

## DETERMINACIÓN DEL UMBRAL MÁXIMO TOLERABLE DE FRUTA INFECTADA POR *COLLETOTRICHUM* SPP. PARA LA OBTENCIÓN DE ACEITE DE OLIVA EXTRA VIRGEN

Paula Conde <sup>1</sup>, Juan José Villamil <sup>1</sup>, Alejandro Fredes <sup>1</sup>, Juliana Bruzzone <sup>1</sup>, Cecilia Martínez <sup>1</sup>, María José Montelongo <sup>2</sup>, Ana Claudia Ellis <sup>3</sup>, Adriana Gámbaro <sup>3</sup>, Carolina Leoni <sup>1</sup>.

### Introducción

La Antracnosis o Aceituna jabonosa, causada por *Colletotrichum* spp., es una de las principales enfermedades del olivo en nuestro país. Durante la etapa de mayor susceptibilidad del fruto (envero a cosecha) las condiciones climáticas del país son altamente predisponentes al desarrollo de la enfermedad, convirtiéndola en una de las principales limitantes del cultivo. Provoca podredumbres en fruto, pérdida de peso y caída prematura de los mismos. El aceite elaborado con los frutos afectados, puede presentar alteraciones en el color, elevada acidez y mala calidad organoléptica (Trapero y Blanco, 2008).

La incidencia de la enfermedad varía según la susceptibilidad varietal, las condiciones climáticas y la virulencia del patógeno (Trapero y Blanco, 2008). Arbequina es la variedad más plantada en Uruguay y presenta una moderada susceptibilidad a esta enfermedad, en tanto Frantoio presenta una baja susceptibilidad. En cuanto al patógeno, en el país al momento se han identificado tres especies causando la enfermedad: *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *C. fragariae*, con niveles variables de agresividad (Montelongo *et al.*, 2012).

Existe una relación directa entre la composición físico-química (compuestos volátiles y fenólicos) de los aceites y su perfil sensorial. Es por ello que una completa caracterización de los aceites en estudio debe tener en cuenta la calidad sensorial de cada uno de ellos (Manai *et al.*, 2007). Este trabajo pretendió determinar el nivel máximo aceptable de fruta infectada con *Colletotrichum* spp. para obtener aceite de oliva de calidad extra virgen, en función de los estándares establecidos por el Consejo Oleícola Internacional (COI) (COI, 2011) para composición físico-química y perfil sensorial.

---

<sup>1</sup> Programa Nacional de Investigación Producción Frutícola, INIA Las Brujas, Uruguay.

<sup>2</sup> Unidad de Fitopatología, Departamento de Protección Vegetal, Facultad de Agronomía. Universidad de la República, Uruguay.

<sup>3</sup> Sección Evaluación Sensorial. Departamento de Alimentos. Facultad de Química. Universidad de la República, Uruguay.

## Materiales y Métodos

Para determinar el efecto del nivel de infección por *Colletotrichum* sp. sobre la calidad del aceite se conformaron lotes de fruta con niveles creciente de olivas artificialmente infectada por *Colletotrichum acutatum*, a partir de los cuales se extrajo el aceite. Los aceites obtenidos fueron analizados para determinar su composición físico-química y su perfil sensorial. El experimento se realizó con olivas cosechadas en dos temporadas (2012 y 2013) y en dos variedades: Arbequina y Frantoio.

### Conformación de los lotes de aceitunas con niveles creciente de fruta infectada con *C. acutatum*

Se conformaron lotes de fruta combinando fruta sana (sin síntomas visuales de la enfermedad) y fruta inoculada con *C. acutatum*. Los niveles de fruta infectada en los diferentes lotes fueron: 0; 0,5; 1,5; 3,0; 5,0; 7,5 y 10%.

Los frutos sanos se cosecharon, se lavaron y deshojaron. Los frutos infectados se obtuvieron luego de ser desinfestados superficialmente e inoculados mediante inmersión por 30 minutos en una suspensión de  $1 \times 10^6$  conidios/ml de *C. acutatum* (aislado 96 – FAGRO, Montelongo *et al.*, 2012), e incubados en cámara húmeda a 24°C por 12 días.

Cuadro 1: Fecha de cosecha e índice de madurez de las olivas para las variedades Arbequina y Frantoio, en las temporadas 2012 y 2013.

	Arbequina		Frantoio	
	Fecha cosecha	Índice de Madurez	Fecha cosecha	Índice de Madurez
2012	06/06	2,9	19/06	1,6
2013	15/04	1,9	09/05	2,4

### Análisis físico-químico de los aceites

Previo a la extracción del aceite, en cada uno de los lotes se determinó el tenor graso (% en base seca) según el método de extracción en Soxhlet con n-hexano (AOAC, 1990) y el contenido de humedad (%) mediante secado en estufa de aire forzado a 105°C (AOAC, 1990), a partir de una muestra de 200 g de fruta. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento.

Los distintos lotes de fruta se procesaron en una almazara Oliomio de 50 kg/hora de capacidad instalada en INIA. En cada lote de aceite se determinó:

- 1- Acidez expresada como % de ácido oleico libre (Norma UNIT 1048:99, ISO 660:1996).
- 2- Índice de peróxidos (Norma ISO 3960:2001).
- 3- Absorbancia ultravioleta: K232, K270,  $\Delta K$  (Norma COI/T.20/Doc. n° 19).
- 4- Contenido de polifenoles totales (extracción en metanol:agua 80:20, y posterior determinación en espectrofotómetro por desarrollo de color con el reactivo de Folin-Denis a 725 nm. Se expresaron los resultados como mg de polifenoles totales (equivalentes a ácido gálico) por kg de aceite (Aytton *et al.* 2007).

Los cuatro parámetros se analizaron dentro de los 30 días siguientes a la extracción y filtrado del aceite. Los datos fueron analizados según ANOVA.

### Análisis sensorial de los aceites

Los diferentes aceites extraídos a partir de los lotes preparados con la cosecha 2012 fueron evaluados por el panel de cata de aceite de oliva de Facultad de Química, en el Laboratorio de Evaluación Sensorial acondicionado según Norma ISO 8589/88. Los integrantes del panel fueron seleccionados y entrenados de acuerdo a la normativa COI/T20/Doc. N°15. En cada sesión se evaluaron cuatro muestras presentadas a los catadores en copas de cata normalizadas según UNE 55-121-79, termostalizadas a  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . Se evaluó la intensidad de los atributos positivos y los defectos con una escala de 10 puntos. Según dichas escalas, un aceite para ser calificado como *virgen extra* debe tener 0 en la mediana de percepción de intensidad de defectos y un frutado positivo. Se complementó la evaluación con una cata descriptiva que incluyó los descriptores: verde hierba/hoja, higuera, tomate, manzana, banana, fruto seco, dulce, astringente y otros. Como borradores se utilizaron yogurt natural, manzana verde y agua sin gas. La evaluación sensorial se realizó dentro de los 30 días siguientes a la extracción y filtrado del aceite.

## Resultados y discusión

### Análisis físico-químico de los aceites

**El rendimiento graso** no mostró diferencias significativas ante el aumento del nivel de infección en las variedades evaluadas, en las temporadas 2012 y 2013 (Cuadro 2). Para Arbequina los valores de tenor graso promedio en base seca fueron de 42% y 45% mientras que para Frantoio los valores fueron de 44% y 43%, para las temporadas 2012 y 2013 respectivamente.

Cuadro 2: Media de tenor graso (% en base seca) y contenido de humedad (%) evaluados en los aceites de Arbequina y Frantoio. 2012

% de fruta inoculada	Arbequina				Frantoio			
	2012		2013		2012		2013	
	Tenor graso (%)	Humedad (%)	Tenor graso (%)	Humedad (%)	Tenor graso (%)	Humedad (%)	Tenor graso (%)	Humedad (%)
0	41,2	62	47,6	60	39,4	52	42,5	51
0,5	38,5	61	45,0	58	43,6	55	44,1	50
1,5	42,0	60	46,5	63	43,4	54	41,8	50
3,0	44,1	61	45,2	61	44,6	54	41,6	50
5,0	42,0	61	44,2	59	47,7	53	41,8	51
7,5	42,6	61	43,6	57	45,4	54	43,3	52
10,0	44,5	60	---	---	41,6	52	---	---
<i>Promedio</i>	<b>42,1</b>	<b>61</b>	<b>45,3</b>	<b>60</b>	<b>43,7</b>	<b>53</b>	<b>42,5</b>	<b>51</b>

**La acidez** fue significativamente mayor a mayores niveles de fruta infectada, y la variedad Frantoio fue más sensible que Arbequina. Según el COI (2011), para calificar como aceite virgen extra la acidez debe ser inferior a 0.8%. Porcentajes de infección

en fruta superiores a 7,5% y 5% en Arbequina y 5% y 3% en Frantoio, en los aceites de las temporadas 2012 y 2013 respectivamente, superaron dicho valor (Cuadros 3 a 6).

Tanto el **índice de peróxidos** como el **contenido de polifenoles totales** no fueron afectados por los niveles crecientes de infección en fruta en las variedades evaluadas, salvo Frantoio en la temporada 2013 (Cuadros 3 a 6). El índice de peróxidos para todos los aceites fue menor a 20 meq O<sub>2</sub>/kg de aceite, valor establecido por COI para el aceite virgen extra (COI, 2011).

Según el COI (2011), para calificar como aceite virgen extra los **valores de absorbancia** establecidos son: K232 ≤ 2,5, K270 ≤ 0,22 y ΔK ≤ 0,01. En general los valores obtenidos para los diferentes aceites se encontraron dentro de los límites definidos por COI para los aceites virgen extra, salvo para K270 en los tratamientos de Arbequina con 7,5 y 10% de fruta infectada en 2012 (Cuadros 3 a 6).

Cuadro 3: Media de los parámetros químicos evaluados en los aceites de Arbequina en las temporadas 2012.

% de fruta inoculada	Acidez <sup>1</sup>	Índice de peróxidos <sup>2</sup>	Absorbancia			Polifenoles totales
			K232	K270	ΔK	
0	0,23	3,62	0,975	0,026	-0,00017	52,6
0,5	0,28	3,23	0,982	0,031	-0,00039	57,3
1,5	0,32	3,72	0,938	0,031	-0,00022	52,5
3,0	0,67	3,66	1,032	0,203	0,00189	57,5
5,0	0,53	3,32	1,007	0,143	0,00083	56,1
7,5	0,81	3,30	1,039	0,243	0,00206	52,8
10,0	1,20	2,70	0,910	0,259	0,00261	49,0
<i>Pr (&gt;F)</i>	<i>0,0006</i>	<i>0,4700</i>	<i>0,9400</i>	<i>&lt;0,0001</i>	<i>0,0014</i>	<i>0,5800</i>

<sup>1</sup> Acidez expresada como % de ácido oleico libre

<sup>2</sup> expresado como meq O<sub>2</sub>/kg de aceite

Cuadro 4: Media de los parámetros químicos evaluados en los aceites de Arbequina en las temporadas 2013

% de fruta inoculada	Acidez <sup>1</sup>	Índice de peróxidos <sup>2</sup>	Absorbancia			Polifenoles totales
			K232	K270	ΔK	
0	0,24	3,03	0,727	0,170	0,00133	45,4
0,5	0,32	2,80	0,760	0,161	0,00167	44,0
1,5	0,60	2,87	0,772	0,175	0,00150	47,2
3,0	0,73	3,06	0,671	0,121	0,00100	49,1
5,0	0,91	3,26	0,671	0,166	0,00167	48,3
7,5	1,36	3,40	0,648	0,113	0,00100	51,2
<i>Pr (&gt;F)</i>	<i>&lt;0,0001</i>	<i>0,0364</i>	<i>&lt;0,0001</i>	<i>0,0018</i>	<i>0,3600</i>	<i>0,2510</i>

<sup>1</sup> Acidez expresada como % de ácido oleico libre

<sup>2</sup> expresado como meq O<sub>2</sub>/kg de aceite

Cuadro 5: Media de los parámetros químicos evaluados en los aceites de Frantoio en las temporadas 2012.

% de fruta inoculada	Acidez <sup>1</sup>	Índice de peróxidos <sup>2</sup>	Absorbancia			Polifenoles totales
			K232	K270	ΔK	
0	0,20	4,92	0,804	0,146	0,00033	107,5
0,5	0,24	4,84	0,628	0,126	-0,00161	118,9
1,5	0,42	4,76	0,904	0,082	0,00011	109,7
3,0	0,60	5,16	1,003	0,125	-0,00022	125,2
5,0	0,87	5,01	0,947	0,143	0,00022	121,0
7,5	1,36	5,00	0,980	0,143	0,00061	119,3
10,0	1,58	5,19	1,002	0,151	0,00061	118,2
<i>Pr (&gt;F)</i>	<i>0,0001</i>	<i>0,9900</i>	<i>0,1200</i>	<i>0,5200</i>	<i>0,3800</i>	<i>0,9100</i>

<sup>1</sup> Acidez expresada como % de ácido oleico libre<sup>2</sup> expresado como meq O<sub>2</sub>/kg de aceite

Cuadro 6: Media de los parámetros químicos evaluados en los aceites de Frantoio en las temporadas 2013.

% de fruta inoculada	Acidez <sup>1</sup>	Índice de peróxidos <sup>2</sup>	Absorbancia			Polifenoles totales
			K232	K270	ΔK	
0	0,61	4,88	0,742	0,090	0,00022	118,6
0,5	0,71	4,83	0,715	0,082	0,00044	136,0
1,5	0,79	4,93	0,687	0,102	0,00028	135,6
3,0	0,89	5,30	0,722	0,119	0,00094	135,2
5,0	1,04	6,50	0,612	0,165	0,00161	125,5
7,5	1,22	7,27	0,739	0,123	0,00083	128,7
<i>Pr (&gt;F)</i>	<i>&lt;0,0001</i>	<i>&lt;0,0001</i>	<i>0,464</i>	<i>&lt;0,0001</i>	<i>&lt;0,0001</i>	<i>0,786</i>

<sup>1</sup> Acidez expresada como % de ácido oleico libre<sup>2</sup> expresado como meq O<sub>2</sub>/kg de aceite

### Análisis sensorial de los aceites

Para ambas variedades, los aceites con niveles de fruta infectada por *C. acutatum* superiores a 5% presentaron defectos graves por lo cual no fueron sometidos al análisis por el panel de cata. En la variedad Arbequina, calificaron como aceites virgen extra los provenientes de los tratamientos con niveles de infección 0% y 0,5%, mientras que en la variedad Frantoio fueron calificados como virgen extra los aceites con 0%, 0,5% y 1,5% de fruta infectada por *C. acutatum* (Figura 1).

El aceite de oliva sin fruta afectada de la variedad Arbequina presentó un perfil sensorial de frutado en intensidad leve a medio y un amargo y picante muy leves, mientras que el de Frantoio presentó un frutado medio a leve, y un amargo y picante leves.

En el aceite de Arbequina, a mayor porcentaje de fruta infectada disminuye el atributo positivo “frutado”, mientras que los atributos “amargo” y “picante” se mantienen estables. Por otra parte, en el aceite de Frantoio, el atributo “frutado” se mantiene estable para los niveles de infección en fruta evaluados, y los atributos “amargo” y “picante” aumentan respecto al aceite sin infección (Figura 1).

Cabe resaltar que el atributo “frutado” fue similar en los aceites provenientes de las dos variedades, mientras que los aceites de Frantoio presentaron registros mayores de “amargo” y “picante”. Valores altos de estos atributos son característicos de la variedad y se vieron intensificados por el bajo índice de madurez de la fruta empleada en la obtención de los aceites (Cuadro 1).

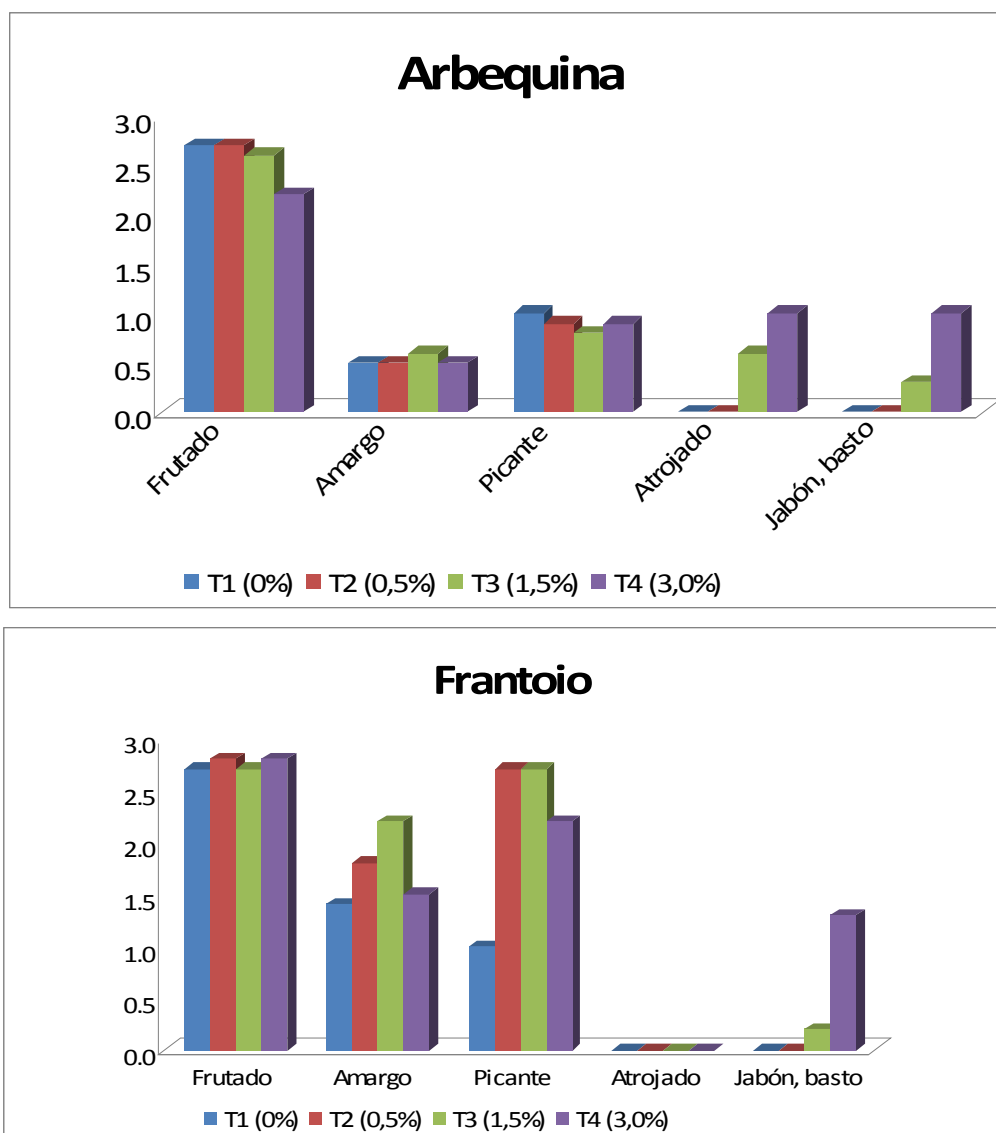


Figura 1. Intensidad de los principales atributos (frutado, amargo, picante) y defectos (atrojado, jabón-basto) evaluados por el panel de cata, en aceites de Arbequina y Frantoio de la temporada 2012, para su calificación como aceite virgen extra.

### Consideraciones finales

En el análisis físico-químico, los niveles crecientes de infección por *C. acutatum* resultaron en un aumento en la acidez del aceite de oliva, coincidente con los resultados de García-Figueres *et al.* (1997) para *Colletotrichum gloeosporioides*. En nuestras evaluaciones los aceites de Frantoio con 3% y 5% de fruta infectada y de

Arbequina con 5% y 7.5 % presentaron acidez no aceptada por el COI para caracterizar como virgen extra (> a 0.8).

En el análisis sensorial, los niveles de infección por *C. acutatum* mayores a 1.5 % en la variedad Arbequina y a un 3% en la variedad Frantoio resultaron en aceites que no califican como “virgen extra”. El perfil sensorial propio de cada variedad de aceite influye en la detección del defecto “jabón-basto” por parte de los jueces entrenados, observándose que un amargo y un picante más intenso, como en el caso del Frantoio, enmascaran la percepción de este defecto.

Al combinar los resultados de los análisis físico-químico con los sensoriales, se observa que los niveles tolerables de infección por *C. acutatum* para calificar como aceite “virgen extra” son diferentes. El análisis sensorial fue más exigente que el físico-químico para calificar los aceites. Estos resultados concuerdan con lo establecido por Manai *et al.* (2007), los cuales sostienen que una completa caracterización de los aceites debe tener en cuenta la calidad sensorial de los mismos, si bien existe una relación directa entre la composición físico-química (compuestos volátiles y fenólicos) de los aceites y su perfil sensorial.

## Bibliografía

- Ayton, J., R. J. Mailer, A. Haigh, D. Tronson, D. Conlan. 2007. Quality and oxidative stability of Australian olive oil according to harvest date and irrigation. *Journal of Food Lipids* 14:138-156.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th Edition.
- Barranco, D.; Cimato, A.; Fiorino, P.; Rallo, L.; Touzani, A.; Castañeda, C.; Serafín, F.; Trujillo, I. 2000. *Catálogo Mundial de variedades de Olivo*. Consejo Oleícola Internacional. 360 pp.
- COI - Consejo Oleícola Internacional. 2011. Trade standard applying to olive oils and olive-pomace oils. COI/T.15/NC No 3/Rev. 6. November 2011. 19 p.
- García-Figueroles, F.; Duatis Monllaó, J.J.; Marco Sanz, V.; Pedret Tena, E. 1997. Influencia de los ataques fúngicos en la pérdida de calidad del aceite de oliva. *Fruticultura profesional* N° 88. Especial olivicultura II. pp. 131- 135.
- Manai, H.; Gallardo Gonzalez, L.; Haddada, F.; Sánchez Casas, J.; Osorio Bueno, E.; Zarrouk, M. 2007. Sensory characteristics of virgen olive oils from monovarietal Tunisian cultivars and hybrids with European varieties. *Grasas y aceites* Vol:58, N° 2.
- Montelongo, M.J., Hernandez, L., Casanova, L. Conde, P., Alaniz, S. 2012. Characterization of *Colletotrichum* spp. causing olive anthracnose in Uruguay. *In: Proceedings VIIth International Symposium on Olive growing*. San Juan, Argentina. Setiembre 2012.
- Trapero, A.; Blanco, M.A. 2008. Enfermedades. *In: El cultivo del olivo* (D. Barranco, R. Fernández-Escobar y L. Rallo, eds.). Mundi Prensa-Junta de Andalucía, Madrid, pp. 595-656.