pizarro, C.**, Rodriguez-Tecedor, S., Perez-del-Notario, N., Gonzalez-Saiz, J.M. (2011). Recognition of volatile compounds as markers in geographical discrimination of Spanish extra virgin olive oils by chemometric analysis of non-specific chromatography volatile profiles. *Journal of Chromatography A*, 1218, 518-523.

**Porras Piedra, A.**, Cabrera De La Colina, J., Soriano Martín, M<sup>a</sup>. L. (1995). Composición del aceite de oliva. Olivicultura Y Elaiotecnia. *Colección Estudios. Edición de Compobell, S.L. Murcia.*

**Pouliarekou, E.**, Badekaa, A., Tasioula-Margaria, M., Kontakosb, S., Longobardic, F., Kontominasa, M.G. (2011). Characterization and classification of Western Greek olive oils according to cultivar and geographical origin based on volatile compounds. *Journal of Chromatography A*, 1218, 7534-7542.

## R

**Ranalli, A.** (1992). Carotenoids in virgin olive oil. Effects of technogy. *Italian Journal of Food Science*, 1, 53.

**Reglamento (CEE) nº 2205/2003** de la Comisión de 17 de diciembre de 2003 por el que se modifica el Anexo I del Reglamento (CEE) nº 2658/87 del Consejo relativo a la nomenclatura arancelaria y estadística y al arancel aduanero común.

**Reglamento (CEE) nº 2568/91** de la Comisión, de 11 de julio de 1991, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

**Reglamento (CEE) nº 702/2007** de la Comisión de 21 de junio de 2007 por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

**Rezzi, S.**, Axelson, D. E., Héberger, K., Reniero, F., Mariani, C., Guillou, C. (2005). Classification of olive oils using high throughput flow <sup>1</sup>H NMR fingerprinting with

principal component analysis, linear discriminant analysis and probabilistic neural networks. *Analytica Chimica Acta*, 552, 13-24

**Ríos J.J.**, Gil M.J., Gutiérrez Rosales, F. (2005). Solid-phase extraction gas chromatography-ion trap-mass spectrometry qualitative method for evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil and structural confirmation of oleuropein and ligstroside aglycons and their oxidation products. *Journal of Chromatography A*, 1093, 167-176.

**Robards, K.**, Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401-436.

**Romero, C.**, Brenes, M., Yousfi, K., Garcia, P., Garcia, A., Garrido, A. (2004). Effect of cultivar and processing method on the contents of polyphenols in table olives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 479-484.

**Rovellini, P.**, Cortesi, N., Fedeli, E. (1997). Analysis of flavonoids from *Olea europea* by HPLC-UV and HPLC-Electrospray-MS. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 74, 273-279.

**Rui Alves, M.**, Cunha, S.C., Amaral, J.S., Pereira, J.A., Oliveira, M.B. (2005). Classification of PDO olive oils on the basis of their sterol composition by multivariate analysis. *Analytica Chimica Acta*, 549, 166-178.

**Ryan D.**, Robards K. (1998). Phenolic compounds in olives. *Analyst*, 123, 31-44.



**Sahan, Y.**, Basoglu, F., & Gucer, S. (2007). ICP-MS analysis of a series of metals (namely: Mg, Cr, Co., Ni, Fe, Cu, Zn, Sn, Cd and Pb) in black and green olive samples from Bursa, Turkey. *Food Chemistry*, 105, 395-399.

**Salvador, M.D.**, Aranda, F., Gómez-Alonso, S., Fregapane, G. (2003). Influence of extraction system, prouction year and area on Cornicabra virgin olive oil: a study of five years. *Food Chemistry*, 80, 359-366.

**Segura-Carretero, A.**, Carrasco-Pancorbo, A., Cortacero, S., Gori, A., Cerretani, L., Fernández-Gutiérrez, A. (2008). A simplified method for HPLC-MS analysis of sterols in vegetable oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 1142–1149.

**Sistani, F.**, Ramezanzpour, S.S., Nasrollanejad, S. (2009). Field evaluation of different fungicides application to control olive leaf spot. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3, 3341-3345.

**Skizas, T.**, Tasioula Margari, M., Komaitis, M.M. (2001). En El Libro Arthur M. Spanier. Headspace Analysis of Volatile Flavor Compounds of Olive Oils from Lianolia Variety. Food flavors and chemistry: advances of the new millennium. *Royal Society of Chemistry*.

**Skoog D.**, Leary J. (1994). Análisis Instrumental. 4ª ed. McGraw-Hill. España.

**Smith, T. J.** (2000). Squalene: potential chemopreventive agent. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9, 1841-1848.

**Soares, M.E.**, Pereira, J.A. & Bastos, M.L. (2006). Validation of a method to quantify copper and other metals in olive fruit by ETAAS. Application to the residual metal control after olive tree treatments with different copper formulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 3923-3928.

**Speek, A.J.**, Schrijver, W.H.P. Schreurs. (1985). Vitamin E composition of some seed oils as determined by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Journal of Food Science*, 50, 122.

**Stefanoudaki, E.**, Kotsifaki, F, & Koutsaftakis, A. (1999). Classification of virgin olive oils of the two major cretan cultivars based on their fatty acid composition. *Journal of the American Oils Chemists Society*, 76(5), 623–626.

**Stefanoudaki, E.**, Chartzoulakis, K., Koutsaftakis, A., Kotsifaki, F. (2001). Efectct of drought on qualitative characteristics of olive oil of cv Koroneiki. *Grasas y Aceites*, 52, 3-4, 202-206.

**Stiti, N.**, Msallem, M., Triki, S., & Cherif, A. (2002). Etude de la fraction insaponifiable de l'huile d'olive de différentes variétés Tunisiennes. *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 79(10), 357–363.

## T

**Tena, N.**, Lazzez, A., Aparicio-Ruiz, R., García-González, D.L. (2007). Volatile compounds characterizing Tunisian olive oil in relation to cultivars and stages of ripeness. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7852-7855.

**Tiscornia, E.**, Forina, M., Evangelist, F. (1982). Composizione chimica dell'olio di oliva e sue variazioni indotte dal processo di rettificazione. *Revista Italiana delle Sostanze Grasse*, 59, 519-555.

**Tserovsky, N.**, Arpadjan, S. J. (1991). Behavior of various organic- solvents and analytes in electrothermal atomic-absorption spectrometry. *Journal of Analytical Spectrometry*, 6, 487–491.

**Tsimidou, M.**, Macrae, R., Wilson, I. (1987). Authentication of virgin olive oil using Principal Component Analysis of triglyceride and fatty acid profiles: Part 1. Classification of Greek virgin olive oils. *Food Chemistry*, 25, 227-239.

**Tura, D.**, Failla, O., Bassi, D., Attilio, C., Serraiocco, A. (2013). Regional and cultivar comparison of Italian single cultivar olive oils according to flavor profiling. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 196–210.

## U

**Uceda, M.**, Hermoso, M. (2008). El cultivo del olivo. Editores científicos: Barranco, D.; Fernández- Escobar, R.; Rollo, L. Junta de Andalucía-Consejería de Agricultura y Pesca & Ed. Mundi Prensa. Madrid, Barcelona, México.

**Uceda, M.** (2000). Aceites de oliva vírgenes extra. Calidad y Diversidad. *Proedi, Promociones Editoriales, S.L. pp 78. Zaragoza.*

**European Union (EU).** 2006. The Commission Regulation No 1881/2006 of 19 December 2006 on setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs OJ L 364/5, 19.12.2006.

**European Union (EU).** 2012. The Commission Regulation No. 1151/2012 of 21 November 2012 on quality schemes for agricultural products and foodstuffs OJ L 343/1, 14.12.2012.



**Vázquez Roncero, A.,** Janer Del Valle M. L., González Pellissó, F. (1961). El principio amargo de las aceitunas. I-Nota preliminar. *Grasas y Aceites*, 12 (1), 19-22.

**Vázquez Roncero, A.,** Janer Del Valle, C., Janer Del Valle, M<sup>a</sup> L. (1973). Determinación de los polifenoles totales del aceite de oliva. *Grasas y Aceites*, 24, 350-357.

**Vázquez Roncero, A.,** Janer Del Valle, C., Janer Del Valle, M<sup>a</sup>.L. (1975). Polifenoles naturales y estabilidad del aceite de oliva. *Grasas y Aceites*, 26, 1, 14-18.

**Vázquez Roncero, A.,** Janer Del Valle, C., Janer Del Valle M<sup>a</sup> L. (1976). Componentes fenólicos de la aceituna. III. Polifenoles del aceite. *Grasas y Aceites*, 27, 185-191.

**Vinha, A. F.,** Ferreres, F., Silva, B. M., Valentao, P., Goncalves, A., Pereira, J.A., Oliveira, M. B., Seabra, R. M., Andrade, P. B. (2005). , Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.) Influences of cultivar and geographical origin. *Food Chemistry*, 89, 561-568.

**Vlahov, G.,** Schiavone, C., Simone, N. (2001). Quantitative <sup>13</sup>C NMR method using the DEPT pulse sequence for the determination of the geographical origin (DOP) of olive oils. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 39, 689-695.

**Vossen, P.** Growing olives for oil, In: Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties, J. Harwood and R. Aparicio (Eds.), *Springer Inc., 2013, pp. 19-56.*

# Z

**Zeiner, M.**, Juranovic-Cindric, I., & Skevin, D. (2010). Characterization of extra virgin olive oils derived from the Croatian cultivar Oblica. *European Journal on Lipid Science and Technology*, 112, 1248-1252.

**Zhu, F.**, Fan, W., Wang, X., Qu, L., & Yao, S. (2011). Health risk assessment of eight heavy metals in nine varieties of edible vegetable oils consumed in China. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 3081-3085.

**Zunin, P.**, Boggia, R., Salvadeo, P., Evangelisti, F. (2005). Geographical traceability of West Liguria extravirgin olive oils by the analysis of volatile terpenoid hydrocarbons, *Journal of Chromatography A*, 1089, 243-249.





# **CAPÍTULO 7.**

**Anexos**



## Anexo 1. Índice de Tablas

<b>Tabla 1.1.</b> Características organolépticas regladas del aceite de oliva	<b>13</b>
<b>Tabla 1.2.</b> Resultado de análisis y valoración organoléptica de aceites. Campaña 1994/95	<b>14</b>
<b>Tabla 1.3.</b> Análisis de aceites de Huelva. Campaña 2011/12	<b>15</b>
<b>Tabla 1.4.</b> Composición de ácidos grasos en el aceite de oliva (%), indicando su acrónimo, el número de dobles enlaces y su rango de concentración	<b>18</b>
<b>Tabla 1.5.</b> Componentes principales de la fracción del insaponificable, sus concentraciones medias y la función asociada a los mismos	<b>21</b>
<b>Tabla 1.6.</b> Compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva agrupados por familias	<b>30</b>
<b>Tabla 3.1.</b> Características de la muestras de aceites	<b>47</b>
<b>Tabla 3.2.</b> Características de la muestras de orujos	<b>50</b>
<b>Tabla 3.3.</b> Características de la muestras de suelos	<b>53</b>
<b>Tabla 3.4.</b> Condiciones de funcionamiento para el espectrómetro ICP –OES	<b>62</b>
<b>Tabla 3.5.</b> Condiciones de funcionamiento para el espectrómetro ICP –MS	<b>62</b>
<b>Tabla 3.6.</b> Curva de regresión lineal, coeficiente de correlación, repetitividad, reproducibilidad, límite de detección y límite de cuantificación de los elementos determinados por ICP-MS	<b>64</b>
<b>Tabla 3.7.</b> Curva de regresión lineal, coeficiente de correlación, repetitividad, reproducibilidad, límite de detección y límite de cuantificación de los elementos determinados por ICP-OES	<b>65</b>
<b>Tabla 3.8.</b> Exactitud del método utilizando un material de referencia	<b>67</b>
<b>Tabla 3.9.</b> Precisión del método expresada como %RSD	<b>68</b>
<b>Tabla 3.10.</b> Características cromatográficas de los ácidos grasos separados	<b>69</b>
<b>Tabla 3.11.</b> Gradiente de fases móviles del HPLC-DAD	<b>72</b>
<b>Tabla 3.12.</b> Características cromatográficas de los compuestos fenólicos separados	<b>73</b>
<b>Tabla 3.13.</b> Precisión del método expresada como % RSD para altas concentraciones	<b>76</b>
<b>Tabla 3.14.</b> Precisión del método expresada como % RSD para bajas concentraciones	<b>76</b>
<b>Tabla 3.15.</b> Curvas de regresión, rango lineal, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LQD)	<b>77</b>
<b>Tabla 3.16.</b> Gradiente de fases móviles del UHPLC-ESI-MS/MS	<b>79</b>
<b>Tabla 3.17.</b> Tiempos de retención y parámetros del MS/MS para los compuestos fenólicos	<b>80</b>


<b>Tabla 4.1.</b> Contenido metálico en las muestras de suelo expresado en ng Kg-1	<b>89</b>
<b>Tabla 4.2.</b> Contenido metálico en las muestras de orujo expresado en ng Kg-1	<b>92</b>
<b>Tabla 4.3.</b> Contenido metálico en las muestras de aceite expresado en ng Kg-1	<b>101</b>
<b>Tabla 4.4.</b> Medias y desviaciones estándar de las concentraciones de los 34 elementos en las dos profundidades	<b>107</b>
<b>Tabla 4.5.</b> Medias y desviaciones estándar de las concentraciones de los elementos en los suelos de las cuatro zonas seleccionadas	<b>109</b>
<b>Tabla 4.6.</b> Medias y desviaciones estándar de las concentraciones de los elementos de los alperujos de las cuatro zonas seleccionadas	<b>111</b>
<b>Tabla 4.7.</b> Porcentajes de las concentraciones de los elementos determinados en los alperujos con respecto a los determinados en los suelos	<b>112</b>
<b>Tabla 4.8.</b> Medias y desviaciones estándar de las concentraciones de los elementos de los aceites de las cuatro zonas seleccionadas	<b>114</b>
<b>Tabla 4.9.</b> Descripción de las muestras utilizadas para la determinación del perfil de ácidos grasos y para el contenido en esteroides, uvaol y eritrodiol	<b>118</b>
<b>Tabla 4.10.</b> Resultados obtenidos del perfil de ácidos grasos de las diferentes muestras en %	<b>120</b>
<b>Tabla 4.11.</b> Resultados del contenido en esteroides, uvaol y eritrodiol	<b>126</b>
<b>Tabla 4.12.</b> Matriz de Clasificación resultante del análisis discriminante	<b>128</b>
<b>Tabla 4.13.</b> Características cromatográficas de los compuestos fenólicos identificados en las muestras	<b>133</b>
<b>Tabla 4.14.</b> Contenido de los compuestos fenólicos individuales de las muestras procedentes de Niebla determinados mediante HPLC-DAD (mg Kg-1)	<b>134</b>
<b>Tabla 4.15.</b> Contenido de los compuestos fenólicos individuales de las muestras procedentes de Beas determinados mediante HPLC-DAD (mg Kg-1)	<b>135</b>
<b>Tabla 4.16.</b> Contenido de los compuestos fenólicos individuales de las muestras procedentes de Sanlúcar de Gadiana y Gibraleón determinados mediante HPLC-DAD (mg Kg-1)	<b>136</b>
<b>Tabla 4.17.</b> Matriz de Clasificación resultante del análisis discriminante	<b>139</b>
<b>Tabla 4.18.</b> Descripción de las muestras utilizadas para la determinación del perfil fenólico y para el contenido en volátiles	<b>140</b>
<b>Tabla 4.19.</b> Contenido de los compuestos fenólicos individuales de las diferentes muestras determinados mediante HPLC-UPLC-MS (mg Kg-1)	<b>141</b>
<b>Tabla 4.20.</b> Contenido en compuestos volátiles de las diferentes muestras de las diferentes muestras determinados mediante GC-FID (mg Kg-1)	<b>143</b>
<b>Tabla 4.21.</b> Contenido medio de compuesto fenólicos y resultados del MANOVA	<b>147</b>

## Anexo 2. Índice de Figuras

<b>Figura 1.1.</b> Porcentajes a nivel mundial y europeo de los principales productores de aceite de oliva	8
<b>Figura 1.2.</b> Porcentajes por comunidades autónomas y a nivel andaluz de los principales productores de aceite de oliva	8
<b>Figura 1.3.</b> Mapa de la zona de estudio	11
<b>Figura 1.4.</b> Esquema de la composición química del aceite de oliva virgen.	16
<b>Figura 3.1.</b> Zona de muestreo	45
<b>Figura 3.2.</b> Distribución del muestreo general	46
<b>Figura 3.3.</b> Cromatograma correspondiente al material de referencia. Identificación de los picos en la Tabla 3.10	69
<b>Figura 3.4.</b> Esquema del método de micro extracción líquido-líquido de fenoles individuales	71
<b>Figura 3.5.</b> Cromatograma de la mezcla de patrones a 280 nm	74
<b>Figura 3.6.</b> Cromatograma de la mezcla de patrones a 320nm	74
<b>Figura 3.7.</b> Cromatograma de la mezcla de patrones a 360nm	75
<b>Figura 3.8.</b> Cromatograma total de iones (TIC) obtenido en modo DMRM en el análisis UHPLC-MS/MS de compuestos fenólicos en la disolución multiestándar. La designación de los picos fue: (1) ácido gálico, (2) ácido protocatéquico, (3) hidroxitirosol, (4) ácido p-hidroxibenzoico, (5) tirosol, (6) ácido p-hidroxifenilacético, (7) ácido vanílico, (8) ácido cafeico, (9) vainillina, (10) ácido p-cumárico, (11) ácido ferúlico, (12) ácido m-cumárico, (13) ácido sinápico, (14) rutina, (15) ácido o-cumárico, (16) oleuropeína, (17) ácido cinámico, (18) luteolina, (19) pinosresinol, (20) apigenina	81
<b>Figura 4.1.</b> Aplicación del análisis discriminante lineal (LDA) a la concentración de tres elementos (Fe, Na y W) determinados en los suelos de los olivares, recogidos a dos profundidades (30 cm y 60 cm) de cuatro orígenes geográficos (Beas, Gibraleón, Niebla y Sanlúcar de Gadiana)	108
<b>Figura 4.2.</b> Aplicación del análisis discriminante lineal (LDA) a las concentraciones de ocho elementos (Fe, Na, W, Mg, Mn, Ca, Li, Ba) determinados en el orujo de las distintas variedades (Arbequina, Picual y Verdial de Huévar) y cuatro orígenes geográficos (Beas, Gibraleón, Niebla y Sanlúcar de Gadiana)	113
<b>Figura 4.3.</b> Aplicación del análisis discriminante lineal (LDA) a las concentraciones de ocho elementos (Ba, Bi, Ca, Cu, Fe, Li, Mg, Mn, Sn, W) determinados en los aceites de oliva de las variedades Arbequina, Picual y Verdial de Huévar de cuatro orígenes geográficos (Beas, Gibraleón, Niebla y Sanlúcar de Gadiana)	116

<b>Figura 4.4.</b> Cromatograma de los ésteres metílicos correspondiente a una muestra de la variedad Verdial	119
<b>Figura 4.5.</b> Contenido medio de los distintos ácidos grasos (1. Mirístico, 2. Palmítico, 3. Palmitoleico, 4. Margárico, 5. Margaroleico, 6. Esteárico, 7. Oleico, 8. Linoleico, 9. Araquidico, 10. Linolénico, 11. Gadoleico, 12. Behénico, 13. Lignocérico, 14. C18:1/c18:2, 15. C16:0/c18:2, Insaturado/saturado) en las cuatro zonas de estudio (Niebla, Sanlúcar del Guadiana, Beas y Gibraleón). Los valores con la misma letra indican que no existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) según el test LSD	124
<b>Figura 4.6.</b> Cromatograma de esteroides de una muestra de aceite de oliva virgen extra. 1. Colesterol; 2. Patrón interno; 3. Brasicasterol; 4. Campesterol; 5. Estigmasterol; 6. B-Sitosterol aparente; 7. $\Delta$ -7-Estigmasterol; 8. Eritrodiol; 9. Uvaol	125
<b>Figura 4.7.</b> Contenido medio de los distintos esteroides (1. Esteroides Totales, 2. Colesterol, 3. Brasicasterol, 4. Campesterol, 5. Estigmasterol, 6. $\beta$ -Sitosterol, 7. $\Delta$ -7-Estigmasterol, 8. Eritrodiol+Uvaol) en las cuatro zonas de estudio (Niebla, Sanlúcar del Guadiana, Beas y Gibraleón). Los valores con la misma letra indican que no existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) según el test LSD	127
<b>Figura 4.8.</b> Representación de las funciones discriminante obtenidas para el conjunto de todas las muestra en base a los contenidos de ácidos grasos y esteroides	129
<b>Figura 4.9.</b> Representación de las funciones discriminantes obtenidas para el conjunto de muestras de la variedad Arbequina en base a sus contenidos en ácidos grasos y esteroides	130
<b>Figura 4.10.</b> Representación de las funciones discriminantes obtenidas para el conjunto de muestras de la variedad Picual en base a sus contenidos en ácidos grasos y esteroides	130
<b>Figura 4.11.</b> Cromatograma a 280 nm de una muestra de aceite de oliva	132
<b>Figura 4.12.</b> Cromatograma a 320nm de una muestra de aceite de oliva	133
<b>Figura 4.13.</b> Cromatograma a 360 nm de una muestra de aceite de oliva	133
<b>Figura 4.14.</b> Contenido medio de los distintos fenoles (1. Hidroxitirosol, 2. Tirosol, 3. Ác. Vainillico, 4. Vainillina, 5. Ác. p-cumárico, 6. Ác. o- cumárico, 7. Rutina, 8. Oleuropeina, 9. Luteolina, 10. Apigenina) en las cuatro zonas de estudio (Niebla, Sanlúcar del Guadiana, Beas y Gibraleón). Los valores con la misma letra indican que no existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) según el test LSD	137
<b>Figura 4.15.</b> Representación de las funciones discriminantes obtenidas para el conjunto de muestra en base a su perfil fenólico obtenido mediante HPLC-DAD	139
<b>Figura 4.16.</b> Representación de las funciones canónicas con las variables seleccionadas como significativas por el MANOVA	149
<b>Figura 4.17.</b> Representación de las funciones canónicas de todas las variables originales con una F de entrada de 4 y una F de salida igual a 1	150

### Anexo 3. Publicación relacionada con la temática de la Tesis.

-  **María Beltrán**, María Sánchez-Astudillo, Ramón Aparicio, Diego L. García-González. (2015). Geographical traceability of virgin olive oils from southwestern Spain by their multi-elemental composition, *Food Chemistry* 169, 350-357.

