

Patrones metabólicos en la ruta de la lipoxigenasa asociados a los atributos de frutado del aceite de oliva virgen extra

Sonia Tomé Rodríguez¹, Carlos Augusto Ledesma Escobar¹, Mónica Calderón Santiago¹, José María Penco-Valenzuela², Feliciano Priego Capote¹

¹Departamento de Química Analítica, Universidad de Córdoba

²Asociación Española de Municipios del Olivo (AEMO)

El frutado es una de las características organolépticas más apreciadas de los aceites de oliva virgen extra (AOVEs), que se clasifican en función de la intensidad y tipología del frutado. En este estudio, determinamos los principales volátiles C₅ y C₆ formados a través de la vía de la lipoxigenasa (LOX) en 200 AOVEs producidos en dos campañas agronómicas. Los resultados obtenidos mediante análisis químico se correlacionaron con el perfil de frutado determinado mediante el Panel Test. Mediante herramientas de análisis multivariante se identificó que reacciones enzimáticas permiten establecer diferencias en la intensidad y tipo de frutado en función de la concentración de volátiles C₅ y C₆. Así, la intensidad del frutado se explicó especialmente por la conversión de 3-hexenal a 2-hexenol y 3-hexenol, mientras que el tipo de frutado estuvo condicionado por las tres rutas de la vía LOX que conducen a la formación de volátiles C₅ y C₆.

Introducción

El aceite de oliva virgen extra (AOVE) es muy apreciado gastronómicamente por sus excelentes propiedades organolépticas y saludables. Los beneficios nutricionales del AOVE se atribuyen principalmente a un alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados (MUFAs), predominantemente ácido oleico. Sin embargo, estos beneficios también están relacionados con una fracción minoritaria caracterizada por una amplia diversidad química que incluye fenoles, escualeno, fitoesteroles, carotenoides, ácidos terpénicos, pigmentos, tocoferoles y volátiles [1,2,3].



Las propiedades organolépticas están especialmente asociadas a la presencia de dos familias de compuestos, fenoles y volátiles. Los compuestos fenólicos son los responsables de las notas sensoriales de amargor y picor de ciertos AOVEs [4,5], mientras que los volátiles, con especial énfasis en aldehídos, alcoholes, cetonas, ésteres, furanos e hidrocarburos, se asocian al aroma. Numerosos estudios han caracterizado la fracción volátil de los AOVE. Un ejemplo representativo es la investigación realizada por García-Vico *et al.*, en la cual evaluaron la variabilidad del perfil volátil de AOVEs de un conjunto de 36 variedades de olivo que representaban una amplia diversidad genética [6]. En un estudio reciente, Tomé-Rodríguez *et al.* analizaron el perfil volátil de AOVEs obtenidos en dos temporadas consecutivas para evaluar la influencia de la variedad y la variabilidad interanual. La variedad se identificó como la principal fuente de variabilidad y los volátiles C_6/C_5 permitieron discriminar las variedades en dos clústeres (Clúster 1: 'Arbequina', 'Coratina' y 'Frantoio'; Clúster 2: 'Cornicabra', 'Hojiblanca', 'Picual' y 'Picuda') [7].

El Panel Test es el método oficial para la clasificación de los aceites de oliva vírgenes (AOV) según sus características organolépticas (defectos y atributos positivos). Esta evaluación la lleva a cabo un grupo de catadores debidamente formados según lo establecido por el Consejo Oleícola Internacional [8] y descrito en el Reglamento (UE) n° 2016/1227 de la Comisión Europea de 27 de julio de 2016 [9]. A pesar del aceptable rendimiento atribuido al Panel Test, este método no proporciona información sobre los patrones químicos asociados a los principales atributos. Por este motivo, existe una demanda de estrategias analíticas que permitan dilucidar la complejidad de las notas sensoriales del AOVE y los volátiles responsables de las características tanto positivas como negativas.

El frutado es uno de los principales atributos que permite clasificar los AOVEs teniendo en cuenta criterios de intensidad y complejidad. Varios estudios han asociado las notas verdes y el carácter frutado de los aceites de oliva a los volátiles C_6 y C_5 , formados por la degradación de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) a través de una serie de reacciones enzimáticas denominada vía de la lipoxigenasa (LOX) que tiene lugar durante el proceso de extracción del aceite [10,11,12]. Teixeira *et al.* (2020) realizaron una

clasificación de muestras de AOVE en función de la intensidad del frutado mediante la aplicación de una nariz electrónica, que permitió diferenciar los AOVes en frutado maduro, frutado verde ligero, medio o intenso [13]. Además, da Costa *et al.* caracterizaron el perfil volátil de 19 muestras de AOVE de Campanha Gaúcha y Serra da Mantiqueira y encontraron una correlación de volátiles C₅ y C₆ con notas verdes, maduras y frutadas [14]. La principal limitación de estos estudios fue el reducido número de muestras utilizadas para explicar las correlaciones observadas. Además, la variabilidad en la composición de los AOVes se restringió a un área geográfica limitada. Con estas premisas, existe una demanda de estudios que permitan correlacionar los atributos asociados al frutado con los cambios metabólicos que ocurren en la vía LOX y, en particular, con los volátiles dominantes C₅ y C₆. Por ello, en el presente estudio se analizaron 200 muestras de AOVE para determinar los volátiles C₅ y C₆ formados en la ruta LOX con los siguientes objetivos: (i) encontrar patrones de correlación entre los componentes volátiles y los atributos de frutado, para buscar una estrategia de clasificación preliminar con un grupo de muestras de AOVE producidas en dos campañas agronómicas consecutivas; (ii) identificar los perfiles volátiles representativos de frutado intenso frente al medio; y (iii) discriminar los perfiles volátiles representativos del frutado verde frente al maduro. Las clasificaciones organolépticas se apoyaron en el análisis de las muestras por el Panel Test con la participación de veinticinco catadores profesionales.

Materiales y métodos

Muestras y patrones químicos

Se analizaron por triplicado un total de 200 AOVes de diferentes variedades (monovarietales o mezclas), procedencias geográficas y régimen de cultivo (ecológicos o no). Las muestras fueron proporcionadas por el comité organizador de la Guía de los 100 mejores AOVes del mundo de EVOOLEUM (Mercacei y AEMO, España). Concretamente, correspondieron al top 100 de AOVes incluidos en las Guías Edición 2018 y 2019, que contienen información sobre los AOVes producidos en las campañas agronómicas 2017/2018 y 2018/2019, respectivamente.

Los estándares comerciales trans-2-hexen-1-ol (pureza del 96 %), cis-3-hexen-1-ol (pureza del 98 %), 1-penten-3-ol (pureza del 99 %), 1-penten-3-ona (pureza del 97 %), hexanol (pureza \geq 99 %), cis-3-hexenal (patrón analítico), trans-2-pentenal (patrón analítico), hexanal (pureza del 98 %) y trans-2-hexenal (pureza del 98%) se adquirieron en Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania). Estos volátiles se pueden identificar en la Figura 1 que muestra la vía de la LOX.

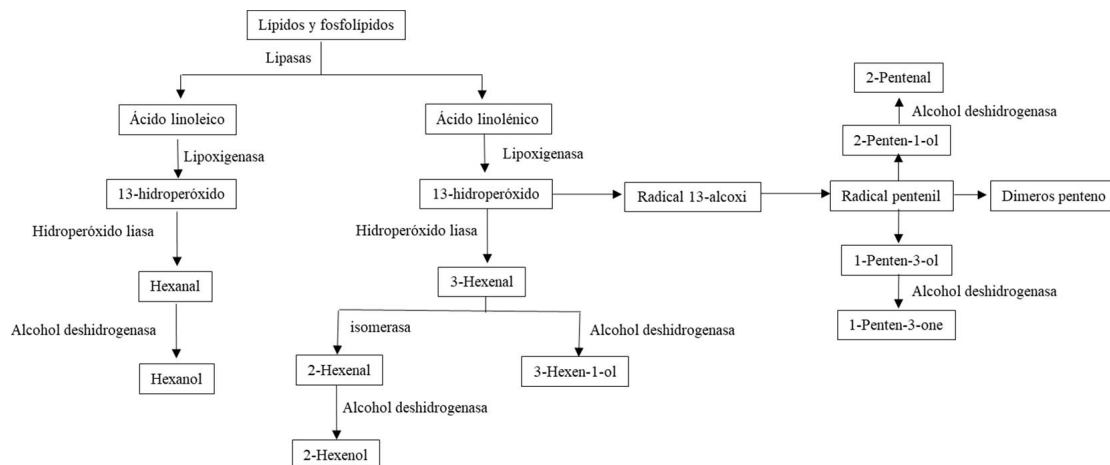


Figura 1. Vía de la lipoxigenasa para la formación de volátiles C₅-C₆ en aceites de oliva.

Aparatos e instrumentos

Los compuestos volátiles se midieron en muestras de AOVE mediante HS-GC-TOF/MS. Para ello, los volátiles del AOVE se extrajeron con un automuestreador automático de alta precisión Agilent 7694A (Waldbronm, Alemania) y se determinaron mediante un cromatógrafo de gases (Agilent 7890B) acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo híbrido de tiempo de vuelo (QTOF) (Agilent 7200) en modo de alta resolución y equipado con una fuente de impacto de electrones. La separación cromatográfica de los volátiles se llevó a cabo utilizando una columna capilar de sílice fundida HP-5MS UI (30 m × 0.25 mm de diámetro interno, 0.25 µm de espesor de película, Agilent).

Análisis sensorial

La evaluación organoléptica de las muestras de AOVE fue realizada por un grupo de veinticinco catadores. Cada muestra de AOVE fue evaluada por cinco catadores siguiendo las recomendaciones del Consejo Oleícola Internacional [8]. Los 20 mejores AOVE de cada edición fueron evaluados por todos los catadores. Las muestras de AOVE se calificaron cuantitativamente en términos de intensidad y complejidad del frutado. En las dos ediciones, los 100 mejores AOVes se puntuaron con un mínimo de 26 puntos sobre 30 en intensidad y un mínimo de 16 puntos sobre 20 en complejidad frutal. A continuación, los AOVes se categorizaron cualitativamente según ambos atributos. Así, los AOVE se clasificaron en 'Muy intenso', 'Intenso' y 'Medio', mientras que el tipo de frutado se clasificó en 'Verde', 'Verde con notas maduras' y 'Maduro'.

Resultados y discusión

Discriminación de AOVes por características organolépticas según la vía LOX

En este estudio se consideraron un total de 9 volátiles formados en la vía LOX. Se detectaron en todas las muestras tras la confirmación mediante el análisis de disoluciones estándar en metanol. Los AOVes se agruparon en tres clústeres teniendo en cuenta la clasificación asignada por el Panel Test. Concretamente, se clasificaron por intensidad de frutado en 'Muy intenso' (n = 24), 'Intenso' (n = 117) y 'Medio' (n = 37). Por otro lado, los AOVes también se clasificaron según el tipo de frutado en 'Verde' (n = 117), 'Verde con notas maduras' (n = 22) y 'Maduro' (n = 53). La Figura 2 muestra los gráficos de análisis de componentes principales (PCA) de los AOVes identificados según ambas

clasificaciones, para explicar la variabilidad en cuanto a la concentración de volátiles. Se observó una clara separación entre los AOVes 'Muy intensos' y 'Medios', mientras que los AOVes 'Intensos' se distribuyeron en el espacio entre ambos grupos (Figura 2A). Un comportamiento similar ocurrió con el tipo de frutado, ya que los AOVes 'Verde' y 'Maduro' estaban bien separados en dos grupos, mientras que los aceites etiquetados como 'Verde con notas maduras' aparecían dispersos a lo largo del gráfico (Figura 2B). El PCA explicó el 80.4 % de la variabilidad total (PC1 = 44.8 %, PC2 = 17.9 % y PC3 = 17.7 %). Así, los volátiles C₅ y C₆ formados a partir de los ácidos linolénico y linoleico podrían explicar la variabilidad asociada al frutado considerando el grado de intensidad y el tipo de frutado.

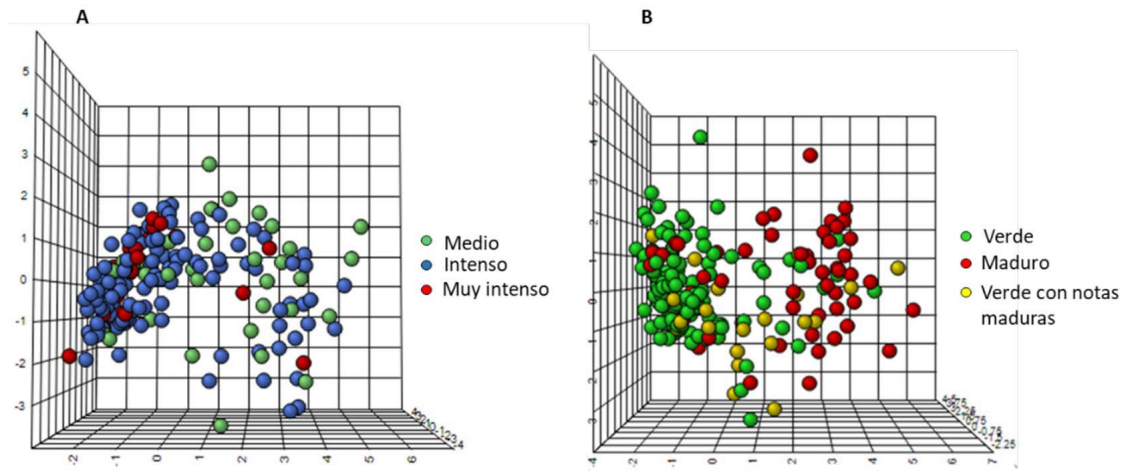


Figura 2. Gráficos PCA para (A) intensidad y (B) tipo de frutado.

Contribución de los volátiles C₅ y C₆ a explicar el frutado

Una vez observada la contribución de los volátiles C₅ y C₆ para explicar el carácter frutado de los AOVes, se llevó a cabo un análisis Random Forest para identificar aquellos volátiles con mayor capacidad para discriminar los atributos del frutado (Figura 3). Tanto para la intensidad como para el tipo de frutado, el 1-penten-3-ol y el 2-hexenol fueron los volátiles con mayor capacidad discriminante. Asimismo, el 1-penten-3-ona y el hexanal contribuyeron a separar los tres clústeres por intensidad de frutado, mientras que el 2-hexenal y el hexanol lo hicieron para la tipología.

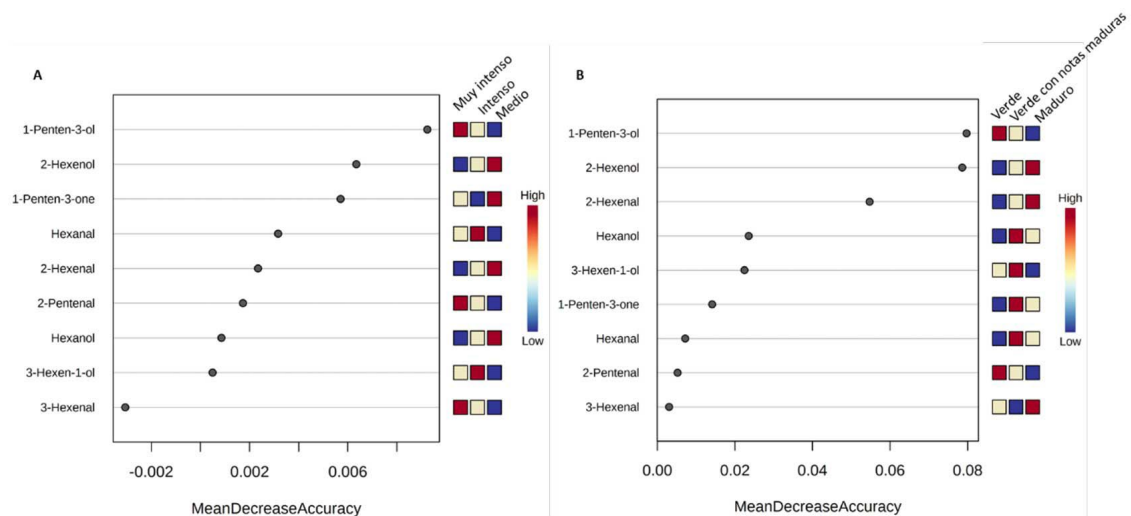


Figura 3. Análisis Random Forest para (A) intensidad y (B) tipo de frutado.

Complementariamente, se aplicó un análisis de mapa de calor para examinar el efecto de agrupamiento asociado a la abundancia relativa de volátiles detectados (Figura 4). Así, 1-penten-3-ona, hexanol, 2-hexenal y 2-hexenol se encontraron en mayor concentración en los AOVEs con un frutado de intensidad 'Media', mientras que hexanal, 3-hexenol, 1-penten-3-ol, 2-pentenal y 3-hexenal estaban más concentrados en los AOVEs 'Muy intensos'. Por otro lado, el frutado 'Maduro' se asoció con una alta abundancia de 3-hexenal, 2-hexenal y 2-hexenol, mientras que la nota 'Verde' se ajustó a una mayor concentración de 2-pentenal y 1-penten-3-ol. El frutado 'Verde con notas maduras' estuvo marcado por un predominio de 1-penten-3-ona, hexanal y hexanol.

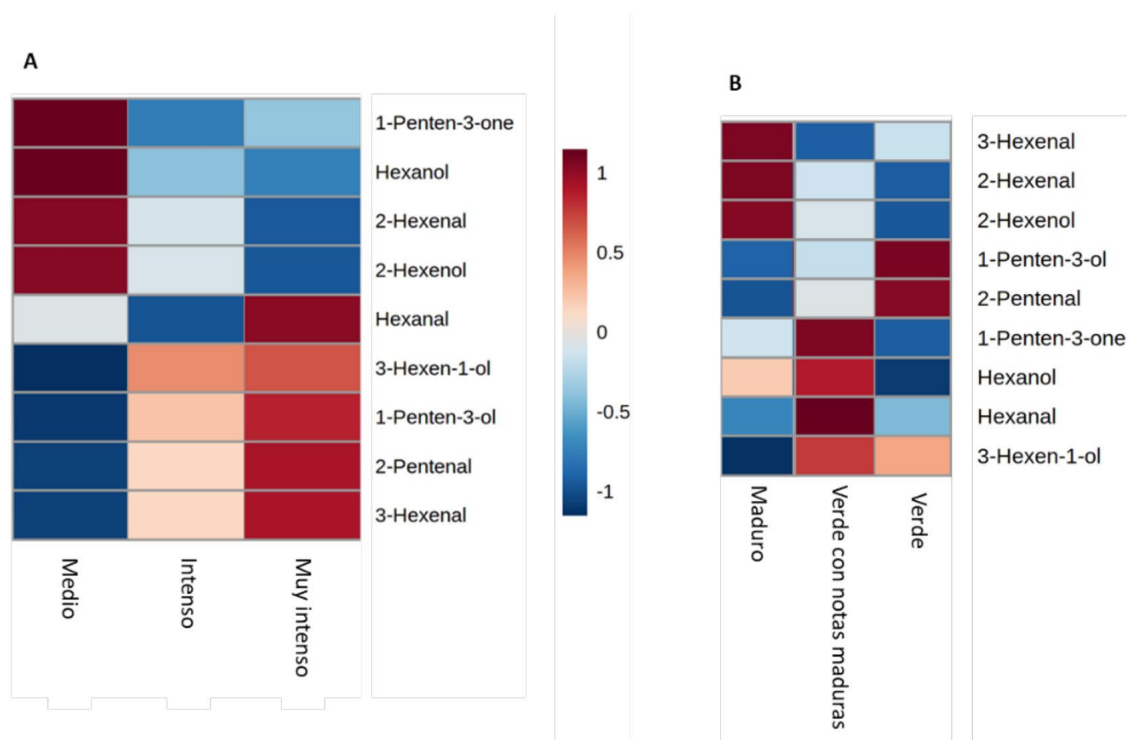


Figura 4. Mapa de calor de las tendencias en cuanto a la concentración relativa de los volátiles derivados de la LOX para (A) intensidad y (B) tipo de frutado.

Estas asociaciones permitieron establecer diversas conexiones entre los volátiles formados en la vía LOX y los dos atributos. Así, el hexanal, que es el precursor del hexanol, se detectó a más concentración en el frutado 'Muy intenso', mientras que el alcohol C₆ presentó más abundancia en intensidad 'Media'. De manera similar, el 2-hexenol y el 2-hexenal estaban más concentrados en la intensidad 'Media', mientras que la concentración del precursor 3-hexenal fue más alta en el frutado 'Muy intenso'. En cuanto al tipo de frutado, el alcohol C₅ y el aldehído, que se forman por oxidación enzimática del ácido linolénico a través del radical 13-alcoxi, presentaron una mayor concentración en el frutado 'Verde', mientras que la abundancia de volátiles C₆ producidos a partir del ácido linolénico a través del 13-hidroperóxido con la actividad enzimática de hidroperóxido liasa e isomerasa fue mayor para el frutado 'Maduro'.

Asociaciones entre ratios metabólicos y los atributos del frutado

Las asociaciones entre volátiles y frutado evidenciaron la influencia de conexiones metabólicas entre los compuestos C₆ y C₅ formados en la vía LOX. Estudiamos estas conexiones a través de la evaluación de siete indicadores obtenidos a partir de

concentraciones relativas de precursores y productos volátiles. Estos ratios representan la actividad de las principales enzimas implicadas en la vía LOX, en particular: V1 (hexanol/hexanal), que representa la actividad del alcohol deshidrogenasa (ADH) en la vía LOX con ácido linoleico como sustrato; V2 (2-hexenal/3-hexenal), marcador de la actividad isomerasa con ácido linoléico como sustrato; V3 (2-hexenol/2-hexenal) y V4 (3-hexenol/3-hexenal), formación de los alcoholes por ADH con los dos aldehídos isoméricos; V5 (3-hexenol/2-hexenol), un marcador para revelar la ruta preferida con 3-hexenal como sustrato; V6 (1-penten-3-ona/1-penten-3-ol), que señala la conversión del alcohol C₅ en cetona; y, por último, V7 (1-penten-3-ona/2-pentanal), un marcador para mostrar la vía preferida en la formación de volátiles C₅.

Para detectar diferencias significativas en los siete coeficientes metabólicos según los atributos de frutado, se aplicó el análisis estadístico mediante la prueba de Bonferroni. La Figura 5 muestra los diagramas de caja y bigotes con el nivel de significancia. V1, la conversión de hexanal a hexanol, resultó significativamente mayor en los AOVEs de intensidad 'Media' y 'Maduro'. La concentración de hexanal fue significativamente mayor en frutado 'Muy intenso' y 'Verde', lo cual fue asociado previamente por diversos autores [13,16].

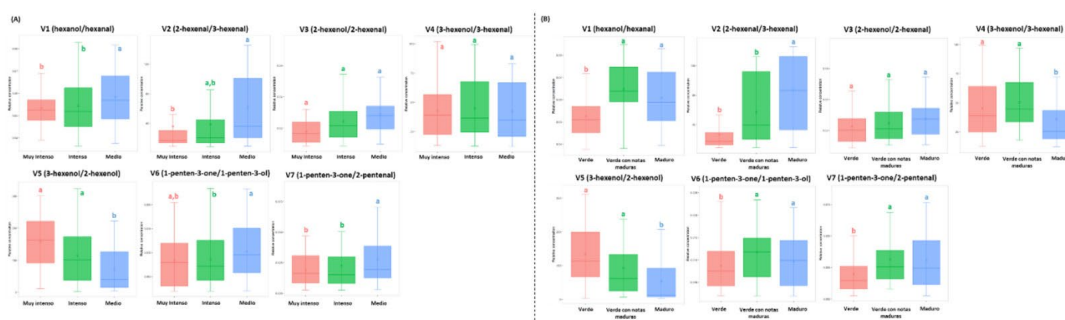


Figura 5. Gráficos de caja y bigotes de los ratios metabólicos en el que se incluyen las diferencias significativas para (A) intensidad y (B) tipo de frutado.

Las relaciones metabólicas V2-V5 están involucradas en la vía LOX con el ácido linoléico como sustrato. V2 y V4 tienen el mismo sustrato, 3-hexenal, pero incluyen dos productos diferentes por participación de dos enzimas, isomerasa y ADH. Se encontraron diferencias significativas en ambas proporciones según el frutado. En términos generales, la conversión a 3-hexenol (V5) se vio favorecida en los AOVEs 'Muy intensos' y 'Verdes', lo que concuerda con estudios previos que correlacionan este alcohol C₆ con notas verdes [11,13,17], mientras que en los AOVEs 'Medio' y 'Maduro' fue más favorecida la isomerización hacia 2-hexenal. Complementariamente, V3 no mostró diferencias significativas en cuanto a la intensidad y tipo de frutado.

La formación de volátiles C₅ a partir del ácido linoléico a través del radical penteno mostró diferencias significativas con respecto a los resultados obtenidos para V7. Así, la formación de 1-penten-3-ona se ve favorecida en frutado 'Maduro' y 'Medio', lo que concuerda con un estudio previo que asociaba el contenido de 2-pentanal con AOVEs 'Verdes' [18]. De acuerdo con estos resultados (Figura suplementaria 3), los AOVEs 'Intensos' se caracterizan generalmente por notas 'Verdes', mientras que los AOVEs con frutado 'Medio' se caracterizan por notas 'maduras'.

Identificación de patrones metabólicos asociados a los atributos del frutado del AOVE

Los patrones metabólicos asociados preferentemente a los atributos del frutado en el AOVE se identificaron mediante un análisis ROC multiclase. En las tablas 1 y 2 se enumeran los parámetros estadísticos proporcionados por esta prueba, que incluyen el AUC multiclase y los parámetros de clasificación correspondientes a las comparaciones por pares. En cuanto a la intensidad de frutado (Tabla 1), tres ratios mostraron un valor de AUC superior a 0.65, lo que significa una buena capacidad predictiva. Estos fueron V2 (2-hexenal/3-hexenal), V3 (2-hexenol/2-hexenal) y V5 (3-hexenol/2-hexenol) con AUC de 0.66, 0.70 y 0.71, respectivamente. Los tres ratios representan conversiones enzimáticas implicadas en la vía LOX del ácido linolénico. Con estas premisas, señalamos que la intensidad del frutado está estrictamente asociada a una formación favorecida de 3-hexenol por la actividad ADH. Por otro lado, la isomerización a 2-hexenal y posterior conversión a 2-hexenol estaría favorecida en AOVEs de intensidad 'Media'. Esto se pone especialmente de manifiesto en la comparación por pares entre los AOVEs de frutado 'Muy intenso' y 'Medios' con valores de AUC de 0.74, 0.79 y 0.82 para V2, V3 y V5, respectivamente.

RATIOS	MULTICLASE AUC	AUC 'MUY INTENSO' VERSUS 'INTENSO'	AUC 'INTENSO' VERSUS 'MEDIO'	AUC 'MUY INTENSO' VERSUS 'MEDIO'	TENDENCIA 'MUY INTENSO' VERSUS 'INTENSO'	TENDENCIA 'INTENSO' VERSUS 'MEDIO'	TENDENCIA 'MUY INTENSO' VERSUS 'MEDIO'
V1	0.65	0.53	0.67	0.73	<	<	<
V2	0.66	0.61	0.64	0.74	<	<	<
V3	0.70	0.64	0.66	0.79	<	<	<
V4	0.50	0.49	0.52	0.50	>	>	>
V5	0.71	0.63	0.69	0.82	>	>	>
V6	0.58	0.50	0.63	0.62	>	<	<
V7	0.58	0.48	0.63	0.64	>	<	<

V1: hexanol/hexanal; V2: 2-hexenal/3-hexenal; V3: 2-hexenol/2-hexenal; V4: 3-hexenol/3-hexenal; V5: 3-hexenol/2-hexenol; V6: 1-penten-3-one/1-penten-3-ol; V7: 1-penten-3-one/2-pentenal.

Tabla 1. Parámetros estadísticos obtenidos por AUC multiclase y comparaciones por pares para intensidad del frutado.

RATIOS	MULTICLASE AUC	AUC 'VERDE VERSUS 'VERDE CON NOTAS MADURAS'	AUC 'VERDE CON NOTAS MADURAS' VERSUS 'MADURO'	AUC 'VERDE' VERSUS 'MADURO'	TENDENCIA 'VERDE' VERSUS 'VERDE CON NOTAS MADURAS'	TENDENCIA 'VERDE CON NOTAS MADURAS' VERSUS 'MADURO'	TENDENCIA 'VERDE' VERSUS 'MADURO'
V1	0.68	0.77	0.59	0.68	<	>	<
V2	0.72	0.67	0.70	0.80	<	<	<
V3	0.61	0.61	0.56	0.67	<	<	<
V4	0.67	0.57	0.75	0.70	<	>	>
V5	0.76	0.65	0.78	0.86	>	>	>
V6	0.70	0.79	0.65	0.67	<	>	<
V7	0.88	0.77	0.55	0.73	<	>	<

V1: hexanol/hexanal; V2: 2-hexenal/3-hexenal; V3: 2-hexenol/2-hexenal; V4: 3-hexenol/3-hexenal; V5: 3-hexenol/2-hexenal; V6: 1-penten-3-one/1-penten-3-ol; V7: 1-penten-3-one/2-pentenal.

Tabla 2. Parámetros estadísticos obtenidos por AUC multiclase y comparaciones por pares para la tipología del frutado.

El tipo de frutado se caracterizó por una mayor complejidad metabólica, ya que este atributo se asoció a las tres ramas principales de la vía LOX implicadas en la formación de los volátiles C₅ y C₆. Así, todos los ratios, excepto V3 (2-hexenol/2-hexenal), proporcionaron valores de AUC multiclase superiores a 0.65. Nuevamente, se observó una mayor capacidad de clasificación para las relaciones involucradas en la transformación del 3-hexenal, es decir, V2 (2-hexenal/3-hexenal), V4 (3-hexenol/3-hexenal) y V5 (3-hexenol/2-hexenal) con valores de AUC multiclase de 0.72, 0.67 y 0.76, respectivamente. Los resultados obtenidos para V2 y V5 explicaron una conexión entre el frutado 'Muy intenso'/'Intenso' y 'Verde' y, por otro lado, entre el frutado 'Medio' y 'Maduro'. Por lo tanto, la comparación por pares entre los AOVE 'Verde' y 'Maduro' reveló valores de AUC de 0.80 y 0.86 para V2 y V5, respectivamente. Siguiendo con los aldehídos C₆, V1 (hexanol/hexanal) reportó una capacidad de clasificación de 0.68 según el análisis AUC multiclase. Esta relación, también basada en la actividad ADH, fue mayor en los AOVes 'Maduro' en comparación con el frutado 'Verde'. Sin embargo, V1 también describió un patrón distintivo para el atributo 'Verde con notas maduras', ya que la conversión de hexenal a hexanol se vio favorecida en los AOVes con esta característica en comparación con los AOVes 'Maduros'.

Por último, los dos indicadores que explican la formación de aldehídos C₅ también contribuyeron a explicar el tipo de frutado. El análisis multiclase proporcionó valores AUC de 0.70 y 0.68 para V6 (1-penten-3-one/1-penten-3-ol) y V7 (1-penten-3-one/2-pentenal), respectivamente. Ambos ratios permitieron diferenciar los AOVes 'Verdes' frente a los 'Maduros' para concluir que la formación de la cetona C₅ está especialmente asociada a la madurez. Por otro lado, la formación preferente del aldehído C₅ y del alcohol es distintiva de los AOVes 'Verdes'. V6 y V7 también representaron un patrón diferencial para el atributo 'Verde con notas maduras', ya que las muestras categorizadas con esta característica presentaron valores más altos para las dos proporciones en comparación con los AOVes 'Maduros'.



Conclusiones

En esta investigación hemos identificado patrones metabólicos asociados a atributos del frutado basados en la formación de volátiles C5 y C6 a través de la vía LOX. En particular, hemos descrito perfiles volátiles distintivos de AOVE con frutado 'Intenso' frente a 'Medio', que se apoyan en la conversión de 3-hexenal en 2-hexenol o en 3-hexenol mediante la participación de las enzimas isomerasa y ADH. También se diferenciaron los perfiles para los AOVes 'Verde' y 'Maduro', con conexión entre frutado 'Intenso' y 'Verde' y entre frutado 'Medio' y 'Maduro'. Los resultados presentados respaldan una explicación para descifrar los atributos frutales de los AOVes a nivel metabólico. Esta explicación abre la puerta a futuros estudios que aborden la evaluación de los factores tecnológicos implicados en el proceso de extracción del AOVE y la formación de volátiles C5 y C6 asociados al carácter frutado

Referencias

- [1] Perez-Jimenez, F. et al. (2005). *International conference on the healthy effect of virgin olive oil*. *European Journal of Clinical Investigation*, 35, 421–424. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2005.01516.x>
- [2] Piroddi, M., Albin, A., Fabiani, R., Giovannelli, L., Luceri, C., Natella, F., Rosignoli, P., Rossi, T., Taticchi, A., Servili, M., & Galli, F. (2017). *Nutrigenomics of extra-virgin olive oil: A review*. *BioFactors*, 43(1), 17–41. <https://doi.org/10.1002/biof.1318>
- [3] Servili, M. (2014). *The phenolic compounds: a commercial argument in the economic war to come on the quality of olive oil?*. *Oilseeds & fats Crops and Lipids*, 21(5), D509. <https://doi.org/10.1051/ocl/2014026>
- [4] Andrewes, P., Busch, J. L. H. C., De Joode, T., Groenewegen, A., & Alexandre, H. (2003). *Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: Identification of deacetoxy-ligstroside aglycon as a key contributor to pungency*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(5), 1415–1420. <https://doi.org/10.1021/jf026042j>
- [5] Beltrán, G., Ruano, M. T., Jiménez, A., Uceda, M., & Aguilera, M. P. (2007). *Evaluation of virgin olive oil bitterness by total phenol content analysis*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108(3), 193–197. <https://doi.org/10.1002/ejlt.200600231>
- [6] García-Vico, L., Belaj, A., Sánchez-Ortiz, A., Martínez-Rivas, J. M., Pérez, A. G., & Sanz, C. (2017). *Volatile Compound Profiling by HS-SPME/GC-MS-FID of a Core Olive Cultivar Collection as a Tool for Aroma Improvement of Virgin Olive Oil*. *Molecules*, 22(1). <https://doi.org/10.3390/molecules22010141>

- [7] Tomé-Rodríguez, S., Ledesma-Escobar, C. A., Penco-Valenzuela, J. M., & Priego-Capote, F. (2021). Cultivar influence on the volatile components of olive oil formed in the lipoxygenase pathway. *LWT*, 147, 111485. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111485>
- [8] COI/T.20/Doc. No 15/Rev. 10 (2018). *Sensory Analysis of Olive Oil. Method for the organoleptic assessment of virgin olive oil*. Madrid: International Olive Council (IOC).
- [9] Commission Implementing Regulation (EU) No 2016/1227 of 27 July 2016 amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis.
- [10] Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., & Vito, R. (2000). Virgin olive oil odour notes: Their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chemistry*, 68(3), 283–287. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(99\)00189-2](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(99)00189-2)
- [11] Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., & Vito, R. (2001). Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chemistry*, 72(1), 19–28. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00194-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00194-1)
- [12] Morales, M. T., Angerosa, F., & Aparicio, R. (1999). Effect of the extraction conditions of virgin olive oil on the lipoxygenase cascade: Chemical and sensory implications. *Grasas y Aceites*, 50(2), 114–121. <https://doi.org/10.3989/gya.1999.v50.i2.645>
- [13] Teixeira, G. G., Dias, L. G., Rodrigues, N., Marx, Í. M. G., Veloso, A. C. A., Pereira, J. A., & Peres, A. M. (2021). Application of a lab-made electronic nose for extra virgin olive oils commercial classification according to the perceived fruitiness intensity. *Talanta*, 226. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2021.122122>
- [14] da Costa, J. R. O., Dal Bosco, S. M., Ramos, R. C. de S., Machado, I. C. K., Garavaglia, J., & Villasclaras, S. S. (2020). Determination of volatile compounds responsible for sensory characteristics from Brazilian extra virgin olive oil using HS-SPME/GC-MS direct method. *Journal of Food Science*, 85(11), 3764–3775. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15467>
- [15] Robin, X., Turck, N., Hainard, A., Tiberti, N., Lisacek, F., Sanchez, J. C., & Müller, M. (2011). pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, 12, 77. <https://doi.org/10.1186/147121051277>
- [16] Amanpour, A., Kelebek, H., & Selli, S. (2019). Characterization of aroma, aroma-active compounds and fatty acids profiles of cv. Nizip Yaglik oils as affected by three maturity periods of olives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(2), 726–740. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9241>
- [17] Ilyasoglu, H., Ozcelik, B., Hoed, V. Van, & Verhe, R. (2011). Cultivar characterization of Aegean olive oils with respect to their volatile compounds. *Scientia Horticulturae*, 129(2), 279–282. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.048>
- [18] Morales, M. T., Rios, J. J., & Aparicio, R. (1997). Changes in the Volatile Composition of Virgin Olive Oil during Oxidation: Flavors and Off-Flavors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(7), 2666–2673. <https://doi.org/10.1021/jf960585>