



# LIVAE

Nº 122  
ED. ESPAÑOLA  
NOVIEMBRE 2015

REVISTA OFICIAL DEL CONSEJO OLEÍCOLA INTERNACIONAL

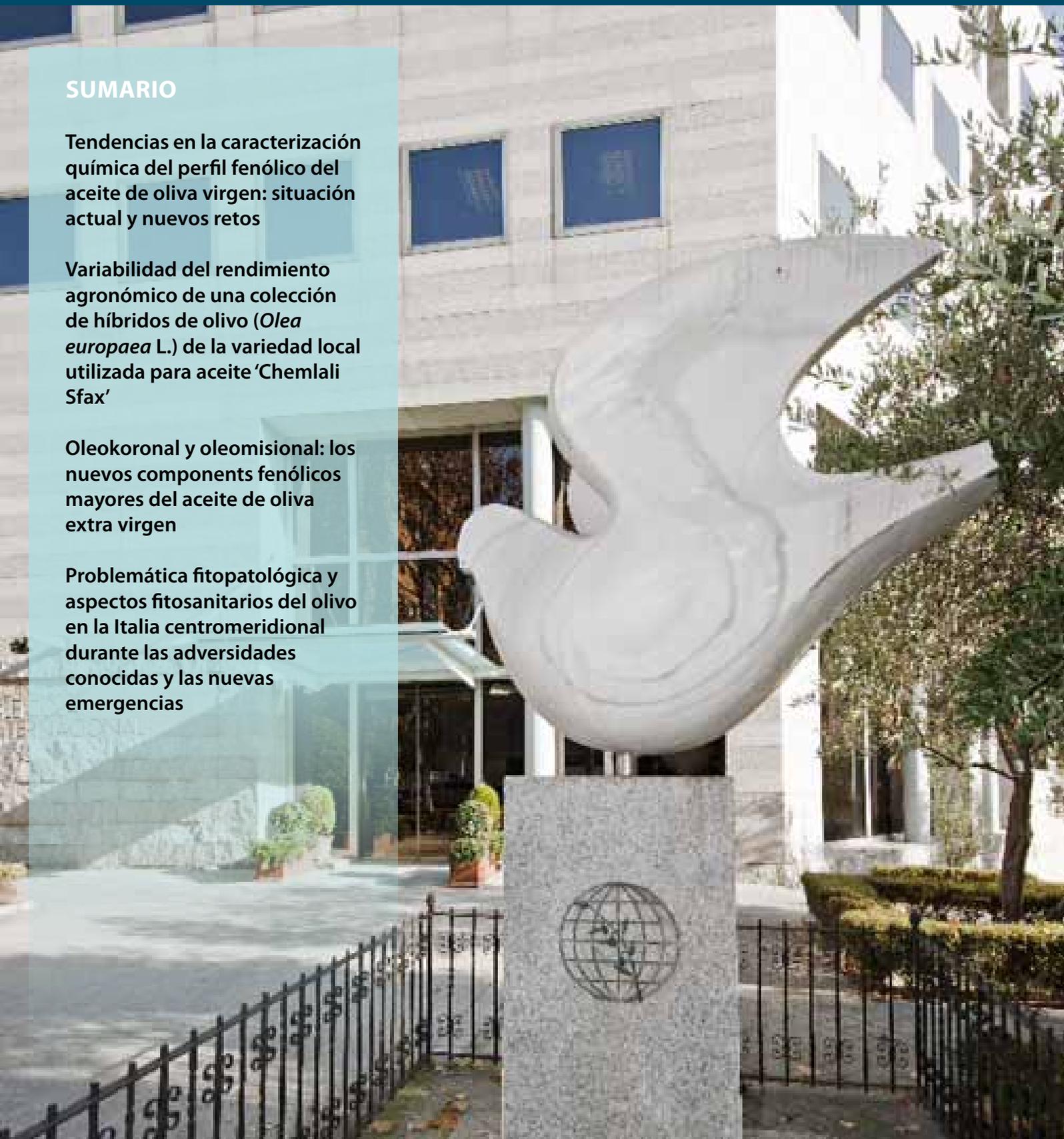
## SUMARIO

**Tendencias en la caracterización química del perfil fenólico del aceite de oliva virgen: situación actual y nuevos retos**

**Variabilidad del rendimiento agronómico de una colección de híbridos de olivo (*Olea europaea* L.) de la variedad local utilizada para aceite 'Chemlali Sfax'**

**Oleokoronal y oleomisional: los nuevos componentes fenólicos mayores del aceite de oliva extra virgen**

**Problemática fitopatológica y aspectos fitosanitarios del olivo en la Italia centromeridional durante las adversidades conocidas y las nuevas emergencias**



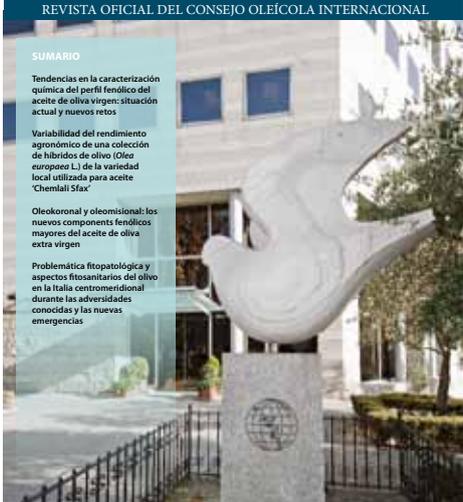
SUMARIO

Tendencias en la caracterización química del perfil fenólico del aceite de oliva virgen: situación actual y nuevos retos

Variabilidad del rendimiento agronómico de una colección de híbridos de olivo (*Olea europaea* L.) de la variedad local utilizada para aceite 'Chemlali Sfax'

Oleokoronal y oleomisional: los nuevos componentes fenólicos mayores del aceite de oliva extra virgen

Problemática fitopatológica y aspectos fitosanitarios del olivo en la Italia centromeridional durante las adversidades conocidas y las nuevas emergencias



# SUMARIO

OLIVAE | N°122

## OLIVAE

### Revista Oficial del Consejo Oleícola Internacional

Publicada en: árabe, español, francés, inglés e italiano.  
Revista Arbitrada

Príncipe de Vergara, 154  
28002 Madrid, España  
Tel.: 34-915 903 638  
Fax: 34-915 631 263  
E-mail: [iooc@internationaloliveoil.org](mailto:iooc@internationaloliveoil.org)  
Web: [www.internationaloliveoil.org](http://www.internationaloliveoil.org)

ISSN: 0255-996X  
Depósito legal: M-37830-1983

Las denominaciones empleadas en esta publicación y la forma en que aparecen presentados los datos que contiene no implican, de parte de la Secretaría Ejecutiva del COI, juicio alguno sobre la condición jurídica de países, territorios, ciudades o zonas, o de sus autoridades, ni respecto de la delimitación de sus fronteras o límites.

El contenido de los artículos publicados en esta revista no refleja necesariamente el punto de vista de la secretaría del COI en la materia.

Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos publicados en OLIVAE con la mención expresa de su origen.

# 3

## Tendencias en la caracterización química del perfil fenólico del aceite de oliva virgen: situación actual y nuevos retos

Abdelhakim Bakhouché / Jesús Lozano Sánchez  
Alberto Fernández Gutiérrez / Antonio Segura Carretero

# 17

## Variabilidad del rendimiento agronómico de una colección de híbridos de olivo (*Olea europaea* L.) de la variedad local utilizada para aceite 'Chemlali Sfax'

F. Ben Amar / M. Mezghani-Aiachi / A. Yengui  
H. Belguith / S. Harrab / M. K. Hergli

# 23

## Oleokoronal y oleomisional: los nuevos componentes fenólicos mayores del aceite de oliva extra virgen

Panagiotis Diamantakos / Angeliki Velkou  
K. Brian Killday / Thanasis Gimisis / Eleni Melliou  
Prokopios Magiatis

# 35

## Problemática fitopatológica y aspectos fitosanitarios del olivo en la Italia centromeridional durante las adversidades conocidas y las nuevas emergencias

V. Vizzarri / L. Tosi

# Tendencias en la caracterización química del perfil fenólico del aceite de oliva virgen: situación actual y nuevos retos

**Abdelhakim Bakhouché<sup>a,b</sup>, Jesús Lozano Sánchez<sup>b,c\*</sup>,  
Alberto Fernández Gutiérrez<sup>a,b</sup>, Antonio Segura Carretero<sup>a,b</sup>**

<sup>a</sup> Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Fuentenueva s/n, E-18071 Granada (España).

<sup>b</sup> Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avenida del Conocimiento s/n, E-18016 Granada (España)

<sup>c</sup> Departamento de Investigación y Desarrollo del Aceite de Oliva como Alimento Funcional, Aceites Maeva S. L. Avda. Incar s/n, 18130 Escúzar, Granada (España).

Autor para la correspondencia

\*Tel.: +34 958249510.

Fax: +34958249510.

Dirección de correo electrónico: [jesusls@ugr.es](mailto:jesusls@ugr.es)

## Resumen

En los últimos años se ha incrementado el interés por la fracción fenólica del aceite de oliva (AOV) debido a la importancia que estos compuestos presentan para la salud de los consumidores. Es por ello que resulta imprescindible establecer una metodología analítica que permita su análisis cualitativo y cuantitativo de forma eficiente y precisa. En este artículo se presenta una revisión bibliográfica acerca de los procedimientos analíticos actuales disponibles para su determinación incluyendo: extracción de los analitos de interés, separación cromatográfica de los componentes presentes en el extracto obtenido en la etapa previa y la caracterización tanto cualitativa como cuantitativa de los mismos. Los sistemas de extracción más utilizados son la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE). Entre las técnicas de separación descritas, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica más empleada para el análisis de los compuestos fenólicos. Sin embargo, se ha demostrado que la cromatografía de gases (GC) y la electroforesis capilar (CE) son técnicas complementarias a HPLC y ofrecen una metodología alternativa para la caracterización de la composición fenólica en los AOV. En esta revisión se recogen los principales detectores acoplados a cada técnica separativa así como los parámetros optimizados y las ventajas y los inconvenientes de cada una de ellas. Finalmente, se exponen los problemas analíticos que presentan en la actualidad los métodos para la determinación de los compuestos fenólicos del AOV. Para solucionar estos problemas, los investigadores deben tener en cuenta los inconvenientes de cada uno de los métodos descritos. El reto analítico de cara al futuro será establecer un único método que pueda aplicarse en todos los estudios de los compuestos fenólicos del AOV.

## Palabras claves

AOV, compuestos fenólicos, extracción, técnicas de separación, problemas analíticos.

## Abstract

Due to the important role played by phenolic compounds in the nutritional value of virgin olive oil (VOO), it is necessary to develop efficient and accurate analytical methods for their qualitative and quantitative analysis. This

**Recibido:** Junio de 2015 / **Aceptado:** Julio de 2015 / **Publicado:** Noviembre de 2015

review presents an overview of different analytical approaches to the determination of phenolic compounds in VOO. In principle, the analytical procedure for the determination of individual phenolic compounds in VOO involves three basic steps: extraction from the oil sample, chromatographic separation, and characterization. The extraction systems in widest use are liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE). Among the separation techniques reported, high performance liquid chromatography (HPLC) was the most widespread technique applied for the analysis of phenolic compounds. However, it was demonstrated that gas chromatography (GC) and capillary electrophoresis (CE) are able to achieve the same aims as HPLC while providing alternative methodologies for the characterization of phenolic compounds in VOO. The optimized parameters, advantages and disadvantages of each technique are reported in this review. In addition, the different detectors coupled to the separation techniques are reviewed. Finally, the current analytical problems in the determination of phenolic compounds in VOO are also presented. In order to overcome these problems, researchers have to take into consideration the drawbacks of the previous methods. The future challenge will be to establish one single method for application to all VOO studies relating to phenolic compounds.

## Keywords

VOO, phenolic compounds, extraction, separation techniques, analytical problems.

## Introducción

El aceite de oliva virgen (AOV) goza de una popularidad creciente en todo el mundo, no sólo por sus características organolépticas únicas sino también por los efectos beneficiosos sobre la salud asociados a su consumo, especialmente cuando éste tiene lugar dentro de la dieta mediterránea. Los beneficios para la salud del aceite de oliva se han atribuido a su perfil de ácidos grasos así como a la presencia de numerosos componentes bioactivos, como los tocoferoles, los fosfolípidos y los compuestos fenólicos. De hecho, varias funciones y propiedades biológicas se han relacionado con la presencia de estos últimos compuestos. Como reflejan estudios realizados en humanos, el consumo de aceite de oliva rico en compuestos fenólicos proporciona efectos antioxidantes y antiinflamatorios y reduce la prolifera-

ción de moléculas de adhesión celular en comparación con la ingesta de aceite de oliva con un contenido en compuestos fenólicos bajo (Covas 2007; Fitó y de la Torre *et al.*, 2007). En 2011, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) aprobó una declaración relativa al efecto protector de los compuestos fenólicos del aceite de oliva (5 mg/día) frente al daño oxidativo en los lípidos en sangre (Franco y Galeano-Díaz *et al.*, 2014).

En los AOV se han identificado, al menos, 36 compuestos fenólicos con una estructura diferente entre los que se incluyen alcoholes fenólicos, ácidos fenólicos, lignanos, flavonoides y secoiridoides. Estos compuestos son la clase más importante de antioxidantes naturales presentes en el AOV. Por desgracia, su concentración en los AOV no es constante, sino que varía en función de distintos factores, como la variedad de aceituna las condiciones edafoclimáticas y agronómicas de la zona de cultivo y el estado de maduración del fruto (Bajoub y Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2015; Bakhouché y Lozano-Sánchez *et al.*, 2015; Dabbou y Chehab *et al.*, 2010). Además, varios estudios han descrito los efectos de distintas fases del procesado del AOV, como son la molturación, el batido, la centrifugación o separación de fases, el almacenamiento y la filtración, sobre la composición fenólica de estos aceites (Bakhouché y Lozano-Sánchez, *et al.*, 2014a; Frankel y Bakhouché *et al.*, 2013).

Debido a las continuas variaciones en el contenido de compuestos fenólicos de los AOV por los factores antes mencionados y a la necesidad de diferenciar correctamente los perfiles polifenólicos de AOV obtenidos a partir de distintas variedades de aceituna, zona geográfica, o bajo diferentes sistemas de producción y elaboración de este alimento, se han propuesto varios métodos de análisis para determinar los compuestos fenólicos utilizando diversas técnicas de extracción, separación y caracterización cualitativa y cuantitativa. Para el aislamiento y separación de esta fracción del aceite se han empleado, principalmente, dos métodos: la extracción líquido-líquido (LLE) y la extracción en fase sólida (SPE). En ambos sistemas se han probado diversas mezclas de disolventes y distintos tipos de sorbentes para maximizar la recuperación de compuestos fenólicos en el AOV (Bendini y Bonoli *et al.*, 2003).

Para llevar a cabo la caracterización de la composición fenólica de los extractos obtenidos por cualquiera de los dos sistemas de extracción, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la principal técnica empleada para la separación de los compuestos fenólicos (Bayram y Esatbeyoglu *et al.*, 2012). También se han

descrito otras técnicas, como la cromatografía de gases (GC) y la electroforesis capilar (CE) (Ballus y Meinhart *et al.*, 2011; García-Villalba y Pacchiarotta *et al.*, 2011). Estas técnicas de separación están acopladas a distintos detectores. Así, la detección ultravioleta-visible (UV-Vis) con batería de diodos (DAD) es el método estándar utilizado para los compuestos fenólicos y, junto con la espectrometría de masas, es el sistema que predomina en la actualidad (Bakhouché y Lozano-Sánchez *et al.*, 2013). La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) también se ha utilizado como sistema de detección para la caracterización de la composición fenólica en el AOV. Sin embargo, debido a su elevado coste, su uso únicamente se encuentra al alcance de un número reducido de instituciones (Etrakis y Giomyrganaki *et al.*, 2008).

A pesar de que se han optimizado numerosos métodos para determinar la concentración de compuestos fenólicos en el AOV, sigue siendo difícil llevar a cabo una comparación directa de los datos disponibles en la literatura por las grandes diferencias en términos de concentración. En la mayoría de estos casos, tales diferencias han sido atribuidas a la influencia de diversos factores agronómicos y tecnológicos, lo que en gran medida puede justificar tales discrepancias. Sin embargo, algunos autores han sugerido que las diferencias observadas podrían deberse a los métodos de análisis empleados (Bakhouché y Lozano-Sánchez *et al.*, 2014b; Karkoula y Skantzari *et al.*, 2012). Por tanto, los objetivos de esta revisión son: primero, ofrecer una descripción general de los principales métodos de extracción y separación empleados en el análisis de los compuestos fenólicos en el AOV; y, segundo, establecer las ventajas e inconvenientes de los métodos que se están utilizando en la actualidad en base a los resultados descritos en la bibliografía por distintos autores.

## Métodos para la extracción de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen

En general, en toda metodología analítica se requiere un paso previo de aislamiento de los analitos objeto de estudio desde la matriz que se trate. El objetivo principal de esta etapa es preparar un extracto enriquecido en todos los compuestos de interés y libre de interferencias con otras especies químicas presentes en la matriz y que puedan afectar en la etapa de separación y detección de tales compuestos.

Como se ha citado anteriormente, la extracción de los compuestos fenólicos en muestras de AOV se ha llevado a cabo principalmente mediante LLE y SPE. Estos sistemas no solo difieren en los disolventes o los sorbentes de fase sólida utilizados, sino también en las cantidades de muestra y en el volumen de los disolventes empleados en los procedimientos.

### Extracción líquido-líquido

Los compuestos fenólicos del aceite de oliva se han aislado principalmente mediante la extracción a partir de una solución de aceite con metanol o mezclas de metanol/agua. Antes de la extracción, el procedimiento de extracción líquido-líquido precisa de un paso previo en el que el AOV se disuelve con un disolvente apolar para eliminar la fracción lipídica y facilitar la extracción de los compuestos fenólicos por medio del disolvente polar. Para tal finalidad se han empleado distintos tipos de disolventes como hexano, éter de petróleo y cloroformo. De estos, el hexano es el que se ha usado con mayor frecuencia (Lerma-García, Lantano *et al.*, 2009; Montedoro, Servili *et al.*, 1992). En el caso de los disolventes polares empleados en la extracción, la literatura no contiene datos consistentes sobre la identificación del mejor disolvente para la recuperación total de los compuestos fenólicos del AOV. Inicialmente, la extracción con una mezcla de metanol/agua en una proporción de 80:20 parecía obtener mejores resultados que el metanol puro o las mezclas de metanol/agua 60:40 (Montedoro, Servili *et al.*, 1992). Sin embargo, cinco años más tarde, se eligió el metanol puro como disolvente para la extracción de los compuestos fenólicos del AOV en lugar de las mezclas de metanol/agua debido a la extracción incompleta de algunos compuestos fenólicos con estas mezclas. Esta hipótesis podría atribuirse a la considerable formación de emulsión entre el agua y el aceite (Angerosa, D'Alessandro *et al.*, 1995). Otros estudios han demostrado que, al reducir el porcentaje de metanol al 60 %, aumentan los porcentajes de recuperación de los compuestos fenólicos (Ballus, Meinhart *et al.*, 2014; Pirisi, Cabras *et al.*, 2000). También se ha descrito el uso de disolventes orgánicos distintos del metanol en la LLE. Algunos ejemplos de estos son el etanol, el acetónitrilo y la *N, N* dimetilformamida (DMF). Este último parece obtener unos buenos porcentajes de recuperación (Brenes, Garcí *et al.*, 2000).

En base a la cantidad de muestra y disolvente utilizados para la extracción de los compuestos fenólicos del AOV, el sistema LLE puede dividirse en distintas categorías. El sistema convencional se caracterizaba por el uso de grandes cantidades de muestra y disolventes orgánicos, que convertían la extracción en un proceso laborioso, caro y largo (Gómez-Caravaca, Ca-

rrasco Pancorbo *et al.*, 2005). Debido a estos inconvenientes, se desarrolló un nuevo sistema de LLE denominado microextracción líquido-líquido (LLME), que sustituyó al sistema convencional. Podría considerarse una versión de la LLE convencional que requiere una cantidad de muestra menor y genera menos residuos. Además, es más rápido. En un estudio comparativo, se evaluaron la repetibilidad, la reproducibilidad y la recuperación de compuestos fenólicos con los sistemas LLE y LLME. Los resultados mostraron que ambos métodos presentaban una buena repetibilidad y una buena reproducibilidad. Sin embargo, los valores de fenoles totales extraídos del AOV con el método LLE fueron inferiores a los obtenidos con el método LLME (Pizarro, Becerra *et al.*, 2013). En un estudio más reciente, se mejoró el método LLME reduciendo el volumen de disolvente de 1 ml a 0,5 ml a fin de obtener una caracterización de los compuestos fenólicos del AOV por medio de cromatografía líquida de ultraalta resolución acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (Becerra-Herrera, Sánchez-Astudillo *et al.*, 2014). Además de estos métodos, se han desarrollado y aplicado otras técnicas de extracción líquido-líquido a la extracción de compuestos fenólicos del AOV, como la microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME) y la microextracción líquido-líquido dispersiva en fase reversa (RP-DLLME) (Godoy-Caballero, Acedo-Valenzuela *et al.*, 2013).

### Extracción en fase sólida

La técnica SPE se ha hecho cada vez más popular en la última década como procedimiento para el aislamiento de los compuestos fenólicos del AOV. En su aplicación se han utilizado varios tipos de sorbentes. Las primeras extracciones se llevaron a cabo con cartuchos C8 (500 mg, 3,5 ml, Alltech) destacando su velocidad y sencillez con respecto a la extracción LLE (Pirisi y Cabras *et al.*, 2000). Un año más tarde, se llevó a cabo un estudio de comparación de diferentes tipos de sorbentes modificados con grupos funcionales diol y amino a fin de determinar cuál era más adecuado para la extracción de estos analitos. (Mateos, Espartero *et al.*, 2001). Los autores pusieron de manifiesto que para el caso de los polifenoles extraídos con fases modificadas con grupos amino tenía lugar la formación de artefactos en la extracción, debido posiblemente a interacciones entre el disolvente empleado y estos grupos funcionales, por lo que seleccionaron como mejor sorbente de extracción la fase sólida modificada con grupos -diol. De forma paralela otros autores evaluaron la capacidad de otros sorbentes para extraer polifenoles del aceite: —octadecilsilano C<sub>18</sub> (2 g, 6 ml) y octadecilsilano C<sub>18</sub><sub>EC</sub> (con bloqueo, o “endcapping”; 2 g, 6 ml). (Liberatore, Procida *et al.*, 2001). Los resultados mostraron unas

recuperaciones poco satisfactorias con los cartuchos C<sub>18</sub><sub>EC</sub>, mientras que los cartuchos C<sub>18</sub> obtuvieron una recuperación cuantitativa prácticamente total de todos los compuestos estudiados. Los autores atribuyeron las diferencias en el comportamiento de los cartuchos C<sub>18</sub> y C<sub>18</sub><sub>EC</sub> a la interacción entre el material sorbente y el analito. El mecanismo subyacente en la liberación del analito inducida por el eluyente depende probablemente de la interacción entre los grupos Si-OH residuales ubicados en la superficie del material de sílice y los compuestos absorbidos. En el caso del cartucho C<sub>18</sub><sub>EC</sub>, se suprimen los grupos polares residuales y esta característica aparentemente reduce la liberación del analito. A la vista de los resultados, en años siguientes se llevó a cabo un estudio para establecer los porcentajes de recuperación de los compuestos fenólicos del AOV empleando los sorbentes C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub> y -diol. Los resultados mostraron que en la extracción con cartuchos diol se obtuvo una mayor recuperación de fenoles totales, *o*-difenoles, tirosol, hidroxitirosol y secoiridoides que en los demás procedimientos de extracción (Bendini, Bonoli *et al.*, 2003). Estos resultados fueron confirmados por otro estudio más reciente (Gómez-Caravaca, Carrasco Pancorbo *et al.*, 2005).

Otro aspecto importante que debe tenerse en cuenta durante la SPE es el equilibrio entre la cantidad de AOV y de sorbente utilizado. En un primer estudio se llevó a cabo la extracción de los polifenoles presentes en 30 g de AOV empleando cartuchos diol de 500 mg y 1 g. Los resultados obtenidos mostraron que, con los cartuchos de 500 mg, la recuperación presentaba unos valores bajos. Sin embargo, los valores registrados aumentaron sustancialmente con los cartuchos de 1 g. Posteriormente, para establecer la saturación del sorbente se modificó la cantidad de AOV (10 g, 20 g y 30 g). Los resultados mostraron que la mayoría de los compuestos registraron un incremento lineal en el área de pico ligado al aumento de la cantidad de aceite de oliva. Sin embargo, a partir de los 20 g de AOV, se observó una curvatura de la señal del tirosol, el ácido vanílico y el ácido siríngico, probablemente relacionada con la saturación del cartucho (Godoy-Caballero y Acedo-Valenzuela *et al.*, 2012). Algunos estudios han indicado que el cartucho de 500 mg se utilizan generalmente en la SPE a pequeña escala y el de 1 g, en la SPE a gran escala (Laura Capriotti y Cavaliere *et al.*, 2014).

Finalmente, existen estudios comparativos entre ambas técnicas de extracción —SPE y LLE— que han dado como resultado la publicación de datos discordantes. Aunque muchos estudios han concluido que la extracción LLE permite una mayor recuperación que la

SPE (Bendini, Bonoli *et al.*, 2003; Hrncirik y Fritsche, 2004), otros autores han considerado la SPE como el método de referencia para la extracción de compuestos fenólicos del AOV en lugar de la LLE debido a su facilidad de uso y corto tiempo de extracción (Gómez-Caravaca, Carrasco Pancorbo *et al.*, 2005; Pirisi, Cabras *et al.*, 2000). Sin embargo, en un estudio se han descrito problemas en el método de SPE debido a su selectividad hacia los compuestos fenólicos individuales, especialmente las agliconas (Hrncirik, Fritsche, 2004). Además los autores han llegado a la conclusión de que la SPE únicamente parece ser eficaz en el AOV fresco, puesto que, al oxidarse, la fase estacionaria de las columnas de SPE interactúa con los fenoles oxidados. Esta interacción conduciría a una mayor retención no selectiva de los compuestos fenólicos no oxidados, reduciendo así la recuperación total de estos analitos (Armaforte, Mancebo-Campos *et al.*, 2007).

## Técnicas de separación para el análisis de los compuestos fenólicos en el AOV

### Cromatografía líquida

La cromatografía líquida (LC) se considera la técnica de elección para la separación de los compuestos fenólicos. En la literatura científica aparecen referencias tanto a la LC en fase normal como en fase reversa. La primera utiliza gel de sílice como fase estacionaria en la columna y un disolvente no polar como eluyente, mientras que la segunda emplea una fase estacionaria ligada de octadecilsilano no polar (C18) y un disolvente polar como fase móvil. Se ha indicado que la LC en fase reversa es la técnica más utilizada debido a su mejor separación de los compuestos polares y mayor reproducibilidad (Carrasco-Pancorbo, Cerretani *et al.*, 2005; Laura Capriotti, Cavaliere *et al.*, 2014). En esta modalidad se han descrito una amplia variedad de columnas con distintas dimensiones. Las columnas más utilizadas son las de 100 a 250 mm de longitud, 2 a 4,6 mm de diámetro interior y 1,8 a 5  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula (Selvaggini, Servili *et al.*, 2006; Taamalli, Abaza *et al.*, 2013).

Inicialmente la separación de los compuestos fenólicos se llevo a cabo en gradiente isocrático consiguiendo una buena resolución empleando una fase móvil con una composición adecuada (Akasbi, Shoeman *et al.*, 1993). Sin embargo, a día de hoy se utiliza exclusivamente el modo de elución en gradiente debido funda-

mentalmente a la complejidad del perfil fenólico del aceite. Se han empleado distintas fases móviles que cuentan en su composición con diversos eluentes siendo habituales los sistemas binarios con agua y un disolvente orgánico menos polar, como el acetonitrilo o el metanol (Bakhouch, Lozano-Sánchez *et al.*, 2015; De la Torre-Carbot, Jauregui *et al.*, 2005). El eluyente acuoso generalmente es acidificado con ácidos como el ácido acético, el ácido fórmico y el ácido perclórico, a fin de conservar una concentración ácida constante durante las mediciones del gradiente y mejorar la separación cromatográfica (Bayram, Esatbeyoglu *et al.*, 2012; De la Torre-Carbot, Jauregui *et al.*, 2005; Taamalli, Abaza *et al.*, 2013). En efecto, la reducción del pH ha ayudado en parte a mejorar la resolución, pero la falta de resolución entre compuestos con tiempos de retención próximos y el largo tiempo de análisis siguen siendo los principales inconvenientes de esta técnica. Estos problemas se han solventado en parte con el desarrollo de columnas con partículas de pequeño tamaño en la fase estacionaria lo que ha aumentado la resolución y reducido el tiempo de análisis. Las altas presiones originadas por el uso de fases estacionarias con partículas de pequeño tamaño obliga al desarrollo de nuevos sistemas que sean capaces de soportar las mayores presiones, como los equipos comerciales de cromatografía líquida de resolución rápida (RRLC) y la cromatografía líquida de ultra alta resolución (UPLC).

Los principales parámetros que han tenido especial atención en la optimización de métodos de LC han sido el tipo de columna, gradiente, la temperatura y el flujo de fase móvil. En un estudio reciente, se ha optimizado un nuevo método de cromatografía empleando un equipo RRLC con columnas más empaquetadas (columna Zorbax C18: 4,6 mm  $\times$  150 mm, tamaño de partícula de 1,8  $\mu\text{m}$ ) tomando como base las condiciones cromatográficas de un método anterior de cromatografía que utilizó una columna de mayores dimensiones (columna Gemini C18: 3 mm  $\times$  250 mm, tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ ) (García-Villalba, Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2010). En este trabajo los autores optimizaron una elución en gradiente en un sistema binario empleando como fase móvil agua + 0,5 % de ácido acético como eluyente A, y acetonitrilo como eluyente B, rangos de temperatura entre 25 y 40  $^{\circ}\text{C}$  y flujos de fase móvil comprendidos entre 0,5 y 2 ml/minuto. Los resultados mostraron que el aumento del flujo y la temperatura permitieron reducir los tiempos del análisis sin reducir de forma significativa la resolución cromatográfica, excepto para valores de temperatura en torno a los 40  $^{\circ}\text{C}$ , en cuyas condiciones se produjo la superposición de algunos picos. Finalmente, se determinaron como valores óptimos un caudal de 1,5 ml/minuto y una tem-

peratura de 30 °C como. Con este método optimizado, el tiempo del análisis fue reducido de 60 minutos (HPLC) a 20 minutos (RRLC). En un estudio posterior empleando la misma columna otros autores establecieron una comparativa de diferentes eluentes como fase móvil (agua con diferentes porcentajes de acético como eluente A y acetonitrilo y metanol, así como sus mezclas como eluente B), así como diferentes temperaturas y flujos. Los resultados mostraron que la mejor separación se obtuvo con la fase móvil agua + 0.25% acético como eluente A, metanol como eluente B y temperatura y flujo de 25 °C y 0,8 ml/minuto, respectivamente. Con estas condiciones, se consiguió una buena separación cromatográfica de los compuestos fenólicos en solo 27 minutos (Lozano-Sánchez, Segura-Carretero *et al.*, 2010).

### Cromatografía de gases

Desde su invención y, especialmente, desde la introducción de la columna capilar de sílice fundida en la cromatografía de gases (GC), esta técnica se ha convertido en una de las más eficaces para la química analítica debido a las significativas mejoras conseguidas en la calidad de las separaciones (Carrasco-Pancorbo, Nevedomskaya *et al.*, 2009). La GC se ha utilizado para llevar a cabo determinaciones cualitativas y cuantitativas de los compuestos fenólicos de los AOV (García-Villalba, Pacchiarotta *et al.*, 2011; Saitta, Curto *et al.*, 2002). Sin embargo, su uso se ha visto limitado por la reducida volatilidad de muchos compuestos fenólicos. Para solucionar este problema, el análisis precisa de un paso previo conocido como derivatización, en el que los compuestos fenólicos se convierten en compuestos más volátiles gracias a distintas reacciones de derivatización. Existen numerosos métodos de derivatización, pero el más citado de todos ellos es la silylación (Angerosa, D'Alessandro *et al.*, 1996; Zafra-Gómez, Luzón-Toro *et al.*, 2010).

En un estudio reciente, se ha optimizado cuidadosamente el procedimiento de derivatización mediante la comparación de distintos reactivos y la prueba de su eficiencia tanto en soluciones patrón como en muestras reales. Para ello en primer lugar, el procedimiento de derivatización se optimizó en una solución patrón con una mezcla de tirosol e hidroxitirosol utilizando como reactivos de derivatización N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA), N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida + trimetilclorosilano (BSTFA + TMCS), N,O-bis(trimetilsilil)acetamida + trimetilclorosilano (BSA + TMCS) y ter-butildimetilclorosilano (TBDMSCl) y disolventes de reacción la piridina y el acetonitrilo. A pesar de los buenos resultados obtenidos con los reactivos BSTFA y BSTFA+TMCS, los

mejores porcentajes se consiguieron con la mezcla de BSA+TMCS. Sin embargo, estos autores propusieron BSTFA para el análisis de los compuestos fenólicos de muestras de AOV a fin de evitar la inyección de TMCS, que puede reducir la vida útil de la columna (Purcaro, Codony *et al.*, 2014).

En la literatura científica se pueden encontrar numerosos trabajos que tratan de optimizar las variables que afectan a la separación de los compuestos fenólicos derivatizados por GC. Los principales parámetros optimizados han sido la naturaleza de las columnas, temperaturas del inyector, modos de inyección y cantidad de muestra inyectada, así como temperatura del horno, (Angerosa, D'Alessandro *et al.*, 1996; García-Villalba, Pacchiarotta *et al.*, 2011; Ríos, Gil *et al.*, 2005). En casi todos los métodos descritos, se utilizó el helio como gas portador. Con la optimización de los parámetros anteriores se consiguió una buena resolución cromatográfica variando el tiempo de análisis en función de los valores aplicados para cada variable descrita. Sin embargo, la necesidad de llevar a cabo la derivatización convierte a esta técnica en un procedimiento más laborioso. Por otra parte, las reacciones de derivatización incompletas pueden ir acompañadas de la formación de varias especies químicas del mismo compuesto, que podrían dar lugar a resultados confusos. Otro inconveniente de esta técnica es el uso de elevadas temperaturas, con el consiguiente riesgo de daño en los analitos (Carrasco-Pancorbo, Cerretani *et al.*, 2005).

### Electroforesis capilar

En los últimos años, la electroforesis capilar (CE) ha demostrado ser una técnica rápida para el análisis de componentes alimentarios, ya que combina tiempos de análisis cortos con una gran eficiencia en la separación. En particular, se ha utilizado para el análisis de los compuestos fenólicos del AOV (Bendini, Bonoli *et al.*, 2003). Se han optimizado distintos métodos electroforéticos para encontrar las mejores condiciones de separación y así llevar a cabo el análisis en el menor tiempo posible y con una resolución suficiente. Parámetros típicos objeto de optimización han sido las dimensiones del capilar, tampón (tipo, concentración y pH), temperatura, voltaje aplicado para la separación, y tipo de inyección de la muestra. La optimización de los primeros métodos resultó muy laboriosa por la necesidad de optimizar individualmente todos los parámetros indicados anteriormente (Bonoli, Montanucci *et al.*, 2003; Carrasco-Pancorbo, Gómez-Caravaca *et al.*, 2006a; Gómez-Caravaca, Carrasco Pancorbo *et al.*, 2005). Sin embargo, el uso reciente de métodos multicriterio, que tienen en cuenta simultáneamente todas las separaciones críticas, facilita y agiliza el desarrollo

de nuevos métodos electroforéticos (Ballus, Meinhart *et al.*, 2011; Ballus, Meinhart *et al.*, 2014). Además, para reducir el número de pasos que intervienen en el análisis de los compuestos fenólicos mediante la electroforesis capilar, se ha reportado el uso de una nueva técnica conocida como “electroforesis capilar no acuosa” (NACE). Su principal ventaja respecto de la técnica convencional es su capacidad para funcionar con una amplia variedad de disolventes orgánicos (metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, o acetonitrilo, entre otros). Como es sabido, antes del análisis de matrices complejas, a menudo se necesitan LLE o SPE para lograr una preconcentración con disolventes orgánicos. Tras la preconcentración, los analitos de interés se diluyen habitualmente en un disolvente orgánico. En la CE acuosa, el extracto normalmente se evapora y los analitos se disuelven en un medio acuoso. Sin embargo, este paso no es necesario cuando se utiliza la NACE (Godoy-Caballero, Acedo-Valenzuela *et al.*, 2012b). A pesar de los esfuerzos llevados a cabo por varios grupos de investigación para desarrollar unos métodos de CE fiables, el número de publicaciones sobre la aplicación de esta técnica al campo de *Olea europaea* es escaso probablemente debido a algunas desventajas que presenta, como su poca reproducibilidad, la baja sensibilidad en la detección UV y los problemas de acoplamiento con la espectrometría de masas (Carrasco-Pancorbo, Gómez-Caravaca *et al.*, 2006a; Godoy-Caballero, Acedo-Valenzuela *et al.*, 2012b).

## Detectores

Los compuestos fenólicos se determinan habitualmente con detectores UV-Vis y DAD, principalmente acoplados a LC y CE. En la detección de compuestos fenólicos con LC, pueden utilizarse 280 nm para los análisis rutinarios, ya que la mayoría de ellos absorben a esta longitud de onda, mientras que 240 nm se utiliza para algunos secoiridoides y sus derivados; 310-320 nm, para los ácidos hidroxicinámicos; y 350 nm, para las flavonas (Bakhouche, Lozano-Sánchez *et al.*, 2013; Garcia y Coelho *et al.*, 2013; Godoy-Caballero, Acedo-Valenzuela *et al.*, 2012a). En el método de análisis oficial del Consejo Oleícola Internacional (COI) para la determinación de los compuestos fenólicos, se emplea la detección UV-Vis. Este método establece los valores máximos de absorbancia de 27 compuestos fenólicos diferentes y proporciona un procedimiento para la cuantificación de estos analitos tomando como base los datos ofrecidos por el detector UV (COI, 2009). Los detectores UV también se han utilizado para

estudiar la variación del contenido de compuestos fenólicos del AOV bajo la influencia de distintos factores agronómicos y tecnológicos (Gómez-Rico, Salvador *et al.*, 2006; Parenti, Spugnoli *et al.*, 2008).

Por lo que respecta al análisis mediante CE, la detección UV para la caracterización de distintos grupos fenólicos en el AOV se ha llevado a cabo en las siguientes longitudes de onda: 200, 240, 280 y 330 nm, aunque se ha utilizado la detección con batería de diodos en el rango de 190-600 nm para lograr los datos espectroscópicos (Carrasco-Pancorbo, Gómez-Caravaca *et al.*, 2006a). En estudios más recientes, se ha utilizado la CE acoplada a un detector UV para desarrollar un nuevo método electroforético para la separación de los compuestos fenólicos de los extractos de AOV, a fin de comparar la recuperación de compuestos fenólicos de diferentes sistemas de extracción y para estudiar la composición fenólica del AOV obtenido de distintas variedades de aceituna (Ballus, Meinhart *et al.*, 2014; Godoy-Caballero, Galeano-Díaz *et al.*, 2012c; Gómez-Caravaca, Carrasco Pancorbo *et al.*, 2005).

En GC, el detector de ionización de llama (FID) es el detector acoplado con mayor frecuencia a esta técnica de separación. De hecho, la técnica GC-FID se ha utilizado para analizar los perfiles fenólicos de distintos aceites, incluido el AOV. El método propuesto para ello ha permitido estimar el contenido de compuestos fenólicos en el aceite de girasol, el aceite de colza y el AOV (Farajzadeh, Yadeghari *et al.*, 2014). Otros autores han utilizado la técnica GC-FID para analizar el contenido total de hidroxitirosol y tirosol en los aceites de oliva vírgenes extra tras la hidrólisis de las formas enlazadas (Purcaro y Codony *et al.*, 2014).

Recientemente, se han acoplado espectrómetros de masas (MS) a distintas técnicas de separación para la caracterización de los compuestos fenólicos del AOV. Los tipos de detectores más citados en la literatura son el analizador de masas de tiempo de vuelo (TOF-MS), el analizador de masas cuadrupolo -tiempo de vuelo (QTOF-MS) y el analizador de masas de trampa de iones (IT-MS) (Bakhouche y Lozano-Sánchez *et al.*, 2014b; Fu y Segura-Carretero *et al.*, 2009; Laura Capriotti y Cavaliere *et al.*, 2014). Con respecto a los analizadores de masas de tiempo de vuelo, aparte de la rápida velocidad de barrido y el amplio rango de masas que pueden detectarse, otra característica importante del espectrómetro de masas es su gran precisión en la determinación de la masa exacta. Este método ofrece una alta selectividad en la determinación de los compuestos fenólicos con el modo de cromatograma de iones extraídos (EIC) cuando existe superposición de picos.

Además el híbrido QTOF permite confirmar de manera rápida y eficiente la composición elemental de los iones cuando se lleva a cabo la fragmentación. El acoplamiento de LC, GC o CE a espectrómetros de masas ha permitido obtener una caracterización detallada de la fracción fenólica en distintos estudios de la calidad del AOV (Bengana, Bakhouché *et al.*, 2013; Carrasco-Pancorbo, Arráez-Román *et al.*, 2006b; Saitta, Curto *et al.*, 2002). Además, el uso de la espectrometría de masas permite investigar la relación entre la naturaleza química de la concentración de los distintos compuestos fenólicos de los extractos de AOV y su capacidad para paliar determinadas enfermedades crónicas (García-Villalba, Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2010). También se han mencionado otros detectores, como los detectores de fluorescencia y los detectores de RMN (Etrakis, Giomyrgianaki *et al.*, 2008; Tena, García-González *et al.*, 2009). Sin embargo, no son tan habituales como los detectores UV y MS.

## Problemas analíticos de la caracterización de los compuestos fenólicos del AOV

En todos los estudios que tienen como objetivo la cuantificación de los componentes fenólicos del AOV, la preocupación de los investigadores ha sido lograr la recuperación total de estos analitos desde la matriz. Para evaluar dicha recuperación los primeros estudios utilizaron una mezcla de patrones comerciales con la que se enriqueció aceite de cacahuete refinado para comparar los porcentajes de recuperación con varias técnicas de extracción. El aceite enriquecido se sometió a continuación a distintos sistemas de extracción (LLE y SPE). Los extractos resultantes se analizaron mediante HPLC y la cantidad de cada patrón se comparó con la mezcla de patrones que no se sometió a ningún proceso de extracción (Bendini, Bonoli *et al.*, 2003). Sin embargo, al evaluar los resultados obtenidos, es necesario tener en cuenta que para la mayoría de los compuestos fenólicos presentes de forma natural en el aceite de oliva no hay patrones comerciales disponibles en el mercado. Por tanto, para evaluar su recuperación se usó otros compuestos con unas estructuras similares. En estos casos, dichos patrones con estructuras similares pueden presentar una respuesta diferente a la de los analitos presentes en las muestras de aceite y, por tanto, los resultados de la recuperación únicamente deben tomarse como estimaciones.

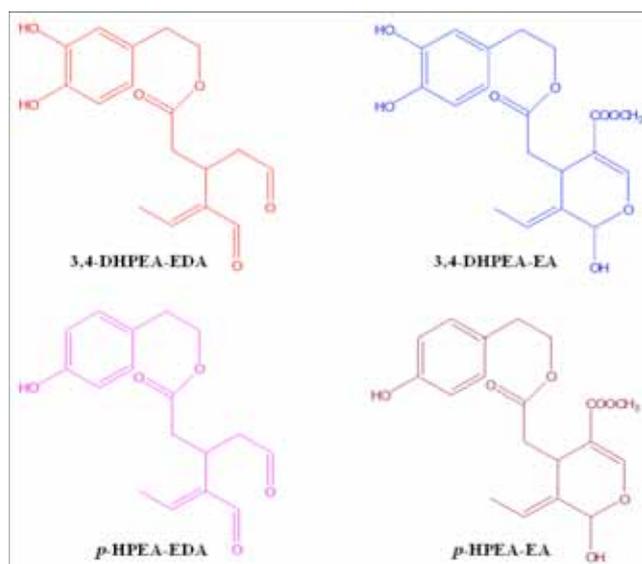
Para solucionar este problema, otros autores han propuesto un método de extracción basado en el enrique-

cimiento de aceite de girasol refinado (libre de compuestos fenólicos) con una dosis exacta de un extracto de compuestos fenólicos de AOV preparado mediante LLE. A continuación, el aceite enriquecido se sometió a una extracción SPE y se calcularon los porcentajes de recuperación (Gómez-Caravaca, Carrasco Pancorbo *et al.*, 2005). Este enfoque ha ofrecido una solución parcial para estimar la recuperación de compuestos fenólicos del AOV.

Por otro lado, es importante considerar que estos estudios preliminares en los que se compararon los porcentajes de recuperación de diferentes sistemas de extracción no tuvieron en cuenta las interacciones entre la matriz y los compuestos objeto de análisis. Es de especial interés remarcar el efecto del contenido en agua del AOV en la extracción de compuestos fenólicos en ambos sistemas (LLE y SPE). Varios estudios han demostrado la relación entre el contenido de agua y los compuestos fenólicos. Se sabe que el aceite de oliva contiene una cantidad pequeña de agua y, por tanto, puede considerarse una emulsión de agua en aceite. Los compuestos fenólicos se encuentran en la interfase agua/aceite (Ambrosone, Cinelli *et al.*, 2006; Frankel, Huang *et al.*, 1994).

El efecto del contenido de agua sobre la extracción de los compuestos fenólicos del AOV se observó por primera vez al estudiar el efecto del sistema de filtración a escala de laboratorio sobre el contenido en compuestos fenólicos del AOV (Gómez-Caravaca y Cerretani *et al.*, 2007). En este estudio, se utilizó la LLE para extraer los compuestos fenólicos. Los resultados obtenidos por los autores mostraron que la cantidad de compuestos pertenecientes al grupo de los secoiridoides, como el ligustrósido aglicona y la oleuropeína aglicona, aumentó significativamente tras reducirse el contenido de agua mediante la filtración con algodón si se comparaba con el AOV no filtrado. Así, en las emulsiones de agua en aceite, los compuestos fenólicos se estabilizan alrededor de las gotas de agua, y la afinidad de estos compuestos por la extracción con disolvente es baja en matrices más polares (aceites de oliva con mayor contenido de agua), dificultando de este modo la recuperación. Sin embargo, la eliminación parcial de agua durante el proceso de filtración facilita la extracción de compuestos fenólicos con una mezcla de disolventes menos polares, dando como resultado un aumento aparente de su concentración en el AOV filtrado. Cinco años después, se confirmó el efecto del contenido de agua sobre la extracción de compuestos fenólicos de muestras de AOV por medio de SPE (Lozano-Sánchez, Cerretani *et al.*, 2012). Utilizando el método

de filtración en saco en una planta piloto, los autores encontraron que los secoiridoides del AOV filtrado eran responsables del aparente aumento del contenido total de compuestos fenólicos. Finalmente, en un estudio más reciente se ha confirmado el aumento aparente del contenido de distintos compuestos del grupo de los secoiridoides debido a la variación del contenido de agua del AOV (Bakhouch, Lozano-Sánchez *et al.*, 2014a). Las estructuras químicas de los principales compuestos cuya recuperación se vio afectada por la variación en el contenido de agua del AOV se muestran en la **figura 1**.



**Figura 1:** Estructura de algunos compuestos fenólicos afectados por la variación en el contenido de agua del AOV durante la extracción: 3,4-DHPEA-EDA (decarboximetil oleuropeína aglicona), 3,4-DHPEA-EA (oleuropeína aglicona), p-HPEA-EDA (decarboximetil ligustrósido aglicona) y p-HPEA-EA (ligustrósido aglicona).

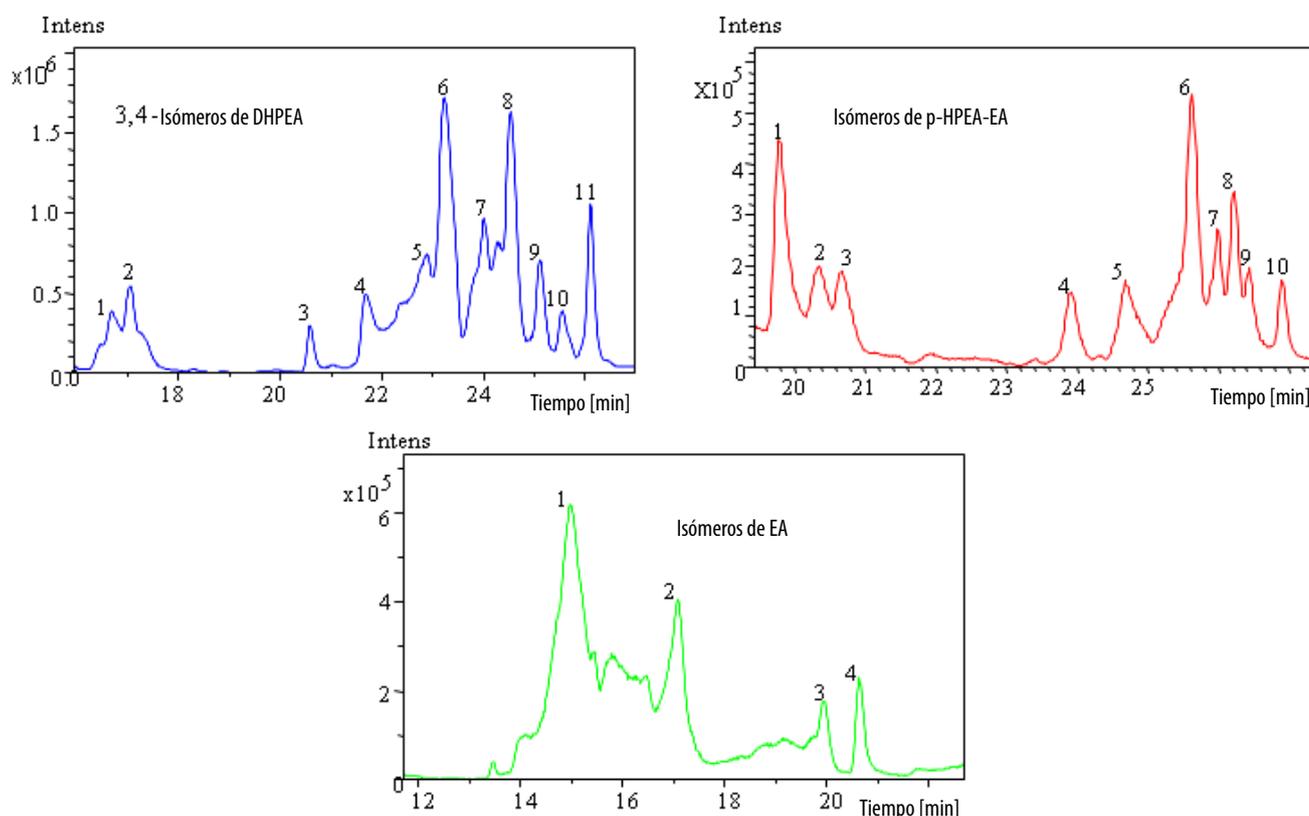
Estos estudios han confirmado el efecto de la variación en el contenido de agua del AOV inducida por la filtración sobre la extracción de los compuestos fenólicos. Sin embargo, es sabido que el contenido de agua del AOV también varía en función del estado de maduración del fruto, la variedad de aceituna y la zona geográfica (Motilva, Tovar *et al.*, 2000; Taamalli, Gómez-Caravaca *et al.*, 2010). Numerosos estudios han utilizado los perfiles fenólicos para distinguir entre las diferentes variedades de aceituna, para clasificar los AOV en función de su origen geográfico (denominación de origen) y para determinar el mejor momento para la cosecha a fin de obtener un AOV con un elevado contenido de compuestos fenólicos, mientras que se han llevado a cabo otros estudios sobre la bioactividad de los compuestos fenólicos del AOV (García-Villalba, Carrasco-Pancorbo *et al.*, 2010; Karkoula, Skantzari *et al.*, 2012; Ouni, Taamalli *et al.*, 2011; Rotondi, Bendi-

ni *et al.*, 2004; Taamalli, Gómez-Caravaca *et al.*, 2010). Desgraciadamente, en ninguno de estos estudios se ha tenido en cuenta la variación del contenido de agua del AOV y su efecto durante la extracción de compuestos fenólicos. Esto puede afectar a la precisión de los datos descritos en distintas publicaciones sobre la concentración de estos analitos en el AOV. En un intento reciente por resolver este problema, se ha desarrollado un nuevo enfoque para corregir el efecto de la reducción de la humedad posterior a la filtración del AOV sobre la recuperación de compuestos fenólicos mediante el uso de un patrón interno durante la extracción. Como resultado de esto, se ha corregido el aumento aparente de secoiridoides y ha sido posible cuantificar correctamente los compuestos fenólicos en el AOV filtrado (Bakhouch, Lozano-Sánchez *et al.*, 2014b). Sin embargo, la optimización del método propuesto se ha basado únicamente en la modificación del contenido de humedad del AOV tras el filtrado. Por tanto, se necesitarán futuras investigaciones para desarrollar un nuevo método de extracción que pueda aplicarse a todos los tipos de estudios relacionados con la fracción fenólica y el contenido de agua del AOV. Hasta entonces, la extracción de los compuestos fenólicos del AOV seguirá planteando problemas.

Como es bien sabido, tras el aislamiento de los compuestos fenólicos del AOV, el siguiente reto es elaborar un método fiable para el análisis de los extractos obtenidos. A pesar del desarrollo de potentes equipos y métodos de análisis, en ocasiones, la caracterización estructural total de la fracción fenólica sigue siendo imposible debido a la complejidad del amplio grupo de polifenoles, en especial los secoiridoides. Los principales compuestos identificados en este grupo son la oleuropeína aglicona, el ligustrósido aglicona y sus derivados, como las formas hidroxiladas, decarboximetiladas, hidratadas y metiladas. Hoy en día, los isómeros de estos compuestos están siendo objeto de investigaciones científicas. En el primer estudio llevado a cabo, se caracterizaron once isómeros de la oleuropeína aglicona en AOV español (Fu, Segura-Carretero *et al.*, 2009) utilizando cromatografía líquida de resolución rápida acoplada a espectrometría de masas por ionización por electrospray, con analizadores de tiempo de vuelo y trampa de iones. En un estudio más reciente, se han detectado dieciocho, diecisiete y nueve isómeros de la oleuropeína aglicona, el ligustrósido aglicona y el ácido elenólico, respectivamente, por medio de cromatografía en fase reversa Fused-Core acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) y a espectrometría de masas en tándem de alta resolución (HRMS/MS), con modos de ionización por electrospray (ESI) positivo y negativo (Vichi, Cortés-

Francisco *et al.*, 2013). Estos isómeros se han considerado el resultado de la isomerización de la oleuropeína y el ligustrósido tras la hidrólisis producida durante la maduración de la aceituna y el procesamiento del aceite de oliva. Sin embargo, un estudio llevado a cabo con HPLC-UV con columnas de fase reversa ha detectado una formación de los isómeros de decarboximetil ligustrósido aglicona y de decarboximetil oleuropeína aglicona debida a la reacción de estos dos compuestos con el agua o el metanol utilizados como fase móvil (Karkoula, Skantzari *et al.*, 2012). Además, en un estudio más reciente, estos mismos autores han probado la formación artificial de los isómeros de la oleuropeína aglicona y el ligustrósido aglicona (Karkoula, Skantzari *et al.*, 2014). Por tanto, los isómeros también

pueden formarse durante el análisis cromatográfico, dependiendo de la fase móvil utilizada. Estos hallazgos han confirmado que la medición cromatográfica clásica de estos compuestos resulta problemática, especialmente en medios acuosos, y que muchas de las mediciones descritas en la literatura son más o menos cuestionables. Debe tenerse en cuenta que los métodos oficiales y propuestos por varios autores y comités internacionales emplean el agua como eluyente A para la fase móvil. Esto puede afectar a los resultados debido a la interacción entre el agua y algunos compuestos fenólicos, lo que arroja dudas sobre la estimación de esta fracción, tal como se muestra, por ejemplo, en la **figura 2** en relación con los principales isómeros detectados en el AOV.



**Figura 2:** Isómeros de la oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EA), el ligustrósido aglicona (p-HPEA-EA) y el ácido elenólico (EA) obtenidos mediante HPLC-ESI-TOF/MS.

## Conclusiones

Los diferentes métodos para el aislamiento y la separación de compuestos fenólicos han resuelto muchos problemas relacionados con la estimación de esta fracción en el AOV. De esta forma, ha sido posible probar fácilmente el valor nutricional y las propiedades saludables de este aceite. Sin embargo, algunos aspectos de los métodos citados deben mejorarse. Por ejemplo, la inconsistencia de los datos reportados en la literatura

científica dificulta la comparación de AOV producidos en distintas partes del mundo utilizando como criterio de distinción su contenido de compuestos fenólicos. Por tanto, se necesitarán nuevas investigaciones que tengan como objetivo elaborar métodos precisos y armonizados que permitan evitar las confusiones al comparar los distintos datos publicados. Las mejoras que resulta necesario introducir deben tener en cuenta la problemática actual, en especial el efecto del contenido de agua de los AOV sobre el aislamiento de los com-

puestos fenólicos y la formación artificial de algunos isómeros durante la separación cromatográfica como consecuencia de la fase móvil utilizada.

## Agradecimientos

Deseamos expresar nuestro agradecimiento al Ministerio de Economía y Competitividad de España (proyecto BFU2014-52433-C3-2-R), la Consejería de Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía (P11-CTS-7625), la Universidad de Granada, el Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional y el Consejo Oleícola Internacional (COI) por la concesión de la beca al estudiante de doctorado.

## Referencias

- Akasbi, M., Shoeman, D. M. y Saari Csallany, A. 1993. High-Performance Liquid Chromatography of Selected Phenolic Compounds in Olive Oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 70: 367–370.
- Ambrosone, L., Cinelli, G., Mosca, M. and Ceglie, A. 2006. Susceptibility of water-emulsified extra virgin olive oils to oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 83: 165–170.
- Angerosa, F., D'Alessandro, N., Corana, F. and Mellerio, G. 1996. Characterization of phenolic and secoiridoid aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 736: 195–203.
- Angerosa, F., D'Alessandro, N., Konstantinou, P. and Di Giacinto, L. 1995. GC-MS Evaluation of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* 43: 1802–1807.
- Armaforte, E., Mancebo-Campos, V., Bendini, A., Desamparados Salvador, M., Fregapane, G. and Cerretani, L. 2007. Retention effects of oxidized polyphenols during analytical extraction of phenolic compounds of virgin olive oil. *J. Sep. Sci.* 30: 2401–2406.
- Bajoub, A., Carrasco-Pancorbo, A., Ajal, E. A., Ouazani, N. and Fernández-Gutiérrez, A. 2015. Potential of LC-MS phenolic profiling combined with multivariate analysis as an approach for the determination of the geographical origin of north Moroccan virgin olive oils. *Food Chem.* 166: 292–300.
- Bakhouche, A., Lozano-Sánchez, J., Ballus, C. A., Bendini, A., Gallina-Toschi, T., Fernández-Gutiérrez, A. and Segura-Carretero, A. 2014b. A new extraction approach to correct the effect of apparent increase in the secoiridoid content after filtration of virgin olive oil. *Talanta.* 127: 18–25.
- Bakhouche, A., Lozano-Sánchez, J., Ballus, C. A., Martínez-García, M., Velasco, G. M., Govantes, Á. O., Gallina-Toschi, T., Fernández-Gutiérrez, A. and Segura-Carretero, A. 2014a. Monitoring the moisture reduction and status of bioactive compounds in extra-virgin olive oil over the industrial filtration process. *Food Control.* 40: 292–299.
- Bakhouche, A., Lozano-Sánchez, J., Beltrán-Debón, R., Joven, J., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2013. Phenolic characterization and geographical classification of commercial Arbequina extra-virgin olive oils produced in southern Catalonia. *Food Res. Int.* 50: 401–408.
- Bakhouche, A., Lozano-Sánchez, J., Bengana, M., Fernández-Gutiérrez, A. and Segura-Carretero, A. 2015. Time course of Algerian Azeradj extra-virgin olive oil quality during olive ripening. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 117: 0000–0000.
- Ballus, C. A., Meinhart, A. D., Bruns, R. E. and Godoy, H. T. 2011. Use of multivariate statistical techniques to optimize the simultaneous separation of 13 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary electrophoresis. *Talanta.* 83: 1181–1187.
- Ballus, C. A., Meinhart, A. D., de Souza Campos, F. A., Bruns, R. E. and Godoy, H. T. 2014. Doehlert design-desirability function multi-criteria optimal separation of 17 phenolic compounds from extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis. *Food Chem.* 146: 558–68.
- Bayram, B., Esatbeyoglu, T., Schulze, N., Ozcelik, B., Frank, J. and Rimbach, G. 2012. Comprehensive analysis of polyphenols in 55 extra virgin olive oils by HPLC-ECD and their correlation with antioxidant activities. *Plant foods Hum. Nutr.* 67: 326–36.
- Becerra-Herrera, M., Sánchez-Astudillo, M., Beltrán, R. and Sayago, A. 2014. Determination of phenolic compounds in olive oil: New method based on liquid-liquid micro extraction and ultra high performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry. *LWT - Food Sci. Technol.* 57: 49–57.
- Bendini, A., Bonoli, M., Cerretani, L., Biguzzi, B., Lercker, G. and Toschi, T. G. 2003. Liquid – liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. *J. Chromatogr. A.* 985:425–433.
- Bengana, M., Bakhouche, A., Lozano-sánchez, J., Amir, Y., Youyou, A., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2013. Influence of olive ripeness on chemical properties and phenolic composition of Chemlall extra-virgin olive oil. *Food Res. Int.* 54: 1868–1875.
- Bonoli, M., Montanucci, M., Toschi, T. G. and Lercker, G. 2003. Fast separation and determination of tyro-

- sol, hydroxytyrosol and other phenolic compounds in extra-virgin olive oil by capillary zone electrophoresis with ultraviolet-diode array detection. *J. Chromatogr. A.* 1011: 163–172.
- Brenes, M., Garcı, A., Garcı, P. and Garrido, A. 2000. Rapid and Complete Extraction of Phenols from Olive Oil and Determination by Means of a Coulometric Electrode Array System. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5178–5183.
- Carrasco-pancorbo, A., Arráez-román, D., Segura-carretero, A. and Fernández-gutiérrez, A. 2006b. Capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry method to determine the phenolic fraction of extra-virgin olive oil. *Electrophoresis.* 27: 2182–2196.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina-Toschi, T. and Fernández-Gutiérrez, A. 2005. Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J. Sep. Sci.* 28: 837–858.
- Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2006a. A simple and rapid electrophoretic method to characterize simple phenols, lignans, complex phenols, phenolic acids, and flavonoids in extra-virgin olive oil. *J. Sep. Sci.* 29: 2221–2233.
- Carrasco-Pancorbo, A., Nevedomskaya, E., Arthen-Engeland, T., Zurek, G., Baessmann, C., Deelder, A. M. and Mayboroda, O. A. 2009. Gas Chromatography/Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry: Analytical Validation and. *Anal. Chem.* 81: 10071–10079.
- Covas, M. I. 2007. Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacol. Res.* 55: 175–86.
- Dabbou, S., Chehab, H., Faten, B., Dabbou, S., Esposto, S., Selvaggini, R., Taticchi, A., Servili, M., Montedoro, G. F. and Hammamia, M. 2010. Effect of three irrigation regimes on Arbequina olive oil produced under Tunisian growing conditions. *Agric. Water Manage.* 97: 763-768
- De la Torre-Carbot, K., Jauregui, O., Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Ravento, R. M. and López-Sabater, M. C. 2005. Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Olive Oils by Solid-Phase Extraction, HPLC-DAD, and HPLC-MS / MS. *J. Agric. Food Chem.* 53: 4331–4340.
- Etrakis, P. A. V. P., Giomyrgianaki, A. L. A., Hristophoridou, S. T. C., Pyros, A. P. S. and Ais, P. H. D. 2008. Geographical Characterization of Greek Virgin Olive Oils (Cv. Koroneiki) Using <sup>1</sup>H and <sup>31</sup>P NMR Fingerprinting with Canonical Discriminant Analysis and Classification Binary Trees. *J. Agric. Food Chem.* 56: 3200–3207.
- Farajzadeh, M. A., Yadeghari, A., Khoshmaram, L. and Ghorbanpour, H. 2014. Analytical Methods Development and validation of a rapid and sensitive gas chromatographic method for the analysis of some phenolic compounds in vegetable oils. *Anal. Methods.* 6: 5314–5321.
- Fitó, M., de la Torre, R. and Covas, M. I. 2007. Olive oil and oxidative stress. *Mol. Nutr. Food Res.* 51: 1215–24.
- Franco, M. N., Galeano-Díaz, T., López, O., Fernández-Bolaños, J. G., Sánchez, J., De Miguel, C., Gil, M. V. and Martín-Vertedor, D. 2014. Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. *Food Chem.* 163: 289–98.
- Frankel, E., Bakhouch, A., Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A. and Fernández Gutiérrez, A. 2013. Literature Review on Production Process To Obtain Extra Virgin Olive Oil Enriched in Bioactive Compounds. Potential Use of Byproducts as Alternative Sources of Polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* 61: 5179–5188.
- Frankel, E., Huang, S., Kanner, J. and German, J. B. 1994. Interfacial Phenomena in the Evaluation of Antioxidants: Bulk Oils vs Emulsionst. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1054–1059.
- Fu, S., Segura-Carretero, A., Arráez-Román, D., Menéndez, J. A., De La Torre, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2009. Tentative characterization of novel phenolic compounds in extra virgin olive oils by rapid-resolution liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 57: 11140–11147.
- Garcia, B., Coelho, J., Costa, M., Pinto, J. and Paiva-Martins, F. 2013. A simple method for the determination of bioactive antioxidants in virgin olive oils. *J. Sci. Food Agric.* 93: 1727–32.
- García-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferraros, C., Vázquez-Martín, A., Menéndez, J. A., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2010. Characterization and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils with anticancer properties by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51: 416–29.
- García-Villalba, R., Pacchiarotta, T., Carrasco-Pancorbo, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Deelder, A. M. and Mayboroda, O. A. 2011. Gas chromatography-atmospheric pressure chemical ionization-time of flight mass spectrometry for profiling of phenolic compounds in extra virgin olive oil. *J. Chromatogr. A.* 1218: 959–971.
- Godoy-Caballero, M. D. P., Acedo-Valenzuela, M. I. and Galeano-Díaz, T. 2013. New reversed phase dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil by rapid resolution liquid chromatography with ultraviolet-visible and mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. A.* 1313: 291–301.
- Godoy-Caballero, M. D. P., Acedo-Valenzuela, M. I. and Galeano-Díaz, T. 2012a. Simple quantification of phenolic compounds present in the minor fraction of

- virgin olive oil by LC-DAD-FLD. *Talanta*. 101: 479–87.
- Godoy-Caballero, M. D. P., Acedo-Valenzuela, M. I., Durán-Merás, I. and Galeano-Díaz, T. 2012b. Development of a non-aqueous capillary electrophoresis method with UV-visible and fluorescence detection for phenolics compounds in olive oil. *Anal. Bioanal. Chem.* 403: 279–90.
- Godoy-Caballero, M. D. P., Galeano-Díaz, T. and Acedo-Valenzuela, M. I. 2012c. Simple and fast determination of phenolic compounds from different varieties of olive oil by nonaqueous capillary electrophoresis with UV-visible and fluorescence detection. *J. Sep. Sci.* 35: 3529–39.
- Gómez-Caravaca, A. M., Carrasco Pancorbo, A., Cañabate Díaz, B., Segura Carretero, A. and Fernández Gutiérrez, A. 2005. Electrophoretic identification and quantitation of compounds in the polyphenolic fraction of extra-virgin olive oil. *Electrophoresis*. 26: 3538–51.
- Gómez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. and Lercker, G. 2007. Effect of filtration systems on the phenolic content in virgin olive oil by HPLC-DAD-MSD. *Am. J. Food Technol.* 2: 671–678.
- Gómez-Rico, A., Salvador, M. D., La Greca, M. and Fregapane, G. 2006. Phenolic and Volatile Compounds of Extra Virgin Olive Oil ( *Olea europaea* L. Cv. Cornicabra ) with Regard to Fruit. *J. Agric. Food Chem.* 54: 7130–7136.
- Hrncirik, K. and Fritsche, S. 2004. Comparability and reliability of different techniques for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106: 540–549.
- International Olive Council. 2009. Determination of biophenols in olive oils by HPLC. COI/T.20/Doc No 29.
- Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E. and Magiatis, P. 2012. Direct measurement of oleocanthal and oleacein levels in olive oil by quantitative (1)H NMR. Establishment of a new index for the characterization of extra virgin olive oils. *J. Agric. Food Chem.* 60: 11696–703.
- Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E. and Magiatis, P. 2014. Quantitative Measurement of Major Secoiridoid Derivatives in Olive Oil Using qNMR. Proof of the Artificial Formation of Aldehydic Oleuropein and Ligstroside Aglycon Isomers. *J. Agric. Food Chem.* 62: 600–607.
- Laura Capriotti, A., Cavaliere, C., Crescenzi, C., Foglia, P., Nescatelli, R., Samperi, R. and Laganà, A. 2014. Comparison of extraction methods for the identification and quantification of polyphenols in virgin olive oil by ultra-HPLC-QToF mass spectrometry. *Food Chem.* 158: 392–400.
- Lerma-García, M. J., Lantano, C., Chiavaro, E., Cerretani, L., Herrero-Martínez, J. M. and Simó-Alfonso, E. F. 2009. Classification of extra virgin olive oils according to their geographical origin using phenolic compound profiles obtained by capillary electrochromatography. *Food Res. Int.* 42: 1446–1452.
- Liberatore, L., Procida, G., D'Alessandro, N. and Cichelli, A. 2001. Solid-phase extraction and gas chromatographic analysis of phenolic compounds in virgin olive oil. *Food Chem.* 73: 119–124.
- Lozano-Sánchez, J., Cerretani, L., Bendini, A., Gallina-Toschi, T., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2012. New filtration systems for extra-virgin olive oil: effect on antioxidant compounds, oxidative stability, and physicochemical and sensory properties. *J. Agric. Food Chem.* 60: 3754–62.
- Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Menendez, A. J., Oliveras-Ferraro, C., Cerretani, L. and Fernández-Gutiérrez, A. 2010. Prediction of Extra Virgin Olive Oil Varieties through Their Phenolic Profile. Potential Cytotoxic Activity against Human Breast Cancer Cells. *J. Agric. Food Chem.* 58: 9942–9955.
- Mateos, R., Espartero, L., Trujillo, M., Rı, J. J. and Leo, 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. *J. Agric. Food Chem.* 49: 2185–2192.
- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., Miniati, E., Agrarie, I. and Costanzo, V. S. 1992. Simple and Hydrolyzable Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. 1. Their Extraction, Separation, and Quantitative and Semiquantitative Evaluation by HPLC. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1571–1576.
- Motilva, M. J., Tovar, M. J., Romero, M. P., Alegre, S. and Girona, J. 2000. Influence of regulated deficit irrigation strategies applied to olive trees ( *Arbequina* cultivar ) on oil yield and oil composition during the fruit ripening period. *J. Sci. Food Agric.* 80: 2037–2043.
- Ouni, Y., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. and Zarrouk, M. 2011. Characterisation and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils according to their geographical origin by a rapid and resolute LC-ESI-TOF MS method. *Food Chem.* 127: 1263–7.
- Parenti, A., Spugnoli, P., Masella, P. and Calamai, L. 2008. The effect of malaxation temperature on the virgin olive oil phenolic profile under laboratory-scale conditions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110: 735–741.
- Pirisi, F. M., Cabras, P., Cao, C. F., Migliorini, M. and Muggelli, M. 2000. Phenolic compounds in virgin olive oil. 2. Reappraisal of the extraction, HPLC separation, and quantification procedures. *J. Agric. Food Chem.* 48: 1191–1196.
- Pizarro, M. L., Becerra, M., Sayago, A., Beltrán, M. and

- Beltrán, R. 2013. Comparison of Different Extraction Methods to Determine Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil. *Food Anal. Methods*. 6: 123–132.
- Purcaro, G., Codony, R., Pizzale, L., Mariani, C. and Conte, L. 2014. Evaluation of total hydroxytyrosol and tyrosol in extra virgin olive oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 116: 805–811.
- Ríos, J. J., Gil, M. J. and 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. *J. Chromatogr. A*. 1093: 167–176.
- Rotondi, A., Bendini, A., Cerretani, L., Mari, M., Lercker, G. and Toschi, T. G. 2004. Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. Nostrana di Brisighella extra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3649–54.
- Saitta, M., Curto, S. Lo, Salvo, F., Bella, G. D. and Dugo, G. 2002. Gas chromatographic–tandem mass spectrometric identification of phenolic compounds in Sicilian olive oils. *Anal. Chim. Acta*. 466: 335–344.
- Selvaggini, R., Servili, M., Urbani, S., Esposito, S., Taticchi, A. and Montero, G. F. 2006. Evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil by direct injection in high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *J. Agric. Food Chem.* 54: 2832–2838.
- Servili, M., Montedoro, G. F. and Hammami, M. 2010. Effect of three irrigation regimes on Arbequina olive oil produced under Tunisian growing conditions. *Agric. Water Manag.* 97: 763–768.
- Taamalli, A., Abaza, L., Arráez Román, D., Segura Carretero, A., Fernández Gutiérrez, A., Zarrouk, M. and Nabil, B. Y. 2013. Characterisation of phenolic compounds by HPLC-TOF/IT/MS in buds and open flowers of “Chemlali” olive cultivar. *Phytochem. Anal.* 24: 504–512.
- Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Zarrouk, M., Segura-Carretero, A. and Fernández-Gutiérrez, A. 2010. Determination of apolar and minor polar compounds and other chemical parameters for the discrimination of six different varieties of Tunisian extra-virgin olive oil cultivated in their traditional growing area. *Eur. Food Res. Technol.* 231: 965–975.
- Tena, N., García-González, D. L. and Aparicio, R. 2009. Evaluation of Virgin Olive Oil Thermal Deterioration by Fluorescence Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* 57: 10505–10511.
- Vichi, S., Cortés-Francisco, N. and Caixach, J. 2013. Insight into virgin olive oil secoiridoids characterization by high-resolution mass spectrometry and accurate mass measurements. *J. Chromatogr. A*. 1301: 48–59.
- Zafra-Gómez, A., Luzón-Toro, B., Jiménez-Díaz, I., Ballesteros, O. and Navalón, A. 2010. Quantification of phenolic antioxidants in rat cerebrospinal fluid by GC-MS after oral administration of compounds. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 53: 103–108.

# Variabilidad del rendimiento agronómico de la descendencia obtenida por cruzamientos de 'Chemlali de Sfax', una variedad local de olivo (*Olea europaea* L.) utilizada para aceite

F. Ben Amar\*, M. Mezghani-Aiachi, A. Yengui, H. Belguith,  
S. Harrab, M. K. Hergli

Institut de l'Olivier – Route de l'aéroport Km 1,5 – BP 1087 – 3000 Sfax (Túnez)

\*Autor para correspondencia: fathi.benamar@iresa.agrinet.tn

## Resumen

El estudio de algunos parámetros agronómicos de la descendencia obtenida por cruzamientos de la variedad local de aceituna 'Chemlali de Sfax' ha puesto de relieve una variabilidad bastante grande. Dicha descendencia consta de 145 genotipos obtenidos de cruzamientos de 'Chemlali de Sfax' con varios genitores locales y extranjeros, principalmente de la variedad italiana 'Coratina' (90). La producción anual de aceitunas de los genotipos ha variado entre los 1,9 kg de 2010 y los 9 kg de 2005, con una gran variabilidad intraanual. La producción media por cruzamiento varía entre 3,35 kg ('Chemlali' x 'Sigoise') y 4,86 kg ('Chemlali' x 'Souri'), con una variabilidad menos importante que la anual. El índice de vecería es elevado y varía entre 0,71 ('Chemlali' x 'Souri') y 0,87 ('Arbequina' x 'Chemlali'), presentando poca variación en cada cruzamiento. Por lo que respecta al porte del árbol, el 90 % de los genotipos tiene un porte abierto (55 %) o erguido (35 %) mientras que el porte llorón tiene poca representación (10 %). La descendencia procedente de los cruzamientos entre 'Chemlali de Sfax' y 'Coratina' se caracteriza por un porcentaje netamente más elevado de árboles con porte llorón relativo al conjunto de los genotipos (26 %). El estado (productivo o vegetativo) de los genotipos varía según el año y el estado productivo a lo largo de dos años consecutivos es más elevado entre los genotipos obtenidos de 'Chemlali de Sfax' y 'Coratina' (58 %) que en el conjunto (17,5 %).

## Abstract

Study of a number of agronomic parameters in a collection of hybrids of the local 'Chemlali Sfax' olive variety revealed considerable variability. The collection contains 145 hybrids of 'Chemlali Sfax' obtained from several local and foreign genitors, in particular the Italian 'Coratina' variety (90). The annual crop production of the collection varied from 1.9 kg in 2010 to 9 kg in 2005 and showed wide intra-annual variability. Average production per cross varied between 3.35 kg ('Chemlali'/'Sigoise') and 4.86 kg ('Chemlali'/'Souri'), thus recording smaller variability than annual production. The alternate bearing index was high, ranging from 0.71 ('Chemlali'/'Souri') to 0.87 ('Arbequina'/'Chemlali'), and showed little variability within each cross. The growth habit of the hybrids in the collection was spreading (55%) or erect (35%) in 90% of the cases and drooping in only 10%. The hybrids obtained by crossing 'Chemlali Sfax' and 'Coratina' were characterised by a higher percentage of trees with a drooping growth habit (26%) compared with the collection as a whole. Hybrid tree status (on-crop or off-crop) differed according to year. The percentage of 'Chemlali Sfax'/'Coratina' hybrids with on-crop status in two consecutive years (58%) was higher than in the collection as a whole (17.5%).

## Introducción

El cruzamiento dirigido es relativamente reciente en el olivo y data de la segunda mitad del siglo pasado. Esta técnica se ha utilizado en Israel para obtener variedades capaces de adaptarse a condiciones de cultivo de lujo y a una industria intensiva y rentable (Lavee *et al.*, 2003). Los trabajos llevados a cabo han permitido obtener algunas variedades nuevas: ‘Kadesh’ (Lavee, 1978), ‘Barnea’ (Lavee *et al.*, 1986), ‘Maalot’ (Lavee *et al.*, 1999), ‘Askal’ (Lavee *et al.*, 2003), ‘Kadeshon’, ‘Sepoka’ y ‘Masepo’ (Lavee *et al.*, 2004).

En España, un programa de cruzamiento iniciado a partir de 1991 ha consistido en la realización de cruza- mientos recíprocos con el objetivo de reducir el periodo juvenil y mejorar la producción de aceitunas así como el rendimiento graso de la aceituna. Recientemente, se ha seleccionado una nueva variedad (‘Chiquitita’) (Rallo *et al.*, 2008).

Esta técnica también se ha empleado en China para intentar seleccionar variedades adaptadas a las condi- ciones edafoclimáticas del país a raíz del fracaso de la experimentación con variedades introducidas desde el Mediterráneo (Fontanazza y Baldoni, 1990). Así, se han obtenido nuevos cultivares resistentes al frío (Gu Ying *et al.*, 1984).

En Italia, un programa de mejora genética iniciado en 1971 a partir de cruzamientos controlados ha dado lugar a la obtención de 5000 genotipos (Bellini *et al.*, 2000 a). Basándose en criterios de vigor, productividad y calidad del fruto, los trabajos de selección han dado como resultado nuevos cultivares de doble uso: ‘Arno’, ‘Tevere’ y ‘Basento’ (Bellini *et al.*, 2000 b).

En Francia, a raíz de un programa de selección de plantas de semillas procedentes de cruzamientos no controlados se ha inscrito en 1998 una nueva variedad en el Catálogo oficial de especies y variedades frutales: ‘Moncita’ (www.Olivettes.fr), que se caracteriza por un periodo de improductividad reducido y una buena ca- lidad del aceite.

En los países del Sur del Mediterráneo, el Consejo Oleícola Internacional inició un programa de mejora genética por cruzamientos dirigidos en 1993 en el que participaron cinco países mediterráneos, entre ellos Túnez y Marruecos (Trigui y Msallem, 2002). En Ma- rruecos, el estudio de la descendencia obtenida ha per- mitido seleccionar cinco cultivares con un buen rendi- miento (Ministerio de Agricultura, 2013).

En Túnez, entre 1993 y 1996, este programa se centró en las variedades más cultivadas, a saber: ‘Chemlali de

Sfax’, ‘Chétoui’ y ‘Meski’. La variedad para aceite ‘Che- mlali de Sfax’ se caracteriza por su vigor, su adaptación a diferentes medios y su productividad (Trigui, 1996). Sin embargo, tiene problemas relacionados con la compo- sición en ácidos grasos de su aceite: bajo contenido de ácido oleico y alto contenido de ácido palmítico (Grati- Kamoun y Khlif, 2001). El cruzamiento de esta variedad tiene por objeto la obtención de nuevos genotipos con una buena composición en ácidos grasos, preservando al mismo tiempo las buenas cualidades de esta variedad.

Desde 1997, los genotipos obtenidos se plantan en dos ubicaciones en la región de Sfax: la estación del Instituto de «Taous» y en la sede del Instituto del Oli- vo (IO). En primer lugar, se llevó a cabo una selección preliminar de una centena de genotipos en función de su contenido de ácido oleico (> 65 %) (IO, 2005), tras lo cual se ha emprendido un trabajo de caracterización con vistas a una selección final.

En el presente documento, nos proponemos presen- tar ciertos aspectos del rendimiento agronómico de es- tos genotipos, relativos al porte del árbol, su estado y su producción.

## Material y métodos

El material vegetal de este estudio está compuesto por 145 genotipos plantados en la sede del Instituto del Olivo de Sfax (Túnez) con las siguientes coordenadas geográ- ficas: latitud 34° 44’ 02” Norte; longitud 10° 43’ 59” Este; altitud 6 m. El cruzamiento de la variedad ‘Chemlali de Sfax’ se llevó a cabo con diferentes variedades locales e introducidas.

Los árboles se plantaron con una densidad de 1250 oli- vos/hectárea, esto es, con un marco de plantación de 2 m x 4 m, y en régimen de riego localizado.

Se estudiaron los parámetros siguientes:

- La producción de aceitunas, en kg por genotipo, se anotó en noviembre de cada año durante el periodo 2005-2013. De este modo, se calculó la producción media anual de toda la descendencia y la producción por cruzamiento a lo largo de todo el periodo de se- guimiento.
- El índice de vecería a lo largo de todo el periodo de seguimiento se calculó con la fórmula de Hoblyn *et al.* (1936) para cada cruzamiento.
- El porte del árbol se anotó en noviembre como er- guido, abierto o llorón según las normas del COI (1997).

- El estado del árbol se siguió durante dos años consecutivos y se calificó como productivo o vegetativo.

Los datos registrados se presentan para toda la descendencia y para cada cruzamiento. Cada media se presenta con la desviación típica y la variabilidad de cada media se mide con el coeficiente de variación ( $[\text{desviación típica}/\text{media}] \times 100$ ).

## Resultados y discusión

### Inventario de la descendencia

El Instituto del Olivo alberga en total 145 genotipos obtenidos de 13 cruzamientos diferentes (tabla 1). Aparte de los dos genotipos que proceden de la polinización libre de la variedad ‘*Chemlali de Sfax*’, en el resto de los cruzamientos han intervenido varios genitores de países mediterráneos, concretamente de

Francia (‘*Picholine*’ y ‘*Lucques*’), del Líbano (‘*Souri*’), de Argelia (‘*Sigoise*’), de Túnez (‘*Chemchali*’ y ‘*Sig 4*’), de España (‘*Arbequina*’ y ‘*Manzanilla*’) y de Italia (‘*Coratina*’).

El 62% de los genotipos proviene del cruzamiento de ‘*Chemlali de Sfax*’ y ‘*Coratina*’ y su recíproco. Este número representa un porcentaje importante en este programa de cruzamiento debido a las buenas aptitudes florales y tecnológicas de la variedad ‘*Coratina*’. En este sentido, Al-Kasasbeh *et al.* (2005) observan que esta variedad presenta buenas características polínicas y florales puesto que muestra tasas elevadas de flores perfectas, de granos de polen por flor y de flores fértiles por polinización cruzada. Por otra parte, Zarrrouk *et al.* (2009) demuestran que el aceite de ‘*Coratina*’ tiene una composición en ácidos grasos equilibrada, ya que presenta un alto contenido de ácido oleico (70%) y un contenido bastante bajo de ácido palmítico (9%). Cabe esperar una selección eficaz de genotipos de este cruzamiento.

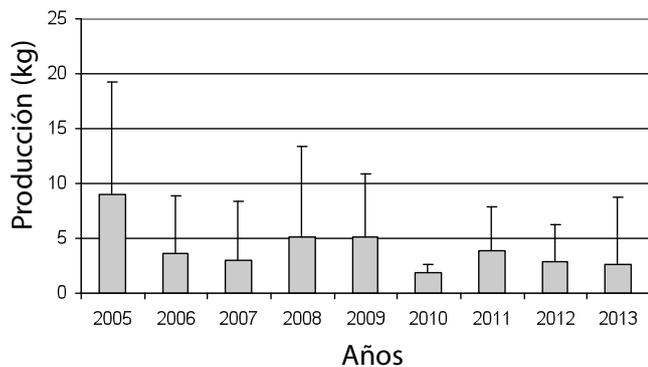
**Tabla 1. Distribución de los genotipos obtenidos por cruzamiento albergados en el Instituto del Olivo**

| Cruzamiento               | Número de genotipos |
|---------------------------|---------------------|
| ‘Arbequina’ x ‘Chemlali’  | 6                   |
| ‘Chemlali’ x ‘Arbequina’  | 2                   |
| ‘Chemlali’ x ‘Coratina’   | 84                  |
| ‘Coratina’ x ‘Chemlali’   | 6                   |
| ‘Chemlali’ x ‘Lucques’    | 8                   |
| ‘Chemlali’ x ‘Sigoise’    | 13                  |
| ‘Chemlali’ x ‘Souri’      | 17                  |
| ‘Koroneiki’ x ‘Chemlali’  | 3                   |
| ‘Chemlali Libre’          | 2                   |
| ‘Chemlali’ x ‘Manzanilla’ | 1                   |
| ‘Chemlali’ x ‘Picholine’  | 1                   |
| ‘Chemlali’ x ‘Sig 4’      | 1                   |
| ‘Chemlali’ x ‘Chemchali’  | 1                   |
| Total                     | 145                 |

## Producción anual de aceitunas

La producción anual de aceitunas de los genotipos ha sufrido variaciones importantes, con un mínimo de 1,9 kg en 2010 y un máximo de 9 kg en 2005 (figura 1). Cada año, constatamos una gran variabilidad entre los genotipos, ya que el coeficiente de variación alcanzó más del 200 % en 2013. La variabilidad in-

traanual denota un comportamiento productivo bastante diversificado entre los genotipos que puede permitir una selección eficaz en términos de productividad en las condiciones de manejo de la parcela. Por otra parte, la variabilidad interanual puede indicar una tendencia a la vecería. Se debe prestar una atención especial a este criterio durante la selección final de los genotipos.

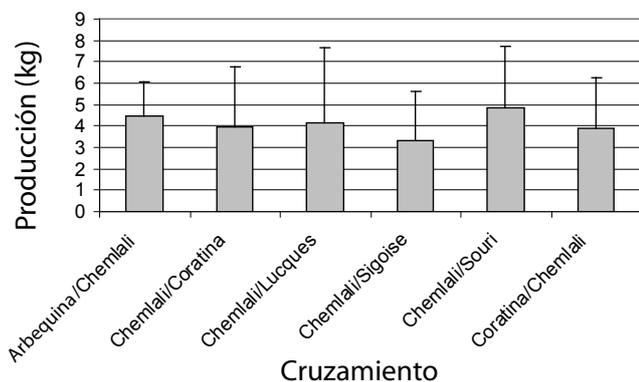


**Figura 1:** Producción de aceitunas de los genotipos por año (barra horizontal = desviación típica)

## Producción de aceitunas por cruzamiento

La producción media por cruzamiento se calculó en seis cruzamientos que cuentan con más de tres genotipos (figura 2). Este criterio es menos variable que el de la producción anual, ya que los valores oscilan entre 3,35 kg (*'Chemlali'* x *'Sigoise'*) y 4,86 kg (*'Chemlali'* x *'Souri'*). La variabilidad entre los genotipos de cada cruzamiento es asimismo menor que la anual, ya que el coeficiente de variación máximo es del 83,7 %. La variabilidad constatada permitirá efectuar una selección eficaz de genotipos procedentes de la mayoría de los cruzamientos.

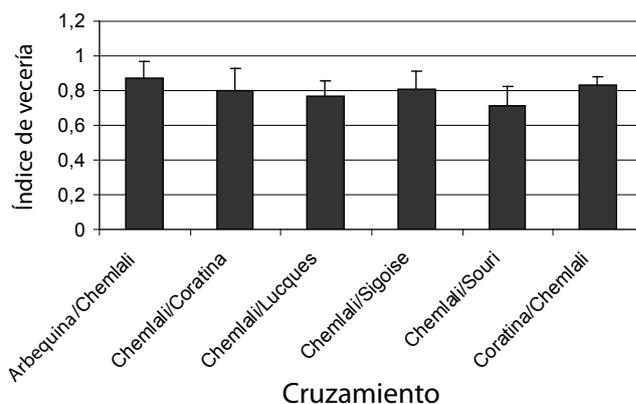
Observamos que la producción es prácticamente la misma en los cruzamientos recíprocos entre *'Chemlali de Sfax'* y *'Coratina'*. Esta constatación puede indicar que el determinismo genético del carácter de la producción es independiente del genitor en el cruzamiento. De este modo, la selección orientada a la producción de aceitunas puede ser eficaz en los dos cruzamientos recíprocos.



**Figura 2:** Producción de aceitunas de los genotipos por cruzamiento (barra horizontal = desviación típica)

## Vecería

Se ha estudiado el índice de vecería en los mismos seis genotipos (figura 3). Este índice varía muy poco entre los cruzamientos pero es bastante elevado, ya que los valores fluctúan entre 0,71 (*'Chemlali'* x *'Souri'*) y 0,87 (*'Arbequina'* x *'Chemlali'*). La variabilidad entre los genotipos de cada cruzamiento también es bastante baja, puesto que el coeficiente de variación máximo es del 16,2 %. Estos resultados demuestran que el conjunto de genotipos estudiado presenta un fenómeno de vecería estricta en las condiciones del estudio. Esto supone que la selección de genotipos productivos vendrá acompañada por un alto grado de vecería. Esta vecería entre los genotipos puede tener por causa la variedad objeto del programa de mejora: *'Chemlali de Sfax'*, conocida, según Trigui y Msallem (2002), por este fenómeno.



**Figura 3:** Índice de vecería de los genotipos por cruzamiento (barra horizontal = desviación típica)

## Porte del árbol

Como muestra la figura 4, cerca del 90 % de los genotipos tiene un porte abierto (55 %) o erguido (35 %). El porcentaje de árboles con porte llorón es muy bajo, de tan solo el 10 %. El porcentaje más elevado de árboles con porte abierto (45 %) se observa en los genotipos procedentes de cruzamientos entre *'Chemlali de Sfax'* y *'Coratina'*, aunque este sigue siendo más bajo que en el conjunto (figura 5). El porcentaje de estos genotipos con porte erguido es similar al del conjunto (29 %). Sin embargo, constatamos que la tasa de porte llorón de este grupo de genotipos es netamente superior a la del conjunto (26 %).

La predominancia del porte abierto en los dos casos recuerda al porte de la variedad 'Chemlali de Sfax' mencionado por Barranco *et al.* (2000) y Trigui y Msallem (2002). Según Barranco *et al.* (2000), el hecho de que los genotipos tengan el porte erguido puede deberse a los genitores utilizados, como 'Souri' y 'Lucques'. Por otra parte, el porcentaje de árboles con porte llorón es significativamente más elevado en los cruzamientos de 'Chemlali de Sfax' y 'Coratina', lo cual puede indicar un determinismo genético muy particular en las dos variedades. Por tanto, deberá llevarse a cabo un estudio genético y molecular de los dos genitores y de sus genotipos para dilucidar este determinismo. Los resultados de este estudio serán muy útiles para la selección de variedades de porte llorón en los programas de mejora genética del olivo. Estas variedades son muy codiciadas actualmente para el cultivo superintensivo del olivo, que, según Tombesi (2013), gana cada vez más terreno en los olivares de todo el mundo. Entre los genotipos obtenidos, la selección se puede efectuar para los diferentes tipos de porte.

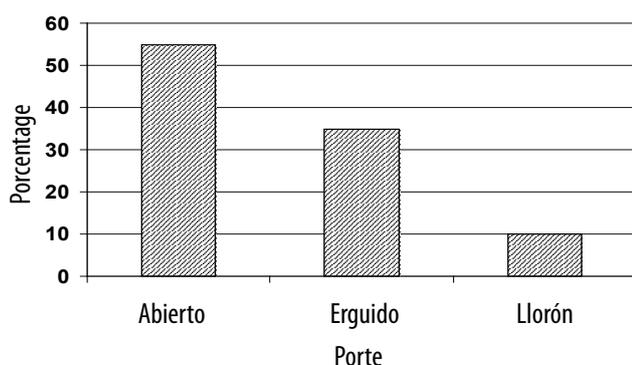


Figura 4: Variabilidad del porte en los genotipos

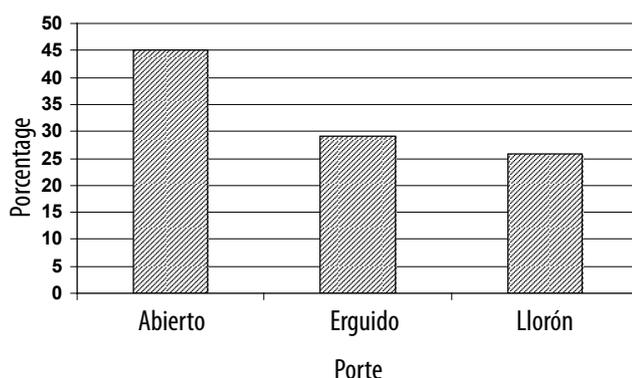


Figura 5: Variabilidad del porte en los genotipos procedentes de cruzamientos entre 'Chemlali de Sfax' y 'Coratina'

## Estado del árbol

La tabla 2 muestra que el comportamiento de los genotipos obtenidos durante el primer año es, por lo general (72 %), no productivo. Por el contrario, los genotipos procedentes del cruzamiento de las varie-

dades 'Chemlali de Sfax' y 'Coratina' presentan mayoritariamente un estado productivo (58 %). A lo largo del segundo año, la mitad de todos los genotipos y la totalidad de los genotipos de los cruzamientos de 'Chemlali de Sfax' y 'Coratina' se encuentran en estado productivo. Por consiguiente, los genotipos en producción durante los dos años representan solo el 17,5 % del conjunto y el 58 % del grupo procedente de las variedades 'Chemlali de Sfax' y 'Coratina'.

Estos valores confirman la presencia del fenómeno de la vejería constatado en este conjunto de genotipos. Sin embargo, este fenómeno es menos visible en los genotipos procedentes de los cruzamientos de 'Chemlali de Sfax' y 'Coratina'. La selección en términos de vejería será más eficaz con los genotipos de las dos variedades 'Chemlali de Sfax' y 'Coratina' que en el resto de los cruzamientos.

Tabla 2. Estado de los árboles de los genotipos, en porcentaje, a lo largo de dos años sucesivos

| Material vegetal                                  | Estado     | Año 1 | Año 2 | 2 años |
|---|------------|-------|-------|--------|
| Conjunto de genotipos                             | Vegetativo | 72    | 48    |        |
|   | Productivo | 28    | 52    | 17.5   |
| Cruzamiento entre 'Chemlali de Sfax' y 'Coratina' | Vegetativo | 42    | 0     |        |
|   | Productivo | 58    | 100   | 58     |

## Conclusión

Del presente estudio de los parámetros agronómicos de la descendencia obtenida por cruzamiento de la variedad 'Chemlali de Sfax', se deduce que la selección en función de estos parámetros es prometedora. Por otra parte, los trabajos llevados a cabo desde 2005 han permitido realizar una selección preliminar de genotipos que son objeto de una evaluación final. Para un futuro próximo, se prevé registrar ciertos genotipos en el Catálogo nacional de variedades.

## Referencias

Al-Kasasbeh M.F., Atteyyeh A.F., Qrunfleh M.M., 2005. A study on self and cross-pollination of three olive varieties in Jordan. *Dirasat Agricultural sciences* 32 (2): 222-227.

- Bellini E., Giordani E., Parlati M.V., Pandolfi S., 2000 a. Olive genetic improvement: Thirty years of research. *Acta Horticulturae* 586: 105-108.
- Bellini E., Giordani E., Parlati M.V., 2000 b. Three new olive cultivars obtained by cross breeding. *Acta Horticulturae* 586: 221-223.
- COI, 1997. Méthodologie pour la caractérisation primaire et secondaire des variétés d'olivier. Projet RES-GEN-CT (96/97). Union européenne-COI.
- COI, 2000. Catalogue mondial des variétés d'olivier. Barranco D., Cimato A., Fiorino P., Rallo L., Touzani A., Castañeda C., Serafini F., Trujillo I., 360 p illustrées. Fontanazza G., Baldoni L., 1990. Proposition pour un programme d'amélioration génétique de l'olivier. *Olivae* 34 : 32-40.
- Grati-Kamoun N., Khelif M., 2001. Caractérisation technologique des variétés d'olivier cultivées en Tunisie. *Revue Ezzitouna* (numéro spécial). 69 p.
- IO, 2005. Rapport d'activité de l'Institut de l'Olivier pour l'année 2005.
- Lavee S. 1978. Kadash table olive. *HortScience* 131 (1): 62-63.
- Lavee S., Haskal A., Wodner M. 1986. « Barnea »: a new olive cultivar from first breeding generation. *Olea* 17: 95-99.
- Lavee S., Harshemesh H., Haskal A., Meni Y., Wodner M., Ogorodovich A., Avidan B., Wiesman Z., Avidan N., Trapero-Casus A. 1999. « Maalot », un nouveau cultivar résistant à l'œil de paon (*Spilocaea oleagina*, cast). *Olivae* 78 : 51-59.
- Lavee S., Avidan B., Meni Y. 2003. « Askal » : une nouvelle variété performante d'olivier à huile pour les oliveraies intensives et super-intensives. *Olivae* 97 : 53-59.
- Lavee S., Avidan B., Meni Y., Haskal A., Wodner M. 2004. Trois nouvelles variétés d'olivier demi-naines pour la table. *Olivae* 102 : 33-41.
- Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime. 2013. Veille économique du secteur oléicole. Note stratégique n° 95. Septembre 2013. 14 p.
- Rallo L., Barranco D., De La Rosa L., Leon L. 2008. Chiquitita olive. *HortScience* 43: 529-531.
- Trigui A. 1996. L'amélioration quantitative et qualitative de la production oléicole en Tunisie : l'incontournable nécessité et les perspectives de l'identification et de l'amélioration génétique de l'olivier. *Olivae* 61 : 34-40.
- Trigui A., et Msallem M. 2002. Catalogue des variétés autochtones et types locaux, 159 p.
- Tombesi A. 2013. Advances in harvesting and pruning of olive trees. *La Rivista di Scienza dell'Alimentazione*. 42 (1): 97-103.
- Ying G., Shu-zhi H., Ziu-jun S., Hui-chan B, Hou-jun W., Shan-an H., 1984. Studies on variation and selection of olive seedlings for cold resistance. In: Shan-an H, Ying G. (eds): *Olive acclimatation and breeding*.
- Zarrouk W., Baccouri B., Taamalli W., Trigui A., Daoud D., Zarrouk M. 2009. Oil fatty acid composition of eighteen Mediterranean olive varieties cultivated under the arid conditions of Boughrara (southern Tunisia). *Grasas y aceites*. 60 (5): 498-506.
- [www.olivettes.fr/fr/biodiversité/olives.pdf](http://www.olivettes.fr/fr/biodiversité/olives.pdf) (site consulté le 03/02/2015).

# Oleokoronal y oleomisional: nuevos componentes fenólicos principales del aceite de oliva virgen extra

Panagiotis Diamantakos<sup>1</sup>, Angeliki Velkou<sup>2</sup>, K. Brian Killday<sup>3</sup>,  
Thanasis Gimisis<sup>2</sup>, Eleni Melliou<sup>1,4</sup> y Prokopios Magiatis<sup>1,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmacognosia y Química de Productos Naturales, Facultad de Farmacia, Universidad de Atenas, Panepistimiopolis-Zografou, Atenas (Grecia)

<sup>2</sup> Laboratorio de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Atenas, Panepistimiopolis-Zografou, Atenas (Grecia)

<sup>3</sup> Bruker BioSpin, Billerica, Massachusetts (EE. UU.)

<sup>4</sup> Departamento de Fisiología y Biofísica, Universidad de la Commonwealth de Virginia, Richmond, Virginia (EE. UU.)

\* Autor correspondiente. Tel.: (+30) 210 7274052. Dirección de correo electrónico: magiatis@pharm.uoa.gr

## Resumen

El aceite de oliva virgen extra contiene importantes cantidades de componentes fenólicos polares. La inmensa mayoría de estos son ésteres de tirosol o hidroxitirosol con derivados secoiridoides de la oleuropeína o el ligustrósido. En este estudio describimos varias formas de la oleuropeína aglicona y el ligustrósido aglicona nuevas o con una caracterización incompleta. Dos de ellas son formas enólicas estables y se describen por primera vez como verdaderos componentes del aceite de oliva, aunque ya se había postulado su presencia en estos aceites. Para evitar en la medida de lo posible la confusión derivada de la complicada nomenclatura de los isómeros de la aglicona, proponemos los nombres «oleokoronal» y «oleomisional» para ambos componentes. Tras analizar 2000 muestras de aceite de oliva de la mayoría de las principales variedades, pudimos identificar muestras en las que el oleokoronal y el oleomisional fueran los principales componentes fenólicos y que, por tanto, sirvieran como material de partida para su aislamiento. Es interesante advertir que, durante el análisis cromatográfico en fase normal o reversa, ambos compuestos se transformaron en las formas monoaldehídicas conocidas de las agliconas con estructura con anillo cerrado, lo que explica la falta de identificación de dichos compuestos hasta el momento. Su presencia en el aceite de oliva se confirmó con una observación directa mediante RMN sin uso de disolvente.

## Palabras clave

Fenólicos, secoiridoides, ligustrósido aglicona, oleuropeína aglicona, aceite de oliva, RMN.

## Abstract

Extra virgin olive oil contains significant quantities of polar phenolic ingredients. The large majority is made up of esters of tyrosol or hydroxytyrosol with secoiridoid derivatives from oleuropein or ligstroside. In the current study we describe a number of new or incompletely characterized forms of ligstroside and oleuropein aglycons. Two of them which are stable enolic forms are described for the first time as real olive oil ingredients although their presence in olive oil had been postulated. To minimize the confusion with the complicated names of the aglycon isomers we propose the names oleokoronal and oleomissional for the two ingredients. After screening 2000 samples of olive oil from most major varieties we were able to identify samples of olive oil in which oleokoronal

and oleomissional were the major phenolic ingredients and could be used as starting material for their isolation. Interestingly, during normal or reversed phase chromatography both compounds were transformed to the known forms of monoaldehydic closed ring aglycons, which offers an explanation as to why those compounds had not been identified so far. Their real presence in olive oil was confirmed by direct NMR observation without the use of any solvent.

### Key words

phenolics, secoiridoids, ligstroside aglycon, oleuropein aglycon, olive oil, NMR.

## Introducción

La dieta mediterránea tradicional, que es objeto de continuo interés entre la comunidad científica por los beneficios que aporta a la salud, se basa en el consumo diario de aceite de oliva como principal fuente de lípidos. Los derivados fenólicos secoiridoides son uno de los tipos de componentes del aceite de oliva más importantes y presentan un mayor efecto protector sobre la salud. La normativa de la Unión Europea, a través de su Reglamento (UE) n.º 432/2012 basado en la opinión científica de la EFSA, ha permitido recientemente unas declaraciones de propiedades saludables específicas relacionadas con los niveles de determinados compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva.

Los compuestos esenciales responsables de la declaración de propiedades saludables «protección de los lípidos de la sangre frente al daño oxidativo» son el hidroxitirosol (**1**), el tirosol (**2**) y sus derivados. Por este motivo, resulta muy importante obtener unos conocimientos precisos de la identidad química de todos estos componentes y realizar una medición cuantitativa de los mismos en el aceite de oliva. Por el momento, no existe ningún método oficialmente aprobado para la medición de los componentes relacionados con la declaración de propiedades saludables debido a dificultades técnicas sobradamente conocidas. El hidroxitirosol (3,4-DHPEA) y el tirosol (p-HPEA) se encuentran en el aceite de oliva principalmente en las formas esterificadas de la oleaceína (3,4-DHPEA-EDA) (**3**) y el oleocantal (p-HPEA-EDA) (**4**), así como la oleuropeína aglicona (3,4-DHPEA-EA) (**5a**) y el ligustrósido aglicona (p-HPEA-EA) (**6a**), y todos ellos presentan una actividad biológica importante.

Sin embargo, los términos «oleuropeína aglicona» y «ligustrósido aglicona» no cuentan con una definición precisa y a menudo se emplean de manera equívoca. De hecho, existen numerosos posibles isómeros de las agliconas y muchos de ellos no se encuentran correctamente caracterizados. A menudo se hace referencia a los mismos con nombres descriptivos complejos, como: forma hidroxilada, forma monoaldehydica, forma dialdehydica, forma hidratada, anillo abierto, anillo cerrado, forma carboxilada, forma descarboxilada, etc. La ausencia de definiciones precisas y oficiales para los nombres y de unos datos sólidos obtenidos mediante RMN es la causa de varios problemas encontrados en la literatura científica sobre la materia. En este escrito examinamos el aislamiento y la determinación de la estructura química de una serie de formas de la oleuropeína aglicona y el ligustrósido aglicona no descritas previamente y aclaramos los términos y la caracterización mediante RMN de miembros previamente descritos de esta familia de compuestos.

## Materiales y métodos

### Información general

Se compró  $\beta$ -glucosidasa de almendra de Sigma-Aldrich. La oleuropeína se aisló a partir de hojas de olivos silvestres con un elevado contenido de oleuropeína (15 % en el peso en seco), tal como se describió en un estudio anterior (Andreadou *et al.*, 2006). El espectro de RMN se registró con un espectrómetro Avance 700, los desplazamientos químicos se expresaron en ppm y se calibraron los ejes en la señal residual de  $\text{CDCl}_3$ . Se llevó a cabo un análisis cromatográfico en columnas con gel de sílice 60 RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ ) (Merck [Darmstadt, Alemania]). También se llevó a cabo un análisis cromatográfico en capa fina (TLC) con placas recubiertas con gel de sílice 60 F254 RP-18 de Merck con un grosor de 0,25 mm.

### Aceite de oliva

Los compuestos estudiados se aislaron a partir de dos tipos de aceite. El primero fue suministrado por la Cooperativa de Paleopanagia, ubicada en Laconia (Grecia), y se elaboró en noviembre de 2013 a partir de la variedad 'Koroneiki' en una almazara con sistema de tres fases, una temperatura de funcionamiento de 25 °C y un tiempo de malaxación de 30 minutos. El segundo fue suministrado por el olivar Berkeley Olive Grove, ubicado en Oroville (California, EE. UU.), y se elaboró a partir de la variedad 'Mission' en noviembre de 2013.

Otros aceites de oliva utilizados para el análisis procedían de la base de datos de muestras descrita previamente en la literatura científica (Karkoula *et al.*, 2014).

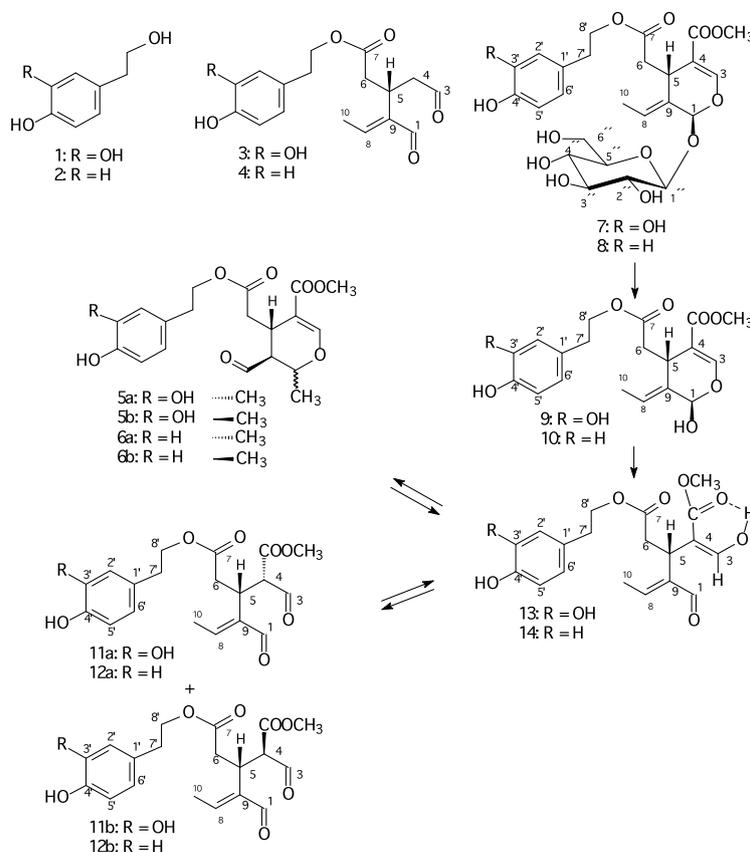
### Extracción y aislamiento

Se procedió a la mezcla del aceite de oliva (100 g) con ciclohexano (400 ml) y acetonitrilo (500 ml), tras lo cual dicha mezcla se homogeneizó y centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. La fase de acetonitrilo se recuperó con una ampolla de decantación y se evaporó a presión reducida mediante un rotavapor. El residuo se sometió

a cromatografía en columna de gel de sílice en fase reversa con acetonitrilo al 100 % para eliminar los lípidos residuales. Todas las fracciones recolectadas libres de lípidos se agruparon, evaporaron y sometieron a TLC preparativa en fase reversa (H<sub>2</sub>O/acetonitrilo con una proporción 60:40), aislándose de esta forma dos zonas: A (2,3 mg, RF = 0,5) y B (3,3 mg, RF = 0,7). La estructura de los compuestos aislados (**figura 1**) se estudió utilizando una combinación de los espectros obtenidos con RMN unidimensional y RMN bidimensional, y los picos asignados se presentan en los **cuadros 1 a 4**.

**Cuadro 1. Datos obtenidos en RMN de H1 para eoleokoronol (14) y los ligustrodiales (12a,b) a una concentración de 3 mg/0,6 ml. Calibración de ejes basada en CDCl<sub>3</sub> = 7,26 ppm.**

|       | 12a (5S,4R)         | 12b (5S,4S)         | 14                   |
|-------|---------------------|---------------------|----------------------|
| 1     | 9,212; d; 2,0       | 9,218; d; 2,0       | 9,225; d; 1,7        |
| 3     | 9,68; d; 2,7        | 9,46; d; 2,7        | 7,386; dd; 12,6; 0,8 |
| 4     | 4,06; dd; 10,5; 2,7 | 4,11; dd; 10,5; 2,7 | -                    |
| 5     | 3,83; m (superp)    | 3,83; m (superp)    | 4,16; ddd (superp)   |
| 6a    | 2,81 (superp)       | 2,82 (superp)       | 2,97; dd; 16,1; 9,6  |
| 6b    | 2,62 (superp)       | 2,58 (superp)       | 2,78; dd; 16,1; 6,3  |
| 8     | 6,70; c; 7,1        | 6,72; c; 7,1        | 6,56; c; 7,1         |
| 10    | 2,055; d; 7,0       | 2,062; d; 7,1       | 2,062; d; 7,0        |
| 3-OH  | -                   | -                   | 11,75; d; 12,6       |
| OCH3  | 3,65; s             | 3,77; s             | 3,75; s              |
| 1'    | 4,20; m             | 4,18; m             | 4,18; m              |
| 2'    | 2,81; m             | 2,81; m             | 2,81; m              |
| 4;8'  | 7,05; d (superp)    | 7,05; d (superp)    | 7,05; d (superp)     |
| 5; 7' | 6,76; d (superp)    | 6,76; d (superp)    | 6,76; d (superp)     |



**Figura 1:** Estructuras de los compuestos estudiados.

### Análisis del aceite de oliva en RMN con extracción

La extracción y el análisis del aceite de oliva se llevaron a cabo siguiendo un método descrito con anterioridad (Karkoula *et al.*, 2014). En resumen, se procedió a mezclar el aceite de oliva (5 g) con ciclohexano (20 ml) y acetonitrilo (25 ml), y la mezcla se homogeneizó con un agitador vórtex durante 30 segundos y se centrifugó a 4000 rpm durante 5 minutos. Parte de la fase de acetonitrilo (25 ml) se recogió, se mezcló con 1 ml de una solución de siringaldehído (0,5 mg/ml) en acetonitrilo y se evaporó a presión reducida mediante un rotavapor. El residuo se disolvió en  $\text{CDCl}_3$  (750  $\mu\text{l}$ ) y un volumen de la solución medido de manera precisa (550  $\mu\text{l}$ ) se transfirió a un tubo de RMN de 5 mm. En general, se obtuvieron 50 barridos en 32 768 puntos de datos sobre una anchura espectral de 0 a 16 ppm, con un tiempo de relajación de 1 segundo y un tiempo de adquisición de 1,7 segundos. Antes de la transformada de Fourier, se aplicó un factor de ponderación exponencial correspondiente a un ensanchamiento de línea de 0,3 Hz. Por medio del software TopSpin (Bruker), se corrigió la fase de los espectros y se llevó a cabo una corrección de la línea base y una integración automática de las señales. En los picos de interés, se realizó una integración precisa de manera manual.

### Análisis del aceite de oliva mediante RMN con pulsos de excitación selectivos sin extracción

600  $\mu\text{l}$  de aceite de oliva se transfirieron a un tubo de RMN de 5 mm sin disolvente deuterado. Los espectros de las muestras no diluidas se obtuvieron con RMN sin estabilización con deuterio, previa fijación de la compensación del campo en el mismo valor que el obtenido para la muestra extraída estabilizada en  $\text{CDCl}_3$ . La secuencia DPGPE se ejecutó mediante un pulso selectivo de refocalización de fase pura RE-BURP de 1,26 ms a 180 grados, permitiendo un ancho de banda de excitación de 4900 Hz desde 14 hasta 7 ppm. Se obtuvieron datos de 16 barridos. Por medio del software TopSpin (Bruker), se corrigió automáticamente la fase de los espectros.

### Síntesis de la oleuropeína aglicona

En un balón de destilación de 25 ml con tampón de acetato (pH = 5,5 ml), se disolvió la oleuropeína (100 mg). Se añadió cloroformo (5 ml) y el sistema bifásico resultante se agitó suavemente. En este sistema se añadió  $\beta$ -glucosidasa (3,4 unidades/mg, 70 mg) y la mezcla de reacción resultante se agitó suavemente a 30 °C durante 20 h o hasta que la TLC (12 % de MeOH en cloruro de metileno) mostró una consunción total de la oleuropeína. Se separó la fase orgánica y la fase acuosa se extrajo con cloroformo (3 x 5 ml). Los extractos orgánicos combinados se lavaron con salmuera (20 ml), se secaron con sulfato sódico, se filtraron y se evaporaron a presión reducida. El producto sin purificar (66 mg, 94 %) se analizó mediante RMN de  $^1\text{H}$ .

## Resultados y discusión

«Oleuropeína aglicona» y «ligustrósido aglicona» son términos que no cuentan con una definición precisa y a menudo se emplean de manera equívoca. Ambos términos se corresponden con un gran número de isómeros que, en muchos casos, no se encuentran descritos correctamente. De hecho, la mayoría de los derivados fenólicos secoiridoides del aceite de oliva proceden de la oleuropeína (7) y el ligustrósido (8), que son los principales secoiridoides presentes en las aceitunas. Durante el triturado y la malaxación necesarios para elaborar aceite de oliva, estos dos componentes entran en contacto con la  $\beta$ -glucosidasa (Koudounas *et al.*, 2015) y se transforman inicialmente en las verdaderas agliconas 9 y 10 correspondientes. Sin embargo, se trata de dos formas inestables que solo se han observado en condiciones muy específicas (Christophoridou y Dais, 2009). Dentro de la matriz del aceite de oliva o, en general, en medios no acuosos, las verdaderas agliconas 9 y 10 no existen y se transforman principalmente, mediante una reorganización, en las formas monoaldehídicas más estables de anillo cerrado 5a y 6a (Limiroli *et al.*, 1995) o en las formas dialdehídicas de anillo abierto. Las formas de anillo cerrado también se han descrito en distintas formas de estereoisómeros, por ejemplo, 5b y 6b, pero también existen otras (Pérez Trujillo *et al.*, 2010). Como acabamos de mostrar, las formas de anillo cerrado de la oleuropeína aglicona y el ligustrósido aglicona con mayor presencia en el aceite de oliva se encuentran en las formas 5a y 6a, mientras que el resto de estereoisómeros aumenta de manera artificial durante la purificación o el análisis cromatográfico (Karkoula *et al.*, 2014) y normalmente se encuentra en proporciones muy bajas o está totalmente ausente.

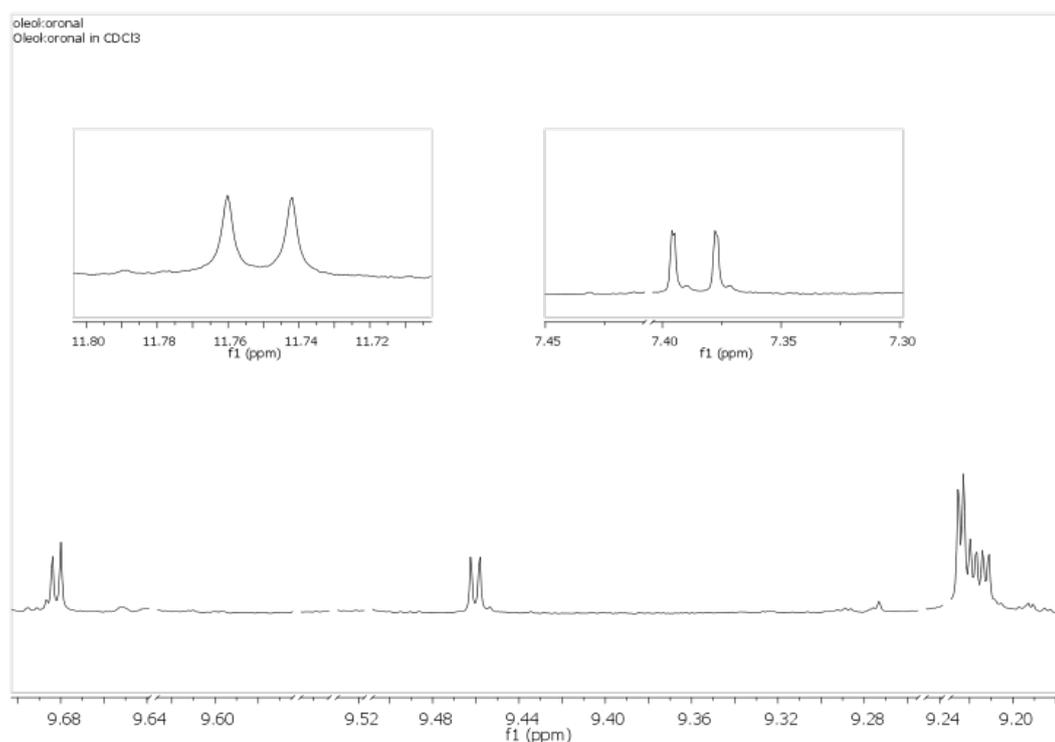
Recientemente hemos publicado una metodología para observar y cuantificar las formas monoaldehídicas de anillo cerrado 5a y 6a mediante RMN cuantitativa, junto con la oleaceína (3) y el oleocantal (4) (Karkoula *et al.*, 2012; Karkoula *et al.*, 2014). Durante la aplicación de esta metodología a 2000 muestras de aceite de oliva obtenidas a partir de diferentes variedades en distintas condiciones de producción, pudimos observar en varios casos una serie de picos correspondientes a protones aldehídicos que no se correspondían con ninguna estructura descrita pero que, provisionalmente, relacionamos con los isómeros de la oleuropeína aglicona y el ligustrósido aglicona. Cabe señalar que, en algunas muestras de aceites de oliva, dichos picos se corresponden con componentes fenólicos principales. Por este motivo, decidimos aislar los componentes desconocidos y caracterizar su estructura utilizando como material de partida dos aceites de oliva específicamente seleccionados a partir de las variedades 'Koroneiki' y 'Mission'.

Sorprendentemente, todos los esfuerzos iniciales por aislar los componentes mediante cromatografía en columna o capa fina, tanto en fase normal como reversa, dieron como resultado únicamente las estructuras **5a,b** y **6a,b** conocidas, aunque el análisis mediante RMN únicamente mostró pequeñas concentraciones de estas estructuras en el aceite original. Basándonos en esta observación, asumimos que los componentes desconocidos eran estructuras que se transformaban en **5a,b** y **6a,b** durante la purificación. Un nuevo examen detallado de las dos zonas obtenidas en la TLC

(A y B) reveló la presencia de un pequeño remanente de la forma inicial idéntico al observado en el extracto de aceite de oliva antes de la purificación. El análisis con RMN de las zonas citadas mostró la presencia, en cada caso, de una mezcla inseparable de tres compuestos. Debido a la imposibilidad de separar la mezcla y a su transformación durante los intentos de purificación, la estudiamos como mezcla con experimentos adicionales de RMN bidimensional a fin de determinar la estructura de cada compuesto y atribuir los picos observados (**cuadros 1 a 4**).

**Cuadro 2: Datos obtenidos en RMN de C13 para eloleokoronal (14) y los ligustrodiales (12a,b) a una concentración de 3 mg/0,6 ml. Calibración de ejes basada en  $\text{CDCl}_3 = 177,16 \text{ ppm}$ .**

|        | 12a (5S,4R) | 12b (5S,4S) | 14     |
|--------|-------------|-------------|--------|
| ,1     | 194,75      | 194,56      | 194,88 |
| ,3     | 195,72      | 195,08      | 164,23 |
| ,4     | 60,27       | 59,30       | 103,33 |
| ,5     | 31,42       | 31,42       | 29,95  |
| ,6     | 34,52       | 34,98       | 35,61  |
| ,7     | 172,07      | 171,33      | 171,98 |
| ,8     | 156,11      | 155,74      | 153,53 |
| ,9     | 142,40      | 141,87      | 142,68 |
| ,10    | 15,20       | 15,20       | 15,20  |
| ,11    | 168,18      | 168,55      | 172,18 |
| ,OCH3  | 52,38       | 52,61       | 51,59  |
| ,1'    | 65,24       | 65,24       | 65,24  |
| ,2'    | 34,02       | 34,02       | 34,02  |
| ,3'    | 129,88      | 129,88      | 129,95 |
| ,4',8' | 130,03      | 130,03      | 130,05 |
| ,5',7' | 115,29      | 115,29      | 115,29 |
| ,6'    | 154,13      | 154,13      | 154,13 |



**Figura 2:** Espectro obtenido con RMN de H1 de la región aldehídica y olefínica de la mezcla de oleokoronal y 4S/4R-ligustrodial.

La determinación de la estructura reveló que el principal componente de cada mezcla era una forma monoaldehídica de anillo abierto, mientras que los otros dos se correspondían con las formas dialdehídicas de anillo abierto. La proporción entre los tres compuestos, determinada mediante la integración de los tres protones aldehídicos a 9,21-9,22 ppm para la zona A, fue de 2:1:1 (**figura 2**). La primera mezcla de los tres compuestos de la zona A mostró las señales características de la fracción de tirosol, mientras que la segunda mezcla, de la zona B, mostró las señales características de la fracción de hidroxitirosol. Tras llevar a cabo experimentos de correlación heteronuclear (HSQC y HMBC) y homonuclear (COSY y TOCSY) pudimos asignar todos los picos de los tres compuestos a cada mezcla. Todos los compuestos presentaron los picos característicos de un metilo fijado a un enlace doble adyacente a un protón olefínico, así como el resto de picos esperados para la forma de anillo abierto del ácido elenólico esterificado con tirosol o hidroxitirosol. Los dos componentes presentes en menor cantidad en cada mezcla se correspondieron con los pares 4*R*,5*S* y 4*S*,5*S* de las formas dialdehídicas de anillo abierto de la oleuropeína aglicona y el ligustrósido aglicona **11a,b** y **12a,b**. El componente principal de cada mezcla presentó una estructura muy similar, pero con una diferencia principal: la ausencia de un segundo aldehído. Cabe destacar que, en lugar de un segundo aldehído, cada molécula presentaba un doblete con gran desapantallamiento en torno a 11,8 ppm, que, en el experimento HSQC, no se correlacionó con ningún carbono. Además, se observó un protón olefínico adicional en torno a 7,3 ppm como doblete ( $J = 16$  Hz) correlacionado con el doblete a 11,8 ppm. El protón olefínico del experimento HMBC se correlacionó con un carbonilo que contenía un grupo metoxilo. Se deduce claramente de todos estos datos que el componente principal de cada zona era la forma monoenólica de los dialdehídos **11a,b** y **12a,b**. Contrariamente a lo que cabía esperar, las formas enólicas **13** y **14** mostraban estabilidad debido al enlace de hidrógeno entre el grupo hidroxilo de los enoles y el carbonilo adyacente del grupo carbometoxi.

La existencia de la forma enólica del ligustrósido aglicona **14** ya se había postulado en el pasado (p. ej., Angerosa *et al.*, 1996). Sin embargo, esta es, sin duda, la primera vez que se describe como un producto natural y un componente del aceite de oliva, para el que proponemos la denominación «oleokoronal». Las formas dialdehídicas del ligustrósido aglicona **12a,b** se han descrito en varias ocasiones como componentes del aceite de oliva tras su identificación en el espectróme-

tro de masas (p. ej., De Nino *et al.*, 2000) pero nunca se ha determinado su estructura mediante RMN. También se han identificado con el espectrómetro de masas a partir del alpechín obtenido en almazaras (Sánchez de Medina *et al.*, 2011) y se han citado como «p-HPEA-FA». En algunos casos, se han descrito como ligustrósido aglicona en su forma dialdehídica, pero en realidad hacen referencia al p-HPEA-EDA o al oleocantal, que se confunde con el decarboximetil ligustrósido aglicona en su forma dialdehídica (p. ej., Gómez del Campo y García, 2012). Para evitar el uso de largos nombres descriptivos que resulten ambiguos, consideramos que el nombre más adecuado para **12a,b** es «4*R*/4*S*-ligustródial», por asociación con el ligustral, que hace referencia a la forma monoaldehídica de anillo cerrado del ligustrósido aglicona **6a,b** (Calis *et al.*, 1993).

La forma enólica de la oleuropeína aglicona **13** nunca se ha descrito como componente del aceite de oliva, sino únicamente como componente de las aceitunas no procesadas (Bianco y Uccella, 2000) o como un producto de la hidrólisis enzimática de la oleuropeína (Bianco *et al.*, 1999a). Sin embargo, existen varias discrepancias en la descripción de este compuesto mediante RMN (Bianco y Uccella, 2000; Bianco *et al.*, 1999a) que deben revisarse. En primer lugar, los autores no describieron el pico crítico del grupo hidroxilo de los enoles a 11,78 ppm. Además, reportaron el desplazamiento químico del carbono olefínico que contiene el grupo carbometoxi a 130,37 ppm, mientras que nosotros lo observamos a 103,69 ppm. El protón olefínico del enol a 7,36 ppm se indicó como doblete con un acoplamiento de 6 Hz, mientras que el acoplamiento real es de 16 Hz y, obviamente, no hay señal del OH a 7,40 ppm, tal como se ha descrito previamente en la literatura. Existen algunas otras diferencias en la RMN de  $H^1$  y  $C^{13}$ , así como varias constantes de acoplamiento faltantes y, por tanto, resulta necesaria una descripción más completa y precisa. Debe señalarse que este compuesto y **11a,b** presentan una fluctuación significativa de determinados desplazamientos químicos en la RMN de  $H^1$  en función de la concentración de la muestra (**cuadro 4** y **figura 3**). Esto puede explicar algunas diferencias en los datos de la literatura científica anterior, pero no las principales. Debe señalarse que, en un artículo paralelo, estos mismos autores (Bianco *et al.*, 1999b) asignan los picos observados a 11,79-11,83 ppm a derivados por oxidación (aldehído a carboxilo) que aparecen lentamente en  $CDCl_3$ . Nuestros resultados sugieren, no obstante, que dichos picos no pueden atribuirse a la oxidación sino al equilibrio entre el aldehído y el enol.

**Cuadro 3: Datos obtenidos en RMN de H1 para eloleomisional (13) y los oleuropeindiales 11a,b a una concentración de 20 mg/0,6 ml.a Calibración de ejes basada en CDCl3 = 7,26 ppm**

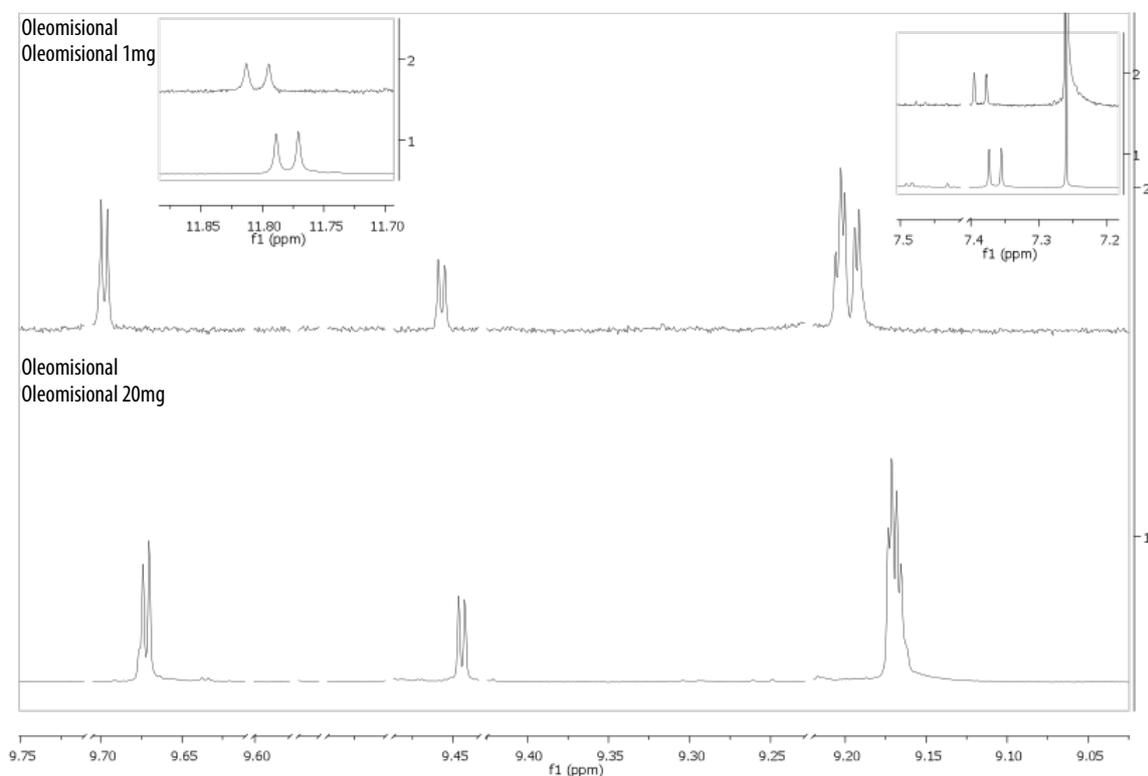
|                  | 11a (5S,4R)               | 11b (5S,4S)               | 13                        |
|------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1                | 9,17; d; 2,0              | 9,17; d; 2,0              | 9,17; d; 2,0              |
| 3                | 9,67; d; 2,7              | 9,44; d; 2,7              | 7,36; dd; 12,6; 0,8       |
| 4                | 4,04; dd; 10,5; 2,7       | 4,10; dd; 10,5; 2,7       | -                         |
| 5                | 3,84; tdd; 10,5; 4,7; 2,0 | 3,80; tdd; 10,5; 4,3; 2,0 | 4,17; ddd (superp)        |
| 6a               | 2,82; dd; 16,0; 10,5      | 2,83; dd; 15,8; 10,5      | 2,98; dd; 15,8; 9,6       |
| 6b               | 2,63; dd; 16,0; 4,7       | 2,58; dd; 15,8; 4,3       | 2,77; dd (superp)         |
| 8                | 6,70; c; 7,1              | 6,73; c; 7,1              | 6,59; c; 7,1              |
| 10               | 2,02; d; 7,1              | 1,99; d; 7,1              | 2,05; d; 7,1              |
| 3-OH             | -                         | -                         | 11,78; d; 12,6            |
| OCH <sub>3</sub> | 3,65; s                   | 3,78; s                   | 3,74; s                   |
| 1'               | 4,21; m                   | 4,12; m                   | 4,16; m                   |
| 2'               | 2,75; m                   | 2,75; m                   | 2,75; m                   |
| 4'               | 6,68; d; 1,8 <sup>b</sup> | 6,67; d; 1,8 <sup>b</sup> | 6,71; d; 1,8 <sup>b</sup> |
| 7'               | 6,78; d (superp)          | 6,78; d (superp)          | 6,78; d (superp)          |
| 8'               | 6,58                      | 6,58                      | 6,60; dd                  |

<sup>a</sup> Se observaron pequeñas diferencias en los desplazamientos químicos para 11a, 11b y 13 cuando se registraron los espectros con una concentración de 1 mg/0,6 ml (p. ej., H-3: 9,70/9,46/7,39; H-10: 2,04/1,98/2,07; COOCH<sub>3</sub>: 3,66/3,80/3,76, respectivamente).

<sup>b</sup> Pueden intercambiarse

**Cuadro 4: Datos obtenidos en RMN de C13 para eloleomisional (13) y los oleuropeindiales (12a,b) a una concentración de 20 mg/0,6 ml. Calibración de ejes basada en CDCl3 = 177,16 ppm.**

|                  | 11a (5S,4R) | 11b (5S,4S) | 13     |
|------------------|-------------|-------------|--------|
| 1                | 195,53      | 195,65      | 196,04 |
| 3                | 196,24      | 195,41      | 164,07 |
| 4                | 60,45       | 59,50       | 103,69 |
| 5                | 31,58       | 31,97       | 30,14  |
| 6                | 34,80       | 35,44       | 35,92  |
| 7                | 171,71      | 171,46      | 172,18 |
| 8                | 156,78      | 157,29      | 155,05 |
| 9                | 141,14      | 140,52      | 142,40 |
| 10               | 15,40       | 15,49       | 15,41  |
| 11               | 168,23      | 169,02      | 172,12 |
| OCH <sub>3</sub> | 52,69       | 53,02       | 51,86  |
| 1'               | 65,52       | 65,52       | 65,52  |
| 2'               | 34,28       | 34,28       | 34,28  |
| 3'               | 130,46      | 130,46      | 130,53 |
| 4'               | 116,29      | 116,24      | 116,38 |
| 5'               | 143,60      | 143,65      | 143,68 |
| 6'               | 143,05      | 143,00      | 142,92 |
| 7'               | 115,39      | 115,39      | 115,39 |
| 8'               | 121,27      | 121,33      | 121,27 |



**Figura 3:** Espectro obtenido con RMN de H1 de la región aldehídica y olefínica de la mezcla de oleomissional y 4S/4R-oleuropeindial (superior: 1 mg/0,6 ml; inferior: 20 mg/0,6 ml).

La misma confusión parece observarse en el artículo de Paiva-Martins y Gordon (2001), en el que dos picos a 11,76 y 11,82 ppm se asignan a los grupos carboxilos de dos isómeros geométricos que surgen de la hidrólisis de los grupos carbometoxi de **13**. Nuevamente, la causa no es la hidrólisis ni la oxidación, sino el equilibrio entre el aldehído y la forma enólica. Por tanto, la estructura propuesta debería considerarse cuestionable. En este trabajo, los autores describen también las formas dialdehídicas de anillo abierto **11a,b** aisladas a partir de hojas de olivo, pero los datos obtenidos mediante RMN resultan incompletos en relación con muchas constantes de acoplamiento. Además, en varios casos, existe confusión entre los picos asignados a cada uno de los dos diastereoisómeros dentro de los datos obtenidos con RMN de C<sup>13</sup>.

Los compuestos **11a,b** han sido descritos en el aceite de oliva por De Nino *et al.* (2000), pero la descripción de los datos obtenidos mediante RMN resulta muy confusa y contiene varias asignaciones poco sistemáticas que también precisan de una revisión. La descripción de Bianco *et al.* (1999a) relativa a la hidrólisis de la oleuropeína es más precisa, pero siguen existiendo algunos picos no observados (p. ej., a 56 ppm), observados con desplazamientos químicos bastante diferentes (diferencia superior a 5 ppm para el carbono que contiene el grupo carbometoxi) o en los que la descrip-

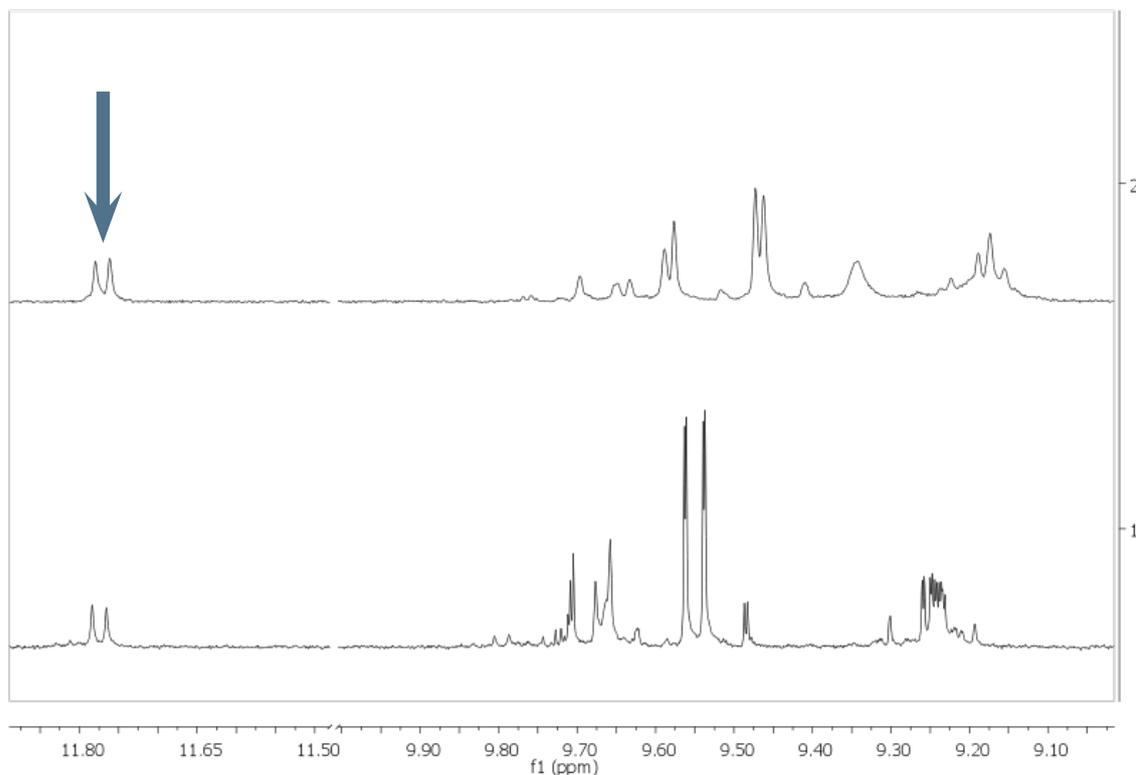
ción del patrón de multiplicidad y las correspondientes constantes de acoplamiento no está completa. La descripción más precisa es la realizada por Christophoridou y Dais (2009) en parte de un artículo sobre el estudio de la hidrólisis enzimática de la oleuropeína, pero siguen existiendo diferencias y no proporciona datos de la RMN del carbono.

Para evitar confusiones y simplificar la nomenclatura de la forma enólica **13**, proponemos el nombre «oleomissional» en lugar de la denominación «enoleuropeindial» (Bianco *et al.*, 1999a), que responde a una descripción errónea de esta forma. Para las formas dialdehídicas de la oleuropeína aglicona de anillo abierto, la denominación más adecuada sería «4S/4R-oleuropeindial», tal como se ha mencionado previamente en la literatura científica (Bianco *et al.*, 1999)

Para confirmar que el oleokoronal es un verdadero componente del aceite de oliva y no un artefacto producido durante la extracción o la dilución del aceite de oliva en el disolvente de RMN (CDCl<sub>3</sub>), llevamos a cabo un experimento con pulsos de excitación selectivos en una muestra de aceite de oliva sin disolvente, tal como se describe en la parte experimental, y lo comparamos con el extracto de ese mismo aceite de oliva diluido en CDCl<sub>3</sub>. El pulso de excitación selectivo permite observar los picos de componentes que

se encuentran en bajas concentraciones en presencia de otros componentes que se encuentran en concentraciones muy elevadas (p. ej., los lípidos). La metodología aplicada se ha detallado previamente en la literatura (Melliou *et al.*, 2015). Con este experimento pudimos observar el grupo hidroxilo desapantallado de la forma enólica **14** del ligustrósido aglicona a

11,78 ppm en un aceite de oliva intacto y en un extracto de dicho aceite de oliva (**figura 4**), demostrando así que se trata de un verdadero componente del aceite de oliva. La fluctuación de los desplazamientos químicos observada en el espectro del aceite sin diluir tiene su origen en la presencia de grandes cantidades de lípidos.



**Figura 4:** Espectro obtenido mediante RMN de H1 con pulsos de excitación selectivos del aceite de oliva sin diluir (superior) y del extracto de aceite de oliva diluido en CDCl<sub>3</sub> (inferior). El pico de oleokoronal a 11,78 ppm resulta observable en ambos casos, lo que demuestra que el oleokoronal es un verdadero componente del aceite de oliva.

Para confirmar las estructuras propuestas, llevamos a cabo la transformación enzimática de la oleuropeína en las formas de anillo abierto. Con unas condiciones de pH adecuadas, fue posible reducir al mínimo la transformación de la oleuropeína en la forma de anillo cerrado **5a** y dirigir la transformación únicamente a las formas de anillo abierto. La mezcla de compuestos resultante mostró exactamente los mismo picos que la mezcla aislada a partir del aceite de oliva y, nuevamente, el principal derivado fue la forma enólica **13**, acompañada por los dos estereoisómeros **11a** y **11b**.

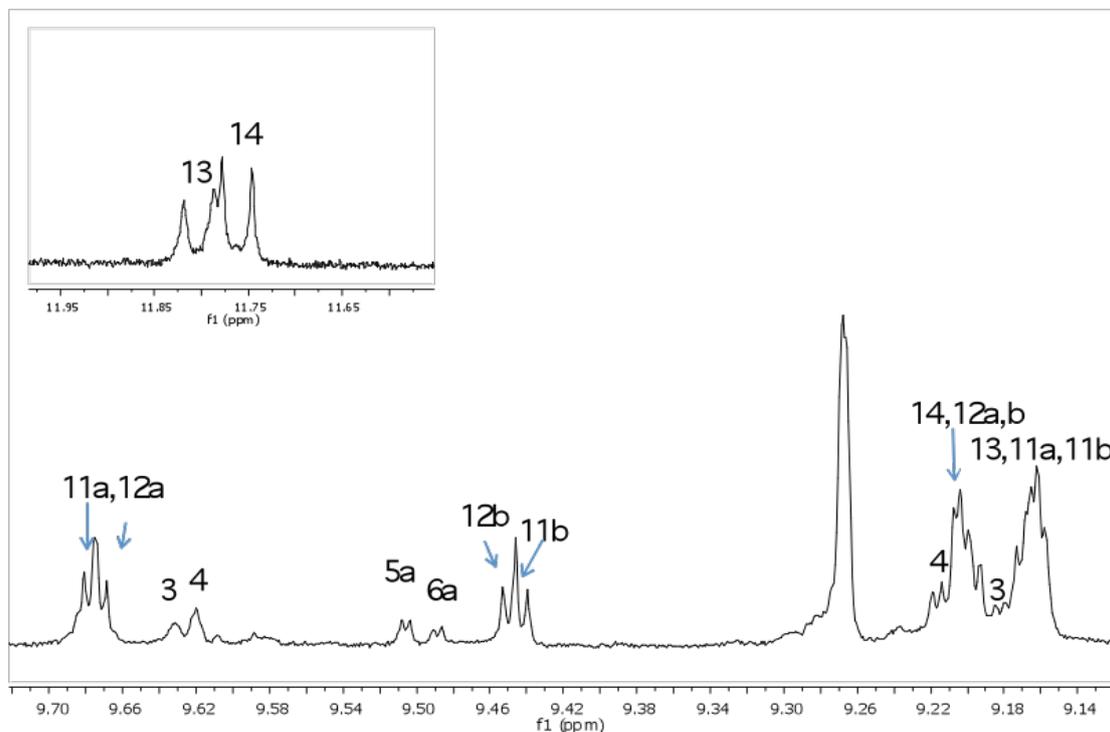
Por lo que respecta a la medición cuantitativa de la oleuropeína aglicona y el ligustrósido aglicona, en un trabajo anterior presentamos un método aprobado para medir las formas monoaldehídicas de anillo cerrado **5** y **6** (Karkoula *et al.*, 2014). Utilizando la misma metodología y las mismas curvas de calibración, pudi-

mos obtener datos cuantitativos para cada una de las formas dialdehídicas y enólicas. La separación completa de cada pico se consigue únicamente con RMN con altos campos magnéticos (> 600 MHz). Sin embargo, incluso a 400 MHz, la integración de toda la región de protones aldehídicos puede ofrecer datos cuantitativos totales para todas las formas de agliconas de anillo abierto.

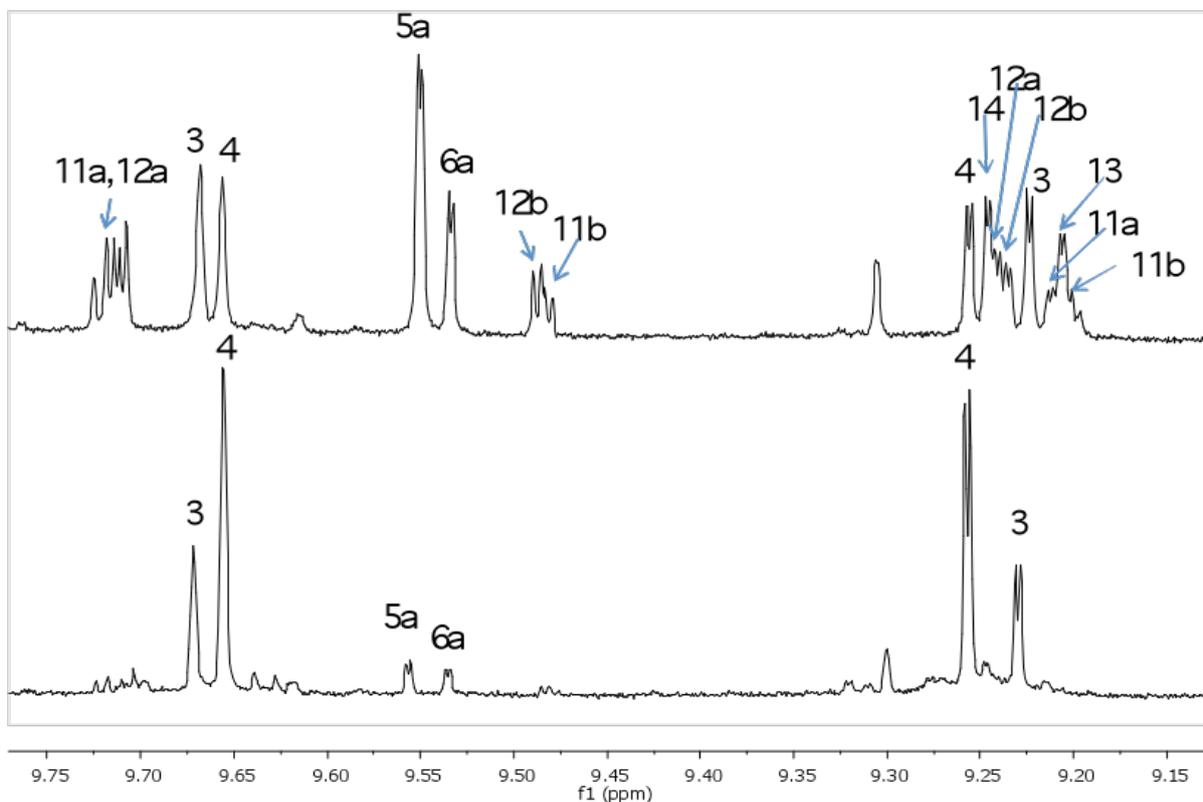
En relación con la abundancia de oleokoronal y oleomisional, debe mencionarse que, en un primer momento, se detectaron en los aceites de oliva de las variedades 'Koroneiki' (figura 5) y 'Mission' (figura 6a). En la mayoría de los aceites estudiados, las concentraciones de oleokoronal y oleomisional, y de las formas dialdehídicas relacionadas, eran inferiores a las concentraciones de oleocantal y oleaceína y, en muchos casos, inexistentes (figura 6b). Sin embargo,

parece que, en determinadas variedades y dependiendo de los parámetros de producción del aceite, el oleokoronal y el oleomisional pueden ser componen-

tes fenólicos principales del aceite de oliva. En otro artículo se ofrecen más datos sobre esta cuestión y más datos cuantitativos.



**Figura 5:** Espectro obtenido con RMN de H1 de la región aldehídica de aceite de oliva de la variedad 'Koroneiki' producido a baja temperatura y con un tiempo de malaxación corto (registrado a 400 MHz).



**Figura 6:** Espectro obtenido con RMN de H1 de la región aldehídica de una muestra de extracto de aceite de oliva de la variedad 'Mission' (a: superior) y de aceite de oliva 'Koroneiki' típico (b: inferior) que muestra los picos correspondientes a los compuestos 3, 4, 5a, 6a, 11a,b, 12a,b, 13, 14. El desplazamiento químico de los picos observados en el extracto de aceite de oliva es ligeramente diferente al de los compuestos puros debido a la presencia de lípidos en el extracto (no se muestra).

## Conclusiones

En el trabajo actual hemos aislado y descrito por medio de RMN una serie de compuestos pertenecientes a la familia de la oleuropeína aglicona y el ligustrósido aglicona, algunos de los cuales se han definido por primera vez como componentes del aceite de oliva. Se han propuesto nuevos nombres, como «oleokoronal», «oleomisional» y «ligustrodial» a fin de reducir al mínimo la confusión ocasionada por el uso de nombres complicados o abreviados. El estudio directo de aceite de oliva sin diluir mediante RMN ha probado que las formas enólicas de las agliconas son componentes fenólicos principales al menos de determinados aceites de oliva. La caracterización completa de los nuevos compuestos y la simplicidad del análisis mediante RMN cuantitativa ofrecen una nueva perspectiva para garantizar las propiedades beneficiosas para la salud del aceite de oliva.

## Agradecimientos

Nos gustaría agradecer a la Cooperativa de Paleopagnia, de Laconia, y al olivar Berkeley Olive Grove, de California, las muestras de aceite de oliva suministradas; a la Sra. Marcomichelaki, de Volvi Estate, las hojas de olivo ofrecidas; a Venia Smyrli y Stella Konstantopoulou, el aislamiento de la oleuropeína; y al profesor Diomedes Logothetis, el permiso para usar los equipos de RMN de la Universidad de la Commonwealth de Virginia. Angeliki Velkou y Thanasis Gimisis agradecen los fondos recibidos del PROGRAMA SYNERGASIA 2011. Este programa está cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional y fondos nacionales (código de proyecto 11SYN\_2\_1613). Panagiotis Diamantakos, Eleni Melliou y Prokopios Magiatis agradecen a la Fundación Latsis su apoyo económico.

## Referencias

Andreadou, I., Iliodromitis, E., Mikros, E., Constantinou, M., Agalias, A., Magiatis, P., Skaltsounis, A.L., Kamber, E., Tsantili-Kakoulidou, A., and Kremastinos, D. 2006. *The olive constituent oleuropein exhibits anti-ischemic, antioxidative, and hypolipidemic effects in anesthetized rabbits*. J. Nutrition 136: 2213-2219.

Angerosa, F., d'Alessandro N., Corana, F., and Mellerio, G. 1996. *Characterization of phenolic and secoiridoid*

*aglycons present in virgin olive oil by gas chromatography-chemical ionization mass spectrometry*. J. Chromatogr. A, 736: 195-203.

Bianco, A. D. and Uccella, N. 2000. *Biophenolic components of olives*. Food Res. Intl. 33: 475-485

Bianco, A. D., Muzzalupo, I., Piperno, A., Romeo, G. and Uccella, N. 1999. *Bioactive Derivatives of Oleuropein from Olive Fruits*. J. Agric. Food Chem. 47: 3531-3534.

Bianco, A. D., Piperno, A., Romeo, G. and Uccella, N. 1999. *NMR Experiments of Oleuropein Biomimetic Hydrolysis*. J. Agric. Food Chem. 47: 3665-3668.

Caliş, I., Hosny, M., Khalifa, T., and Nishibe, S. 1993. *Secoiridoids from Fraxinus angustifolia*. Phytochem. 33: 1453-1456,

Christophoridou S. and Dais, P. 2009. *Detection and quantification of phenolic compounds in olive oil by high resolution 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy*. Anal. Chim. Acta 633: 283-292.

De Nino, A., Mazzotti, F., Perri, E., Procopio, A., Raffaelli, A., and Sindona, G. 2000. *Virtual freezing of the hemiacetal-aldehyde equilibrium of the aglycones of oleuropein and ligstroside present in olive oils from Carolea and Coratina cultivars by ionspray ionization tandem mass spectrometry*. J. Mass Spec. 35: 461-467

Gomez-del-Campo, M. and Garcia, J. M. 2012. *Canopy Fruit Location Can Affect Olive Oil Quality in 'Arbequina' Hedgerow Orchards*. J. Am. Oil Chem. Soc. 89: 123-133.

Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E. and Magiatis, P. 2012. *Direct measurement of oleocanthal and oleacein levels in olive oil by quantitative 1H NMR. Establishment of a new index for the characterization of extra virgin olive oils*. J. Agric. Food Chem. 60: 11696-11703.

Karkoula, E., Skantzari, A., Melliou, E., and Magiatis, P. 2014. *Quantitative Measurement of Major Secoiridoid Derivatives in Olive Oil Using qNMR. Proof of the Artificial Formation of Aldehydic Oleuropein and Ligstroside Aglycon Isomers*. J. Agric. Food Chem. 62: 600-607.

Koudounas, K., Banilas, G., Michaelidis, C., Demoliou, C., Rigas, S., and Hatzopoulos, P. 2015. *A defence-related Olea europaea β-glucosidase hydrolyses and activates oleuropein into a potent protein cross-linking agent*. J. Exp. Bot. doi:10.1093/jxb/erv002

Limiroli, R., Consonni, R., Ottolina, G., Marsilio, V., Bianchi, G., and Zetta, L. 1995. *1H and 13C NMR characterisation of new oleuropein aglycone*. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1, 1519-1523.

Melliou, E., Killday, K.B. and Magiatis, P. 2015. *A New Ultra Rapid Screening Method for Olive Oil Health Claim Evaluation Using Selective Pulse NMR Spectroscopy* From the book: Magnetic Resonance in Food Science: Defining Food by Magnetic Resonance. Royal Society of Chemistry

- Paiva-Martins, F., Gordon, M. H. 2001. *Isolation and Characterization of the Antioxidant Component 3,4-Dihydroxyphenylethyl 4-formyl-3-formylmethyl-4-hexanoate from Olive (Olea europaea) Leaves*. J. Agric. Food Chem. 49: 4214-4219.
- Pérez-Trujillo, M., Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., and Parella, T. 2010. *Separation and identification of phenolic compounds of extra virgin olive oil from Olea europaea L. by HPLC-DAD-SPE-NMR/MS. Identification of a new diastereoisomer of the aldehydic form of oleuropein aglycon*. J. Agric. Food Chem. 58: 9129-9136.
- Sanchez de Medina, V., Priego-Capote, E., Jimenez-Ot, C. and Luque de Castro, M. D. 2011. *Quality and stability of edible oils enriched with hydrophilic antioxidants from the olive tree: The role of enrichment extracts and lipid composition*. J. Agric. Food Chem. 59: 11432-11441.

# Problemática fitopatológica y aspectos fitosanitarios del olivo en la Italia centromeridional durante las adversidades conocidas y las nuevas emergencias

V.Vizzarri<sup>1</sup>, L.Tosi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro di Ricerca per l'Olivicoltura e l'Industria Olearia (CRA-OLI), C.da Li Rocchi-Vermicelli, 87036 Rende (CS) (Italia) (autor para correspondencia); dirección de correo electrónico: veronica.vizzarri@entecra.it

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie, Ambientali ed Alimentari, Università degli Studi di Perugia, Borgo XX Giugno, 74, 06121 Perugia (Italia); dirección de correo electrónico: laura.tosi@unipg.it

## Riassunto

La relevancia económica, social, cultural y ecoambiental que reviste el olivo en Italia y en otros países mediterráneos, el mantenimiento de los olivares existentes, el cultivo en áreas nuevas o incluso su introducción en zonas fuera de Europa requieren que se preste una gran atención a la problemática fitopatológica de los cultivos y una información continuamente actualizada de los aspectos agrícolas, de cultivo y epidemiológicos de las fisiopatías y la fitofagia. Por lo tanto, la presente nota ilustra la situación actual de los problemas fitopatológicos del olivo teniendo en consideración también los cambios climáticos, mostrando cómo pueden incidir en el recrudecimiento de enfermedades ya conocidas, y se centra en las nuevas emergencias y en ofrecer indicaciones sobre las estrategias de defensa integrada ecosostenibles más modernas.

## Abstract

The economic, social, cultural and eco-environmental importance of olive growing in Italy and the other Mediterranean countries, coupled with the maintenance of existing olive orchards and the spread of olive cultivation to new areas or its introduction in areas outside Europe, makes it necessary to pay close attention to crop phytopathological problems and to update the cultural and epidemiological aspects of plant pests and diseases on a continuing basis. This paper describes the current phytopathological problems in olive, including in the light of climate change. It shows how these problems can affect the re-emergence of diseases that are already known and focuses attention on newly emerging threats, besides informing on the latest eco-sustainable integrated protection strategies.

## Introducción

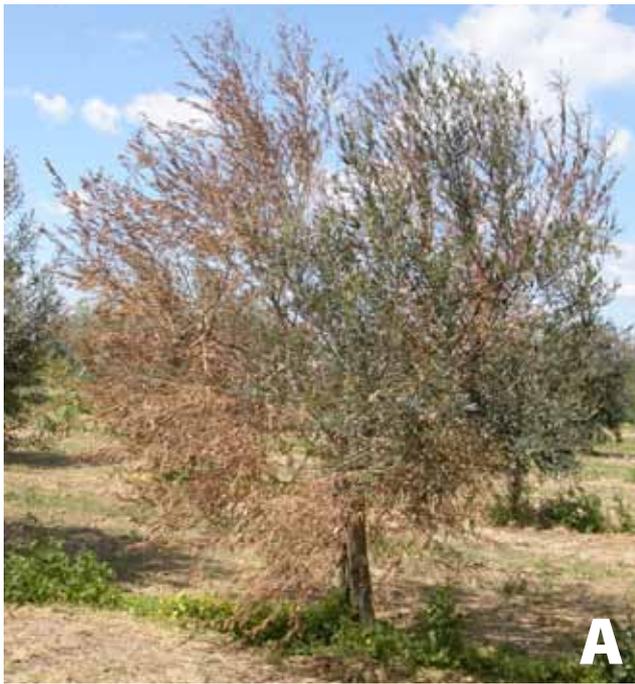
El sector olivícola italiano muestra, en todo el territorio, situaciones muy diversas que pueden explicar la pérdida de competitividad del país. De hecho, a diferencia de España, la olivicultura en Italia se practica todavía en tierras marginales, aunque, como sucede en las regiones meridionales, representa la única opción para la explotación de determinados territorios. A pesar de algunos puntos débiles, como la reducida superficie media a nivel nacional (el 70 % de las explotaciones olivícolas tiene una superficie de poco menos de dos hectáreas), hay algunos puntos fuertes, representados por la amplitud del patrimonio varietal, aunque solo son una decena las variedades más extendidas a nivel nacional, con una superficie de 475.000 hectáreas, aproximadamente el 42 % del total (Madau, 2009). Entre estas variedades destacan 'Coratina Ogliarola Salentina' y 'Cellina di Nardò', extendida en Apulia, y otras cultivadas en gran parte del territorio italiano ('Carolea', 'Frantoio' y 'Leccino'). Sin embargo, al menos otro centenar de variedades, con una extensión muy limitada (entre 1.000 y 10.000 metros cuadrados), representa un gran recurso por las características de las drupas, destinadas al consumo directo, o por la calidad del aceite, especialmente para buscar nuevas fuentes de resistencia ante las adversidades bióticas que perjudican principalmente la producción olivícola, así como para determinar su cultivo en zonas más adecuadas al ser más fácilmente adaptables a diferentes condiciones edafoclimáticas del territorio italiano.

La presente nota se publica una década después de la publicación precedente (Tosi y Zizzerini, 2005) y tiene como propósito actualizar la información sobre la situación fitosanitaria del olivo, destacando, entre las fisiopatías ya conocidas, la verticilosis (enfermedad vascular que sigue siendo difícil de contrarrestar) y la antracnosis (adversidad considerada de menor importancia que, en los últimos años, está mostrando una mayor intensidad en los ataques en algunos ambientes olivícolas) y, por último, centrar la atención en dos adversidades emergentes. Por lo tanto, el objetivo de la revisión es evidenciar que para el desarrollo y la adopción de métodos de lucha es necesario contar con unos conocimientos profundos y actualizados de las técnicas agrícolas y de cultivo, que, al modificarse, influyen en el agrosistema del olivo, repercutiendo sobre la inciden-

cia y la gravedad de adversidades como las mencionadas anteriormente. Como exige la Directiva 128/2009 CE, traspuesta en Italia por el D. L. n.º 150/2012, la protección fitosanitaria moderna aborda de forma amplia y orgánica los aspectos relativos al impacto ambiental y la salubridad de los alimentos tras el uso de agrofarmacos. A partir del 1 de enero de 2014, mediante el Plan de Acción Nacional (PAN), que incluye dos niveles de aplicación (protección integrada y agricultura biológica), se establecen los principios generales de la protección integrada, que se convierte en obligatoria. En resumen, la nueva normativa basa la defensa en la prevención, aprovechando de manera sinérgica las capacidades y peculiaridades que ofrecen los diversos medios de lucha para permitir una protección completa de los cultivos, sin limitarse a la contención de una única fisiopatía, y para intervenir rápidamente cuando surgen nuevas emergencias (p. ej., el desecamiento rápido del olivo). La protección racional de los cultivos requiere, por tanto, una actualización continua y constante de los conocimientos, las tecnologías y las técnicas, así como una mayor integración continua entre las diversas competencias.

## Aspectos epidemiológicos de la verticilosis e influencia de las prácticas fitosanitarias

Esta adversidad criptogámica, extendida desde hace muchos años en los olivares de la Italia centromeridional, y también en distintos países de la zona mediterránea (España, Grecia, Túnez, Marruecos, Siria, etc.), está causando problemas tanto en plantaciones viejas como en olivares jóvenes y con riego frecuente. La investigación llevada a cabo en los olivares del centro de Italia (Umbría, Toscana) y del sur (Calabria, Sicilia y Apulia) desde los años 90 (Tosi y Zizzerini, 1998; 2000; Ciccicarese, 2003; Vizzarri, 2005) ha evidenciado que los factores climáticos, agrícolas, de cultivo y genofenotípicos, unidos al aumento de la incidencia e intensidad de las enfermedades y el fenómeno, no infrecuente, de la recuperación natural de sujetos infectados, pueden influir de manera diferente en el desarrollo de la verticilosis (Fig. 1) y, en consecuencia, frustrar las intervenciones fitosanitarias.



**Figura 1:** Verticilosis del olivo. Manifestación característica de la evolución crónica, o deterioro lento, (A) y de la evolución aguda, o apoplejía, (B).

La certificación del estado fitosanitario de las plantas es un aspecto muy relevante no solo en la constitución de nuevas plantaciones, sino también en la reestructuración de viejos olivares mediante un aumento de la densidad de plantación, como ha ocurrido durante las dos últimas décadas en Grecia, España e incluso Italia, tanto en cultivos de secano como de regadío (Navarro y Parra, 2008). A este respecto, la investigación llevada a cabo en Apulia (Nigro y cols., 2005) ha permitido detectar la presencia de *Verticillium dahliae* en el 50 % de los viveros analizados, y también se han observado y se conocen casos de verticilosis en Umbría, tanto en plantaciones jóvenes como en olivares reestructurados, debido a la infección del material de propagación (Tosi, com. pers.).

En las dos situaciones descritas anteriormente (nuevas plantaciones y sustitución de plantas muertas como consecuencia de la enfermedad), el uso de material de propagación sano debe acompañarse de una selección de cultivares resistentes o el uso de variedades plantadas en portainjertos resistentes a la verticilosis. Sin embargo, este medio de lucha está fuertemente condicionado por algunas características biológicas del patógeno (densidad de inóculo en el terreno, virulencia de las cepas), por las condiciones ambientales, por los resultados de las pruebas de detección de resistencia, no siempre coherentes, como consecuencia de la utilización de diferentes cepas de *V. dahliae*, por los diferentes métodos de inoculación y por las condiciones experimentales utilizadas para evaluar la resistencia.

Para evitar este último factor, es necesario adoptar protocolos experimentales estandarizados y reconocidos a nivel internacional.

Dependiendo de la virulencia en el olivo, las cepas de *V. dahliae* se clasifican tradicionalmente como patotipos defoliantes (D) y no defoliantes (ND) en función de la capacidad de provocar la caída completa de las hojas todavía verdes (Rodríguez-Jurado y cols., 1993). En particular, los patotipos D de las cepas del olivo y el algodón son capaces de manifestar virulencia en ambos huéspedes, con síntomas como marchitez, clorosis, defoliación y muerte de la planta, mientras que los patotipos ND presentan síntomas similares, pero con una gravedad leve o moderada.

En general, las diferencias en la virulencia también son evidentes entre los diferentes cultivares de olivo, y las infecciones causadas por patotipos D comienzan antes y progresan rápido y con mayor intensidad (Rodríguez-Jurado y cols., 1993; López-Escudero y cols., 2004; Martos-Moreno y cols., 2006; Dervis y cols., 2010).

Por otra parte, se sabe que, al ser la reproducción del patógeno exclusivamente de naturaleza agámica, las únicas posibilidades que pueden asegurar el intercambio de material genético son la anastomosis hifal (fusión de hifas entre cepas vegetativamente compatibles) y la heterocariosis sucesiva (fusión de los núcleos). Aunque en muchas investigaciones se ha evidenciado

una asociación entre grupos de compatibilidad vegetativa (VCG) y diversidad genética (molecular), la correlación entre la especificidad del huésped, la virulencia del patógeno y la distribución geográfica resulta más compleja y difícil de interpretar. De hecho, aunque en todos los países en los que el patotipo defoliante se ha señalado (Pérez-Artés y cols., 2000; Collado-Romero y cols., 2006; Dervis y cols., 2010) y clasificado como perteneciente al grupo VCG 1A, y el patotipo ND ha sido asignado a los otros grupos (VCG 2, VCG 4), algunas investigaciones han demostrado que no existe una correlación entre la patogenicidad de las cepas de olivo y los grupos VCG (Tanatoui y cols., 2002) y que, dentro del grupo/patotipo VCG 1A/D, algunas cepas D muestran una virulencia (gravedad de los síntomas) en inoculaciones artificiales similar a la de los patotipos ND (Dervis y cols., 2010).

La caracterización y la diferenciación genética de las cepas de *V. dahliae* del olivo, estudiadas empleando técnicas moleculares (RAPD, AFLP y PCR con marcadores específicos), parecen evidenciar que dentro de un grupo dado de VCG existe similitud a nivel molecular. Estos grupos de cepas guardan relación con la especificidad del huésped y el origen geográfico (Collado-Romero y cols., 2006; 2008), aunque hay que señalar que los patotipos VCG 1A/D de cepas de olivos de Turquía, molecularmente distintas a las españolas, no han mostrado diferencias significativas en la virulencia en los ensayos de patogenicidad (Dervis y cols., 2010). Las investigaciones realizadas en las zonas olivícolas de la cuenca mediterránea han puesto de relieve que los patotipos D se han extendido rápidamente en España (Mercado-Blanco y cols., 2003; Navas-Cortés y cols., 2008). En Turquía se ha informado de una mayor virulencia de las cepas pertenecientes al grupo/patotipo VCG 1A/D (Dervis y cols., 2010), mientras que en Italia parecen prevalecer los patotipos ND (Nigro y cols., 2005; Vizzarri, 2005). Así pues, no es de extrañar que existan discrepancias entre los resultados de los ensayos de resistencia en condiciones artificiales y los obtenidos mediante observaciones de campo sobre el comportamiento de las variedades, que se pueden ver influidos en gran medida por las condiciones ambientales, por la cantidad de inóculo del patógeno en el terreno, por su virulencia y también por las prácticas agrícolas y de cultivo adoptadas. De la investigación llevada a cabo en varios países durante otros cuarenta años, tanto en ambientes naturales como en condiciones experimentales, se extrae que las variedades agrónomicamente mejores son aquellas más susceptibles al patotipo D, como, por ejemplo, 'Picual', 'Hojiblanca', 'Arbequina', 'Manzanilla de Sevilla' (cv español), 'Kalamon', 'Amfis-

is', 'Konservolia' (cv griego), 'Ascolana' y 'Leccino' (cv italiano); y los niveles más altos de resistencia se dan en los cultivares 'Oblonga', 'Changlot Real', 'Empeltre' y 'Frantoio' (López-Escudero y Mercado-Blanco, 2011).

Otra alternativa es la representada por la plantación en portainjertos resistentes: el cv 'Sevillano' (Hartman y cols., 1971) y el cv 'Conservolia' (Tjamos y cols., 1985), injertados en 'Oblonga', han evidenciado resistencia a *V. dahliae*, aunque el injerto de otros cultivares de *Olea europea* o en especies diferentes del género *Olea* han mostrado resultados variables. De hecho, la reacción de un determinado genotipo en condiciones experimentales puede cambiar en pleno campo como consecuencia de los factores ambientales, biológicos, agrícolas y de cultivo ya mencionados (Blanco-López y cols., 1998). La resistencia en condiciones naturales puede verse modificada por el fenómeno de la recuperación (*natural recovery*) de las plantas infectadas, en las que se observa la remisión temporal de los síntomas (2-3 años) con la aparición de nueva vegetación debajo de las ramas secas (Tosi y Zizzerini, 1998; 2000; Trapero y Blanco, 2001; Ciccarese, 2003). Por lo tanto, para determinar la recurrencia de la enfermedad se requieren nuevas infecciones. Se cree que el fenómeno es atribuible a la activación de las respuestas de defensa del huésped con la producción de compuestos fenólicos y a la oclusión de los vasos del xilema infectados, con la consiguiente inactivación de *V. dahliae*. El fenómeno de la recuperación, que depende de la virulencia del patógeno y de la resistencia de las variedades, se ha observado con mayor frecuencia en olivares con presencia de patotipos ND y cultivares resistentes (Tosi y Zizzerini, 1998; 2000; Vizzarri, 2005; López-Escudero y cols., 2004; Martos-Moreno y cols., 2001). Esta situación puede favorecer la adopción de prácticas agrícolas y de cultivo adecuadas para reducir la cantidad de inóculo de *V. dahliae* (fertilización nitrogenada equilibrada, eliminación de malas hierbas mediante siega para evitar una labranza del terreno que pueda dar lugar a lesiones y promover nuevas infecciones, y el uso de la solarización del terreno alrededor de las plantas) (Tosi y Zizzerini, 1998; 2000; Ciccarese, 2003; Trapero y Blanco, 2001). Por el contrario, en un estudio reciente llevado a cabo en Apulia (sur de Italia) en olivos jóvenes (5-12 años) del cultivar altamente susceptible 'Bella di Cerignola' y con presencia en el terreno de una densidad moderada de inóculo de *V. dahliae* (patotipo ND), se ha evidenciado que la recuperación de las plantas, inducida artificialmente utilizando, individualmente y de manera combinada, solarización, cianamida cálcica y esquejes, ha dado un resultado bastante bajo y limitado en un solo año (Bubici y Cirulli, 2014).

En definitiva, en las zonas olivícolas italianas, por la naturaleza poliética de *V. dahliae*, la mayor extensión de los patotipos ND y la imposibilidad de erradicar la enfermedad, las estrategias de lucha deben basarse en la aplicación de prácticas agrícolas y de cultivo que, al interactuar con determinadas características biológicas del patógeno y con las condiciones ambientales, puedan garantizar efectos beneficiosos, si no sinérgicos, en la contención de esta adversidad.

## Aspectos epidemiológicos de la antracnosis e influencia de las prácticas fitosanitarias

La antracnosis, o lepra, hoy en día presente en muchas zonas olivícolas del mundo, está extendida desde hace tiempo en algunos países de la cuenca mediterránea, aunque con distinta intensidad, como resultado de unos otoños suaves y lluviosos. En Italia, la enfermedad, más frecuente y grave en algunas regiones meridionales (Apulia, Calabria), también se ha observado en Cerdeña, Sicilia y, ocasionalmente, en Umbría y Toscana. Desde la primera señal en Apulia (Ciccarone, 1950), las infecciones han presentado evoluciones epidémicas en las regiones del sur de Italia durante al menos veinte años y después han sufrido una regresión (Apulia, Cerdeña, Sicilia). El fenómeno, atribuido primero a la pérdida de virulencia del agente causante, se ha atribuido posteriormente a unas estaciones más secas como consecuencia del cambio climático de las dos últimas décadas. Constituyen excepciones la Piana di Gioia Tauro (Calabria) y el Salento (Apulia), donde las condiciones ambientales favorecen todavía la aparición de grandes epidemias (Cacciola y cols., 2012).

Se ha indicado que diferentes especies de *Colletotrichum* son responsables de la antracnosis en los distintos países en que la enfermedad está presente. Estudios morfológicos y moleculares recientes (Faedda y cols., 2011) han puesto de manifiesto que *C. clavatum* (anteriormente conocido como *C. acutatum* grupo molecular A4) ha causado epidemias graves en Grecia, Montenegro, algunas áreas restringidas de Portugal y España, e Italia. En particular, en las regiones meridionales italianas se han identificado dos grupos VCG en la población de *Colletotrichum* a través de pruebas de compatibilidad vegetativa (Agosteo y cols., 2002) para correlacionar el origen geográfico y el perfil molecular (por RAPD): uno incluye cepas que provienen de la Apulia y el otro agrupa cepas originarias de Calabria, Cerdeña y Umbría y la

cepa griega de referencia (CBS 193.32) depositada por Petri en 1930. La presencia de dos grupos VCG distintos en Apulia y Calabria plantea la hipótesis de que *C. clavatum* fue introducido en Italia desde los Balcanes en diferentes momentos, probablemente durante los años 1930-1940 (Agosteo, 2010) y, a continuación, mediante la difusión de material infectado, se extendió desde Calabria a otras regiones (Cerdeña, Umbría). Sin embargo, no se puede descartar que hubiera una única introducción del patógeno y que los diferentes grupos VCG presentes en varios países surgieran como resultado de un proceso de diversificación causado por el aislamiento geográfico. Por lo tanto, *C. simmondsii* (inicialmente identificado como grupo A2 de *C. acutatum sensu lato*, especie responsable de las epidemias de antracnosis en Portugal (Talhinhas y cols., 2011), no ha sido aislado en olivos de Italia, a pesar de ser un conocido causante de la antracnosis de la fresa en varias regiones, entre las cuales se encuentran Apulia y Calabria. Análogamente, *C. acutatum sensu stricto* (inicialmente grupo A5) no se ha aislado en olivos de Italia y es la especie prevalente en las zonas olivícolas del hemisferio austral (Faedda y cols., 2011). En esencia, varias especies de *Colletotrichum* son responsables de la antracnosis del olivo y las investigaciones realizadas indican, con pocas excepciones, que una determinada especie es prevalente en una determinada zona olivícola, lo que evidencia una posible adaptación en función de las condiciones ambientales y de las características genéticas del huésped.

De lo que se ha presentado de forma sintética se extrae que la virulencia del patógeno, la susceptibilidad de los cultivares y las condiciones ambientales son los factores que predisponen a las infecciones por *Colletotrichum* spp. Los hallazgos más recientes desde el punto de vista epidemiológico indican que, en condiciones naturales, las infecciones transmitidas por las flores y los frutos jóvenes tienen lugar en primavera, cuando las condiciones termohigrométricas son más favorables; durante el crecimiento de las drupas en los meses de verano, que se caracteriza por períodos calurosos y secos, las infecciones se vuelven latentes, constituyendo, en cualquier caso, la principal fuente de inóculo para las epidemias del otoño. El patógeno puede penetrar directamente, perforando el epicarpo de las drupas gracias a la producción de cutinasas extracelulares, pero la gravedad de las infecciones y la tasa de colonización aumentan significativamente en presencia de microlesiones causadas por picaduras de oviposición o por orificios de eclosión de la mosca del olivo (*Bactrocera oleae* Gmelin). La actividad trófica de las larvas favorece la colonización del patógeno y anticipa la maduración de las drupas. Además, el insecto también puede contribuir a la dispersión de los conidios.

La susceptibilidad de las drupas aumenta a medida que maduran y, en condiciones favorables, se produce su putrefacción (Fig. 2) y momificado, lo que da lugar a pérdidas de cantidad y calidad, especialmente a una mala calidad en el aceite. Además, el patógeno esporula en la superficie de los frutos infectados, dando lugar, si persisten unas condiciones ambientales favorables, a ciclos infectivos secundarios: los frutos momificados que siguen unidos a las ramas permiten la supervivencia del patógeno en el invierno y representan la fuente de inóculo para la siguiente estación.



**Figura 2:** Lepra del olivo. Sintomatología habitual de la «cara de mono» en las drupas afectadas por *Colletotrichum gloeosporioides* con acérvulos evidentes del hongo.

La información sobre la susceptibilidad/resistencia de los diversos cultivares no está exenta de contradicciones, como consecuencia de una identificación de los cultivares que no siempre es clara y de discrepancias entre los resultados obtenidos en ensayos de laboratorio y las observaciones en el campo. En este sentido, existe una mayor concordancia en los datos si las infecciones artificiales, bajo condiciones controladas, se realizan en drupas inmaduras y verdes que en maduras, ya que la susceptibilidad de los frutos aumenta con la maduración. ‘Ottobratica’, ‘Corniola’, ‘Strana’, ‘Carolea’, ‘Picudo’, ‘Morona’ y ‘Manzanilla de Sevilla’ son algunos de los cultivares más susceptibles, mientras que ‘Frantoio’, ‘Leccino’, ‘Santomauro’, ‘Picual’, ‘Blanqueta’, ‘Koroneiki’ y ‘Raz-zola’ son resistentes (Cacciola y cols., 2012). Por lo tanto, el uso de cultivares menos susceptibles o resistentes es un medio válido de contención de la enfermedad en el momento de la constitución de nuevas plantaciones. En cambio, en los olivares existentes, en los que hay cultivares susceptibles o condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la antracnosis, es aconsejable llevar a cabo la poda para eliminar ramas y ramitas infectadas y frutos momificados con el fin de reducir la cantidad de inóculo y favorecer una mayor aireación de la copa para reducir la humedad en el interior de la vegetación

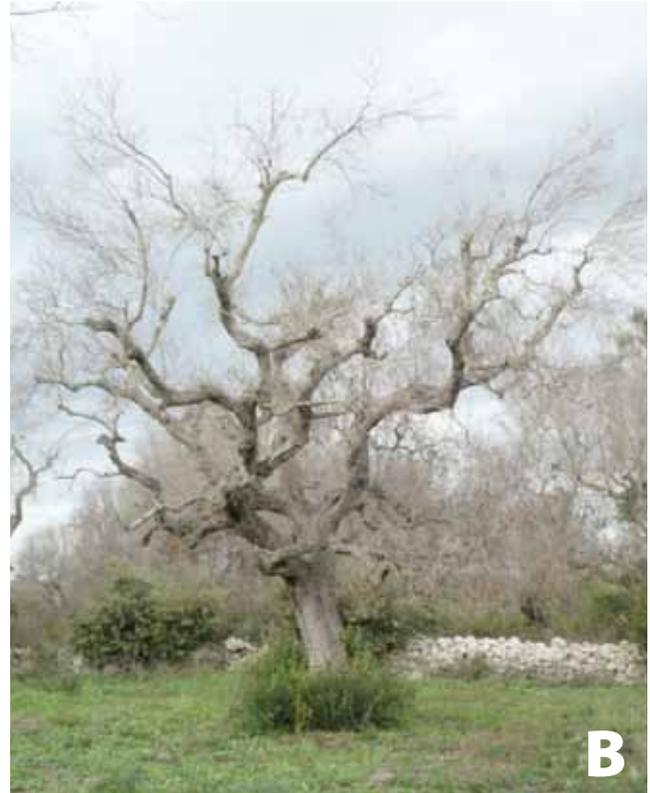
y anticipar la recogida de las drupas. Sin embargo, estos medios de defensa deben acompañarse de tratamientos químicos, que no son resolutivos, pero sí necesarios para evitar graves epidemias. Es aconsejable intervenir con productos cúpricos, dando preferencia a formulaciones con dosis bajas de iones cúpricos y con una mayor adherencia y persistencia, que, al aplicarse en la prefloración y el postcujado contra el ojo de pavo, permiten aprovechar su actividad colateral en la lucha contra la antracnosis. Los tratamientos a base de cobre tienen que repetirse durante el crecimiento de las drupas y en el preverano. Lamentablemente, en años lluviosos y en los olivos seculares, es aún más conveniente controlar que tenga lugar una distribución correcta y uniforme de los productos fitosanitarios en la copa de las plantas. Recientemente, se han realizado pruebas experimentales en los olivares de Apulia para comparar la eficacia de algunas estrategias de defensa en las que se usan productos cúpricos, piraclostrobina y la mezcla trifloxistrobina + tebuconazol. El experimento ha puesto de relieve que la piraclostrobina asociada al cobre y la mezcla trifloxistrobina + tebuconazol exhiben una alta actividad contra el patógeno y en la limitación de la infección en las drupas. Es fundamental intervenir en la prefloración para contener las infecciones latentes y aplicar productos cúpricos en el postverano para reducir las secundarias (Nigro y cols., 2011; Cacciola y cols., 2012). En Italia, el Ministerio de Sanidad ha autorizado temporalmente, desde 2011, el uso de piraclostrobina en una sola aplicación, entre julio y agosto, en los olivares calabreses con alta presión de la enfermedad, pero este tratamiento ha demostrado ser bastante ineficaz (Cacciola y cols., 2012).

## Nuevas emergencias fitosanitarias: síndrome de desecamiento rápido del olivo

El primer signo del síndrome de desecamiento rápido del olivo (*Complesso del Disseccamento Rapido dell’Olivo*, o *CoDiRO*, en italiano; y *Olive Quick Decline Syndrome*, u *OQDS*, en inglés), en algunos olivares del Salento (Apulia, en el sur de Italia) se remonta a 2010 (Saponari y cols., 2013) y, a partir de ahí, la fisiopatía se ha extendido rápidamente, afectando en 2013 a un área de aproximadamente 10.000 hectáreas. Los síntomas de la enfermedad se caracterizan por el desecamiento repentino de las ramas pequeñas y de las ramas que se extienden a la copa, causando la muerte de la planta. Las puntas y bordes de las hojas cobran

aspecto amarillento y, posteriormente, las hojas se tornan marrones hasta secarse. Las secciones transversales del tronco, las ramas y las ramas pequeñas muestran un pardeamiento más o menos extenso de los elementos vasculares. Las plantas seculares son

las más gravemente dañadas y, cuando no mueren, se muestran secas con una emisión abundante de retoños en el cuello, a consecuencia de la poda drástica llevada a cabo por los agricultores con la esperanza de crear nueva vegetación (Fig. 3).



**Figura 2:** Síndrome de desecamiento rápido del olivo. Desecamiento típico de la copa conocido como «piel de leopardo» de la copa (A) y desecamiento total de la planta por oclusión de los vasos linfáticos (B). Desecamiento típico de la copa conocido como «piel de leopardo» de la copa (A) y desecamiento total de la planta por oclusión de los vasos linfáticos (B).

En largos y complejos estudios etiológicos, aún no concluyentes ni exhaustivos, se ha conseguido: I) identificar, mediante ensayos serológicos y moleculares en olivos sintomáticos, pero también en adelfas y almendros con hojas quemadas, y otras especies arbóreas y herbáceas, la bacteria gramnegativa *Xylella fastidiosa* (Well y Raju) subsp. pauca (Cariddi y cols., 2014; Loconsole y cols., 2014); II) aislar la bacteria en cultivo puro (Elbeaino y cols., 2014a), III) secuenciar el genoma de la bacteria (Giampetruzzi y cols., 2015); IV) demostrar que *Philaenus spumarius* L., conocida como espumadora común por la emisión de una secreción glandular abdominal blanca que rodea, como una espuma, a las ninfas protegiéndolas de la desecación y de los enemigos naturales, es la única especie capaz de transmitir la bacteria (Saponari y cols., 2014). En el Salento, este insecto, polífago y con buena adaptabilidad ecológica, no causa daños directos significativos a los cultivos agrarios, pero, desde el punto de vista epidemiológico, es mucho más relevante su capacidad para transmitir bacterias, como *X. fastidiosa*. De hecho, al

ser esta última una bacteria xilemática y asporógena, sólo puede ser transmitida por insectos con aparato bucal picador-chupador (denominados alimentadores de xilema). Una vez adquirida la bacteria, los insectos vectores pueden inocularla en las especies silvestres y cultivadas al alimentarse, pero esta sólo puede multiplicarse en huéspedes susceptibles, dando lugar a infecciones latentes o plantas sintomáticas. Las investigaciones en el campo han evidenciado otros posibles insectos vectores (Elbeaino y cols., 2014b), aunque hasta ahora no se ha demostrado la infectividad.

*X. fastidiosa* es un patógeno de cuarentena, catalogado dentro de la lista de la sección I de la parte A del anexo I de la Directiva 2000/29/CE, y endémico en América, donde causa clorosis variegada de los cítricos (Costa Rica, Brasil) y la enfermedad de Pierce en las vides (California). Su entrada en una zona anteriormente indemne se atribuyó al comercio de material vegetal infectado, hipótesis que se confirmó más tarde, en octubre de 2014, por la interceptación del Servicio Fitosanitario Holandés

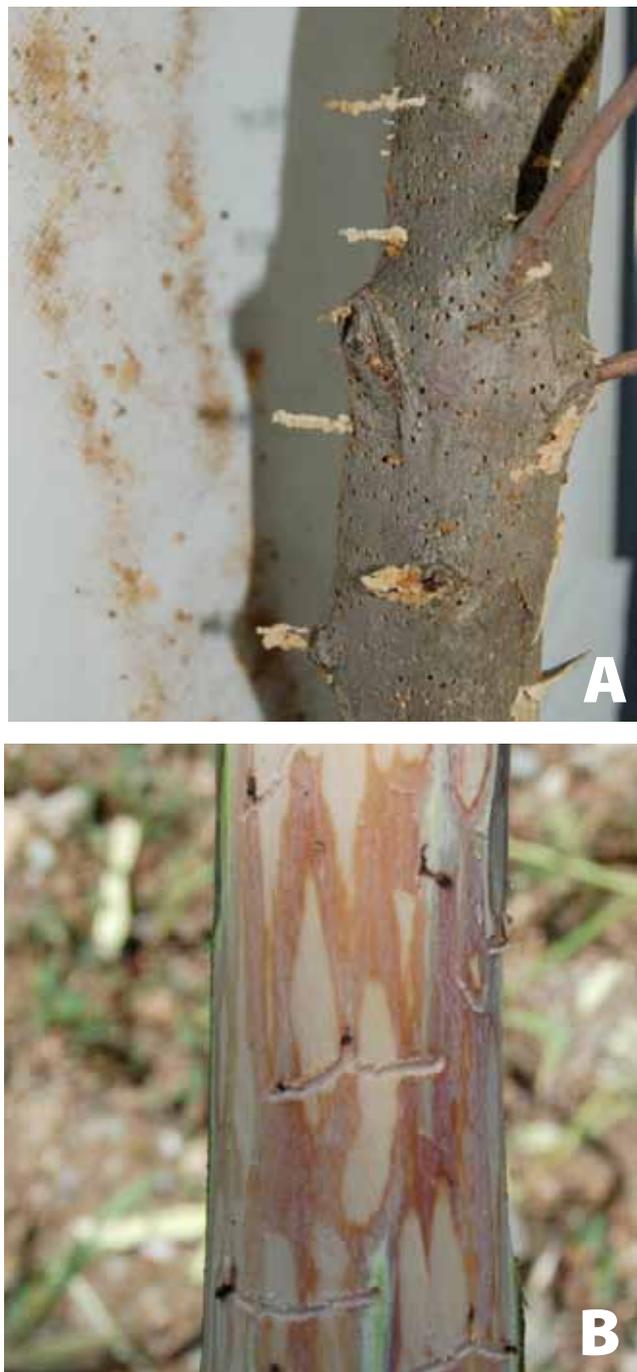
de una partida de plantas ornamentales de café infectadas por *Xylella*, importadas de Costa Rica. Por lo tanto, es muy probable que la cepa CoDiRO sea de origen costarricense, como también parecen confirmar los análisis moleculares (Giampetruzzi y cols., 2015).

El marco normativo actualizado se puede sintetizar de la siguiente manera: el 19 de junio de 2015 se aprueba el Decreto Ministerial “Medidas de emergencia para la prevención, el control y la contención de *Xylella fastidiosa* (Well y Raju) en el territorio de la República Italiana” (boletín oficial n.º 148, de 29 de junio de 2015), en aplicación de la Decisión 2015/789 de la Comisión Europea, de 18 de mayo de 2015, que tiene como objetivo reforzar las medidas de protección para impedir la introducción y propagación de la bacteria en la Unión. El decreto, en vigor desde el 30 de junio de 2015, deroga los anteriores, de 26 de septiembre de 2014 y de 17 de marzo de 2015, de aplicación de la Decisión de ejecución de la UE n.º 2014/497. Entre los aspectos más importantes del decreto se encuentran los siguientes: el refuerzo de la actividad de supervisión en todo el territorio nacional, la definición de las zonas delimitadas, la constitución de la zona infectada (área de asentamiento) y la zona de amortiguamiento (área destinada a limitar la expansión del brote epidémico), la prohibición de introducir en el territorio de la Unión vegetales provenientes de Costa Rica y Honduras, excepto semillas de café, y la individualización de las medidas de erradicación y contención. Teniendo en cuenta la experiencia hasta el momento, las medidas más racionales que deben tomarse se basan en intervenciones agronómicas (en primavera, la siega de las malas hierbas y la labranza del terreno para eliminar etapas jóvenes del vector y reducir el número de insectos adultos capaces de propagar la bacteria), tratamientos contra adultos del insecto vector que hayan podido escapar de las intervenciones anteriores con insecticidas registrados y autorizados en el olivo y la extirpación y destrucción de plantas infectadas.

## Desecamiento causado por el barrenillo del olivo (*Phloeotribus scarabaeoides* [Bernard])

El barrenillo es un coleóptero escolitido de color oscuro, recubierto de pelusa negruzca, de pequeñas dimensiones (2-2,4 mm de largo), pero fuerte, que está extendido por todas las regiones olivícolas mediterráneas y Marruecos (Lozano y cols., 1999) y que ataca al

olivo y a otras oleáceas. Este insecto es xilófago, tanto en las fases larvarias como de adulto, y tiene entre una y tres generaciones al año, dependiendo de la susceptibilidad de los árboles debilitados u otros materiales vegetativos (Russo, 1938; b). Los adultos excavan galerías de alimentación (Fig. 4) en la primavera, al abrigo de las inflorescencias y brotes en crecimiento. Posteriormente, las hembras, seguidas por los machos, excavan galerías de oviposición en las ramas deterioradas o cortadas con la poda, donde se observan muchísimas amalgamas pequeñas de serrín blanquecino.



**Figura 4:** Barrenillo del olivo. El serrín pone de manifiesto la presencia del escolitido en la zona subcortical (A) y las galerías de alimentación (B).

El mayor daño es el causado por los adultos, que, con sus numerosas excavaciones, provocan la muerte de las ramas fructíferas de un año con la consiguiente pérdida de producción, hasta eliminar el 73 % de la cosecha potencial (González y Campos, 1994). En plantas fuertemente debilitadas o recién trasplantadas en el campo, el ataque puede causar la muerte de los sujetos infectados (Benazoun, 1992). El coleóptero escolitido también provoca daños indirectos en cuanto el trips del olivo (*Liothrips oleae*) encuentra refugio para hibernar y poner los huevos en sus cuevas de alimentación.

El barrenillo ataca preferentemente la madera debilitada y con flujo linfático reducido. Los troncos, las ramas y ramas pequeñas fructíferas debilitadas, o que han sufrido daños como consecuencia de acontecimientos climáticos adversos (heladas, sequía prolongada, etc.) son los órganos de la planta más apetitosos para el parásito. Las partes atacadas se debilitan aún más debido a la actividad trófica de las numerosas larvas que se desarrollan bajo la corteza. El barrenillo puede causar daños incluso en los olivos que se encuentran en las inmediaciones de montones de leños de olivo o residuos de la poda que sirven de focos de infestación. En ese caso, las larvas se desarrollan sobre la madera muerta o debilitada (residuos de poda, ramas secas, etc.) y los nuevos adultos van a los olivos sanos durante la fase de alimentación y excavan túneles de nutrición también en las ramas en buen estado vegetativo, provocando la muerte de las ramas pequeñas, las inflorescencias e incluso los frutos jóvenes, y, por tanto, reduciendo significativamente la producción del año.

Los veranos calurosos y secos de los últimos años, como señalan varios informes, han favorecido el desarrollo del barrenillo en olivos de la llanura de Síbari (Calabria), causando la muerte de plantas jóvenes de olivo y el fracaso de nuevas plantaciones del cultivar 'Carolea'. El barrenillo pasa el invierno como larva y/o adulto y, dado que los últimos inviernos han sido particularmente suaves y carentes de heladas prolongadas, esta especie no ha sufrido el daño del frío, multiplicándose de forma desmedida. Además, no se conocen enemigos naturales eficaces y capaces de mantener la población del escolitido dentro de los límites del umbral económico de la intervención.

Por lo tanto, la prevención resulta esencial para protegerse de los ataques de este coleóptero. Para ello, es necesario mantener las plantas en buen estado vegetativo con prácticas de cultivo adecuadas: laboreo del terreno, fertilización equilibrada, riego (donde sea posible), realización de tratamientos fitosanitarios necesarios contra otras adversidades y eliminación, con la poda anual, de las partes de la planta debilitadas o

empobrecidas (Furlong y cols., 2004). Los residuos de la poda invernal representan un posible foco de desarrollo del insecto y deben retirarse lo más rápido posible, al igual que hay que evitar apilar leños de olivo (para chimeneas u hornos) en las proximidades de las plantas cultivadas. Un medio de lucha eficaz consiste en organizar, en el mes marzo, los montones de ramas resultantes de la poda (ramas de cebo), ubicados en las zonas más sombrías dentro del olivar infectado, para atraer a los adultos proliferantes. Estas ramas se retiran y queman a finales del mes de abril, tan pronto como comienza a aparecer el serrín, antes de que vuelen los adultos de la primera generación y vayan a las plantas para reproducirse. Debido a que este pequeño coleóptero se desarrolla en la profundidad de la madera del olivo, resulta muy difícil llegar a él desde el exterior con tratamientos químicos. Se obtienen buenos resultados mediante el uso de deltametrina, que, como otros piretroides (Loch, 2005), es un insecticida que reduce la presencia del barrenillo con una sola aplicación. Sin embargo, la deltametrina es un principio activo de amplio espectro de acción y, por lo tanto, provoca una alta mortalidad de los artrópodos no diana (Ruano y cols., 2008). La contención de *P. scarabaeoides* con deltametrina en los troncos ya colonizados por el insecto es una buena estrategia por diversos motivos: I) evita la dispersión del barrenillo debido al efecto repelente inducido por el insecticida; II) la aplicación del principio activo en los troncos, que no se utilizan para el consumo humano, no causa efectos tóxicos para los seres humanos; III) la población del coleóptero se reduce antes de que ataque a los olivos.

## Consideraciones finales y perspectivas futuras

La problemática fitopatológica del olivo, ilustrada a modo de síntesis en esta revisión, muestra que una protección adecuada debe basarse en unos conocimientos etiológicos precisos, ahora cada vez más determinantes para garantizar el éxito de las medidas fitosanitarias adoptadas. Solo una defensa integrada puede ser la estrategia más eficaz para hacer frente a las nuevas y viejas adversidades que afectan al patosistema olivo y también servir de ejemplo a adoptar para otros cultivos leñosos. La escasa eficacia de los fungicidas y la mayor atención que se presta a los aspectos toxicológicos y ambientales, impuesta por las normativas europeas y nacionales, requieren un enfoque integrado que aproveche el potencial y las peculiaridades de los diferentes

medios de lucha y que actúe de forma preventiva tanto en los olivares viejos como en las plantaciones nuevas. La prevención juega un papel sustancial en el ámbito de los viveros, donde la certificación garantiza no solo la conformidad varietal, sino también el estado fitosanitario de las plantas. En este sentido, los medios de diagnóstico, en particular los moleculares, tales como la PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR), son esenciales en el caso de la verticilosis para verificar la ausencia del patógeno en partes de la planta asintomáticas y también en el terreno (Ceccherini y cols., 2014). La detección de infecciones latentes existentes y/o la presencia de propágulos de *V. dahliae* en el suelo permitiría vigilar la situación de los olivares y evaluar la eficacia de las medidas fitosanitarias aplicadas. En los viveros, el uso de este método permitiría obtener plántulas sanas y evitar la introducción del patógeno en nuevas áreas de cultivo, también a través del terreno contaminado.

La situación actual, tal como ocurrió con el desecamiento rápido del olivo, requiere una mayor vigilancia de la introducción y la circulación de material vegetal a nivel comunitario y nacional para garantizar su salud desde el punto de vista fitosanitario: una vigilancia continua y constante en los olivares y en los viveros y la adopción de pruebas de diagnóstico sistemáticas utilizando protocolos específicos son los requisitos previos que pueden garantizar el mayor éxito posible en la contención de las adversidades antiguas y nuevas.

## Referencias

- AGOSTEO G.E. (2010) – Avversità dell'olivo ed evoluzione dei relativi sistemi di difesa in Calabria fra XVIII e XX secolo. *Petria* 20 (Suppl.1), 41-70.
- AGOSTEO G.E., MAGNANO DI SAN LIO G., CACCIOLA S.O., FRISULLO S. (2002) – Characterisation of the casual agent of olive anthracnose in Southern Italy. *Acta Horticulturae* 586, 713-716.
- BENAZOUN A. (1992) - Contribución al estudio bioecológico del barrenillo *Phloeotribus scarabaeoides* Bern. (Col., Escolítidos) en el olivo en la región de Taroudant, Marruecos. *Olivae* 40, 26-35.
- BLANCO- LÓPEZ M.A., HIEMSTRA J., HARRIS D., LÓPEZ-ESCUADERO F.J., ANTONIOU P. (1998) – Selection and screening for host resistance. In: Himenstra J., Harris D. (eds.) *Compendium of Verticillium wilt in tree species*. Ponsen & Loonijen, Wageningen, 51-54.
- BUBICI G., CIRULLI M. (2014) – Natural recovery from *Verticillium* wilt in olive: can it be exploited in a control strategy? *Plant and Soil* 381, 85-94.
- CACCIOLA S.O., FAEDDA R., SINATRA F., AGOSTEO G.E., SCHENA L., FRISULLO S., MAGNANO DI SAN LIO (2012) – Olive anthracnose. *Journal of Plant Pathology* 94, (1), 29-44.
- CARIDDI C., SAPONARI M., BOSCIA D., DE STRADIS A., LOCONSOLE G., NIGRO F., PORCELLI F., POTERE O., MARTELLI G.P. (2014) – Isolation of a *Xylella fastidiosa* strain infecting olive and oleander in Apulia, Italy. *Journal of Plant Pathology* 96, (2), 425-429.
- CECCHERINI M.T., LUCHI N., PANTANI O.-L., ASCHER J., CAPRETTI P., PIETRAMELLARA G. (2014) – Upward movement of *Verticillium dahliae* from soil to olive plants detected by qPCR. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29, 1961-1967.
- CICCARESE F. (2003) – Grave minaccia all'olivo: la verticilliosi. *Informatore fitopatologico* 53, (12), 17-21.
- CICCARONE A. (1950) – Considerazioni biologiche e sistematiche sull'agente della "lebbra" delle olive, recentemente osservate nel Leccese. *Bollettino della Regia Stazione di Patologia Vegetale di Roma S.III*, 5, 143-165.
- COLLADO-ROMERO M., MERCADO-BLANCO J., OLIVARES-GARCÍA C., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (2008) – Phylogenetic analysis of *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups. *Phytopathology* 98, 1019-1028.
- COLLADO-ROMERO M., MERCADO-BLANCO J., OLIVARES-GARCÍA C., VALVERDE-CORREDOR A., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (2006) – Molecular variability within and among *Verticillium dahliae* vegetative compatibility groups determined by fluorescent amplified fragment length polymorphism and polymerase chain reaction markers. *Phytopathology* 96, 485-495.
- DERVIS S., MERCADO-BLANCO J., ERTEN L., VALVERDE-CORREDOR A., PÉREZ-ARTÉS E. (2010) – *Verticillium* wilt of olive in Turkey: a survey on disease importance, pathogen diversity and susceptibility of relevant olive cultivars. *Eur. J. Plant Pathol.* 127, 287-301.
- ELBEAINO T., VALENTINI F., KUBBA R.A., MUBARAK P., YASEEN T., DI GIARO M. (2014a) – Multilocus sequences typing of *Xylella fastidiosa* isolated from olive affected by "olive quick decline syndrome" in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 53, 3, 533-542.
- ELBEAINO T., YASEEN T., VALENTINI F., BEN MOUSSA I.E., MAZZONI V., D'ONGHIA A.M. (2014b) – Identification of three potential vectors of *Xylella fastidiosa* in southern Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 53, 126-130
- FAEDDA R., AGOSTEO G.E., SCHENA L., MOSCA S., FRISULLO S. MAGNANO DI SAN LIO G., CACCIOLA S.O. (2011) – *Colletotrichum clavatum* sp. nov. identified as the casual agent of olive anthracnose in Italy. *Phytopathologia Mediterranea* 50, 283-302.

- FURLONG M.J., ZU-HUA S., YIN-QUAN L., SIU-JI-AN G., YAO-BIN L., SHU-SHENG L., ZALUCKI M.P. (2004) - Experimental analysis of the influence of pest management practice on the efficacy of an endemic arthropod natural enemy complex of the diamondback moth. *J. Econ. Entomol.* 97, 1814-1827.
- GIAMPETRUZZI A., CHIUMENTI M., SAPONARI M., DONVITO G., ITALIANO A., LOCONSOLE G., BOSCIA D., CARIDDI C., MARTELLI G.P., SALDARELLI P. (2015) - Draft Genome Sequence of the *Xylella fastidiosa* CoDiRO Strain. *Genome Announcements* 3, 1, 1-2.
- GONZÁLEZ R., CAMPOS M. (1994) - A preliminary study of the effect of attack by *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.) (Col., Scolytidae) on the productivity of the olive tree (*Olea europea*). *Bull. Soc. Entomol. Suisse* 67, 67-75.
- HARTMAN H., SCHNATHORST W.C., WHISLER J. (1971) - Oblonga, clonal olive rootstock resistant to *Verticillium* wilt. *Calif. Agric.* 25, 12-15.
- LOCH A.D. (2005) - Mortality and recovery of eucalypt beetle pest and beneficial arthropod populations after commercial application of the insecticide alpha-cypermethrin. *Forest Ecol. Manage.* 217, 255-265.
- LOCONSOLE G., POTERE O., BOSCIA D., ALTAMURA G., DIELOUAH K., ELBEAINO T., FRASHERI D., LORUSSO D., PALMISANO F., SILLETTI M.R., TRISCIUZZI N., VALENTINI F., SAVINO V., SAPONARI M. (2014) - Detection of *Xylella fastidiosa* in olive trees by molecular and serological methods. *Journal of Plant Pathology* 96, (1), 7-14.
- LÓPEZ-ESCUADERO F.J., DEL RIO C., CABALLERI J.M., BLANCO-LÓPEZ M.A., (2004) - Evaluation of olive cultivars for resistance to *Verticillium dahliae*. *Eur. J. Plant Pathol.* 100, 79-85.
- LÓPEZ-ESCUADERO F.J., MERCADO-BLANCO J. (2011) - *Verticillium* wilt of olive: a case study to implement a integrated strategy to control a soil-borne pathogen. *Plant Soil* 344, 1-50.
- LOZANO C., BENAOUN A., KIDD N., CAMPOS M. (1999) - Population dynamics of the bark beetle *Phloeotribus scarabaeoides* Bernard (Coleoptera: Scolytidae), a pest of African olive orchards in Morocco. *African Entomology* 7, (2), 271-275.
- MADAU F.A. (2009) - Evoluzione del mercato internazionale e nazionale del comparto olivicolo. Convegno di studi "Un piano strategico per lo sviluppo dell'olivicoltura del Medio Campidano" Gonnosfanadiga (VS) 7 novembre 2009, 1-21.
- MARTOS-MORENO C., CABALLERO J.M., DEL RÍO C., BLANCO-LÓPEZ M.A. (2001) - Epidemiological behaviour of olive cultivars in orchard infested with mixtures of defoliating and non-defoliating isolates of *Verticillium dahliae*. 8<sup>th</sup> Int. *Verticillium* Symposium, Book of abstracts, Córdoba, Spain, 67.
- MARTOS-MORENO C., LÓPEZ-ESCUADERO F.J., BLANCO-LÓPEZ M.A. (2006) - Resistance of olive cultivars to the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae*. *HortScience* 41, 1313-1316.
- MERCADO-BLANCO J., RODRÍGUEZ-JURADO D., PARRILLA-ARAUJO S., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (2003) - Simultaneous detection of the defoliating and non-defoliating *Verticillium dahliae* pathotypes in infected olive plants by duplex, nested polymerase chain reaction. *Plant Dis.* 87, 1487-1494.
- NAVARRO C., PARRA MA. (2008) - Plantación. In: Barranco D., Fernández-Escobar R., Rallo L., (eds) *El cultivo del olivo*, 6<sup>th</sup> ed. Junta de Andalucía and Ediciones Mundi-prensa, Madrid, 189-238.
- NAVAS-CORTÉS J.A., LANDA B.B., MERCADO-BLANCO J., TRAPERO-CASA J.L., RODRÍGUEZ-JURADO D., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (2008) - Spatiotemporal analysis of spreads of infections by *Verticillium dahliae* pathotypes within a high tree-density olive orchard in Southern Spain. *Phytopathology* 98, 167-180.
- NIGRO F., GALLONE P., ROMANAZZI G., SCHENA L., IPPOLITO A., SALERNO M.G. (2005) - Incidence of *Verticillium* wilt on olive in Apulia and genetic diversity of *Verticillium dahliae* isolates from infected trees. *J. Plant Pathol.* 87, 13-23.
- NIGRO F., GUARIO A., LACCONE G. (2011) - Ultime acquisizioni sull'epidemiologia e sulla protezione della lebbra dell'olivo. 23<sup>o</sup> Forum Medicina vegetale, Bari 15 Dicembre 2011.
- PÉREZ-ARTÉS E., GARCIA-PEDRAJAS M.D., BEJARANO-ALCÁZAR J., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (2000) - Differentiation of cotton-defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* by RAPD and specific PCR analyses. *Eur. J. Plant Pathol.* 106, 507-517.
- PETRI L. (1930) - Azione tossica dell'arseniato sodico sopra le spore del *Gloeosporium olivarum* Alm. *Bollettino della Regia Stazione di Patologia Vegetale di Roma* 10, 359-361.
- RODRÍGUEZ-JURADO D., BLANCO-LÓPEZ M.A., RAPOPORT H., JIMÉNEZ-DÍAZ R.M. (1993) - Present status of *Verticillium* wilt of olive in Andalucía (southern Spain) *Bull OEPP/EPP Bull* 23, 513-516.
- RUANO F., CAMPOS M., SÁNCHEZ - RAYA A.J., PEÑA A. (2008) - Deltamethrin application on colonized olive logs: effect on the emergence of the olive bark beetle *Phloeotribus scarabaeoides* Bernard 1788 (Coleoptera: Scolytidae) and its associated parasitoids. *Crop Protection* 27, 614 - 621.
- RUSSO G., (1938a) - V. Contributo alla conoscenza dei coleoteri scolitidi, fleotribo: *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.). *Fauv. Parte prima: Morfologia, anatomia e istologia.* *Boll. R. Lab. Ent. Agr. Portici* 1, 1-260.

- RUSSO G., (1938b) - VI. Contributo alla conoscenza dei coleoteri scolitidi, fleotribo: *Phloeotribus scarabaeoides* (Bern.). Fauv. Parte seconda: Biografia, simbionti, danni e lotta. Boll. R. Lab. Ent. Agr. Portici 2, 1-419.
- SAPONARI M., BOSCIA D., NIGRO F., MARTELLI G.P. (2013) - Identification of DNA sequenze related to *Xylella fastidiosa* in oleander, almond and olive tree exhibiting leaf scorch symptoms in Apulia (southern Italy). Journal of Plant Pathology 95, 668.
- SAPONARI M., LOCONSOLE G., CORNARA D., YOKOMI R. K., DE STRADIS A., BOSCIA D., BOSCO D., MARTELLI G.P., KRUGNER R., PORCELLI F. (2014) - Infectivity and trasmission of *Xylella fastidiosa* by *Philaenus spumarius* L. (Hemiptera: Aphrophridae) in Apulia, Italy. Journal of Economic Entomology 107, (4), 1316-1319.
- TALHINHAS P., MOTA-CAPITÃO, MARTINS S., RAMOS A.P., NEVES-MARTINS J., GUERRA\_GUIMARÃES L., VÁRZEA V., SILVA M.C., SREENIVASAPRASAD S., OLIVEIRA H. (2011) - Epidemiology, histopathology, and etiology of olive anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* in Portugal. Plant Pathology 60, 483-495.
- TANATOUI A., LACHQER K., SEDRA M.H. (2002) - Vegetative compatibility and pathogenicity of *Verticillium dahliae* isolates from olive (*Olea europea*). Phytopathologia Mediterranea 41, 19-27.
- TJAMOS E.C., THANASSOULOPOULOS C.C., BIRIS D.A. (1985) - Resistance evaluation to *Verticillium dahliae* olive rootstocks. Proc. 3<sup>rd</sup> Nat. Phytopathol. Conf. Hellenic Phytopathol. Soc., 18-19.
- TOSI L., ZAZZERINI A. (1998) - Indagini epidemiologiche sulla verticilliosi dell'olivo nell'Italia centrale. Olivae 71, 50-55.
- TOSI L., ZAZZERINI A. (2000) - Ulteriori indagini su alcuni aspetti epidemiologici della verticilliosi dell'olivo in Umbria. Atti Giornate Fitopatologiche 2, 81-86.
- TOSI L., ZAZZERINI A. (2005) - La difesa integrata dell'olivo dai patogeni vegetali. Informatore fitopatologico LV, 11, 12-18.
- TRAPERO A., BLANCO M.A. (2001) - Enfermedades. In: Barranco D., Fernández-Escobar R., Rallo L., (eds) El cultivo del olivo, 4<sup>th</sup> ed. Junta de Andalucía and Ediciones Mundi-prensa, Madrid, 495-550.
- VIZZARRI V. (2005) - Aspetti epidemiologici di *Verticillium dahliae* Kleb. in oliveti umbri, *screening* per la resistenza e caratterizzazione molecolare degli isolati. Selezione di microrganismi fungini, isolati dal filloplano, per possibili applicazioni in lotta biologica. Tesi di Dottorato, XIX Ciclo, Università degli Studi di Perugia, A.A. 2005/2006, 122 pp.



Príncipe de Vergara, 154.  
28002 Madrid, España  
Tel.: 34-915 903 638  
Fax: 34-915 631 263

E-mail: [iooc@internationaloliveoil.org](mailto:iooc@internationaloliveoil.org)

[www.internationaloliveoil.org](http://www.internationaloliveoil.org)