



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



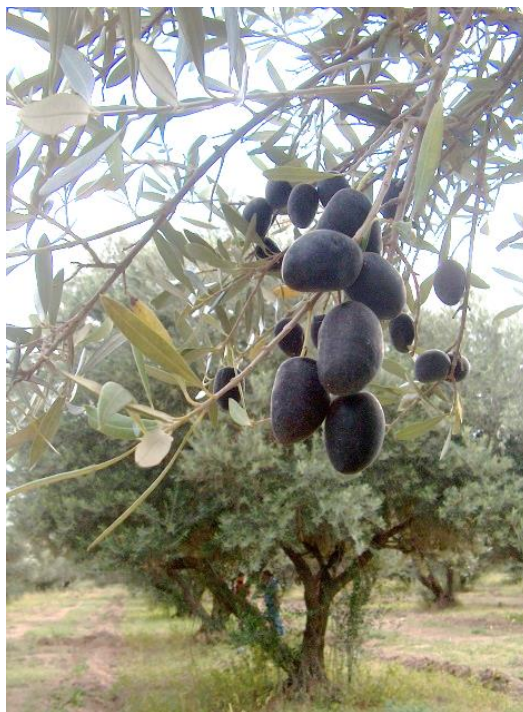
---

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**

**Carrera de Ciencias Biológicas**

**Dinámica de la acumulación de aceite  
durante el desarrollo del fruto del olivo  
(*Olea europaea* L. cv Arauco)**



**Cátedra de Química Orgánica – Escuela de Biología**



Abril 2019  
Córdoba - Argentina



Universidad  
Nacional  
de Córdoba



---

# **UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**

**Carrera de Ciencias Biológicas**

## **Dinámica de la acumulación de aceite durante el desarrollo del fruto del olivo (*Olea europaea* L. cv Arauco)**

Tesinista: Ana Cristina Mazzaforte

Firma:

Director: Damián Maestri

Firma:

Cátedra de Química Orgánica – Escuela de Biología



**Dinámica de la acumulación de aceite durante el desarrollo del fruto del olivo (*Olea europaea* L. cv Arauco)**

Tribunal Examinador:

Dr. Julio Zygadlo

Firma:

Dr. Damián Maestri

Firma:

Dra. Diana Labuckas

Firma:

Calificación: .....

Fecha: .....

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	pág. 5
<b>ANTECEDENTES</b> .....	pág. 6
Fases del desarrollo del fruto del olivo.....	pág. 9
Biogénesis, acumulación y composición del aceite.....	pág. 10
Construcción de la hipótesis de trabajo y objetivos.....	pág. 13
Objetivo general.....	pág. 13
Objetivos específicos.....	pág. 13
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	pág. 14
Material vegetal y caracterización del sitio de estudio.....	pág. 14
Estudios morfométricos, histoquímicos y de microscopía.....	pág. 15
Extracción del aceite, determinación del rendimiento y caracterización de la composición de ácidos grasos.....	pág. 15
Composición de ácidos grasos totales.....	pág. 16
Composición de ácidos grasos en las fracciones de glicéridos.....	pág. 16
Análisis estadístico de los resultados.....	pág. 17
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	pág. 18
Evolución del peso e índice de madurez de los frutos.....	pág. 18
Dinámica de la acumulación de aceite.....	pág. 19
Evolución de la composición de ácidos grasos totales.....	pág. 22
Dinámica de los cambios en la composición de glicéridos.....	pág. 26
<b>CONCLUSIONES</b> .....	pág. 30
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	pág. 33
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	pág. 34

## RESUMEN

El presente trabajo tiene como objetivo principal el estudio del patrón y la dinámica de acumulación y composición del aceite durante el desarrollo y los primeros estadios de la maduración de los frutos en el cultivar Arauco (*Olea europaea* L.).

En dicho cultivar de olivo, la dinámica de acumulación de materia seca se ajusta satisfactoriamente a un modelo de regresión lineal alcanzándose la madurez fisiológica durante el envero. La biogénesis del aceite se registra desde fases muy tempranas (aproximadamente 30 – 35 días después de la plena floración, DDPF) del desarrollo de los frutos. El proceso que culmina con la acumulación del aceite en una única gota por célula se produce al inicio de la maduración (índice de madurez próximo a la unidad). En este estadio se logra la máxima concentración de aceite (49 g/100 g materia seca).

La información que proporciona el estudio de la composición de ácidos grasos de las diferentes fracciones de glicéridos aporta evidencias sobre la selectividad de las enzimas que participan en la biosíntesis de estos últimos. En el aceite del cv. Arauco, la secuencia de incorporación de ácidos grasos en los glicéridos parciales parece ocurrir según un patrón donde la transferencia de palmitil-CoA, mediada por G3PAT, prevalece en la primera fase de la biosíntesis (la formación del ácido lisofosfatídico), en estadios tempranos de desarrollo de los frutos (aproximadamente hasta 80 DDPF). A continuación, su tasa de incorporación se reduce al mismo tiempo que se incrementa la del ácido oleico. Este último no sólo contribuye a la fracción de lisofosfatidato sino también, fundamentalmente, a la formación de di y triacilglicéridos por acilaciones sucesivas en las posiciones *sn*-2 y *sn*-3, mediadas por LPAAT y DAGAT, respectivamente. La presencia de triacilglicéridos se registra desde fases muy tempranas del desarrollo, al principio con una elevada proporción de ácido oleico (> 80 %) y posteriormente con un descenso paulatino de su concentración hasta alcanzar valores constantes en el periodo previo al inicio de la maduración de los frutos. A partir de este momento, se observa un incremento en las proporciones de los ácidos palmítico y linoleico, los cuales logran concentraciones relativamente estables durante la fase de envero.

Desde un punto de vista práctico, el comienzo precoz de la fase de disminución en el contenido de ácido oleico que tiene lugar en el periodo previo al inicio de la maduración de los frutos, antes de alcanzar la máxima concentración de aceite, representa un inconveniente a los fines de establecer una época óptima de cosecha para la producción de este último. Sobre la base de la evolución de estos dos parámetros, el periodo de recolección apropiado podría establecerse antes del inicio del envero ( $IM < 2$ ), momento en el cual finaliza la fase de síntesis activa del aceite y el contenido de ácido oleico no muestra su máxima declinación.

## ANTECEDENTES

El olivo pertenece a la familia Oleaceae, que abarca especies, en su mayoría árboles y arbustos, distribuidas por las regiones tropicales y templadas del mundo. El género *Olea* posee unas 35 especies. *Olea europaea* L., que comprende los olivos cultivados y también los acebuches u olivos silvestres, es la única especie de la familia con fruto comestible (Rapoport, 2008).

El cultivo del olivo se originó en Oriente Medio y se desarrolló extensamente en los países ribereños de la Cuenca del Mar Mediterráneo, en donde se concentra aproximadamente el 98 % de la superficie cultivada. El 2 % restante se reparte entre unos pocos países del continente americano (principalmente Argentina), Asia oriental y Oceanía. A nivel mundial, la superficie agrícola destinada al cultivo del olivo es de aproximadamente 10 millones de hectáreas. La producción alcanza un promedio anual de 16 millones de toneladas de aceitunas, de las cuales aproximadamente el 90 % se destinan a la obtención de aceite, mientras que el 10 % restante se consumen elaboradas como aceitunas de mesa (Civantos, 2008).

En Argentina, en las dos últimas décadas, se promovieron emprendimientos productivos en el área olivícola, principalmente en las provincias de San Juan, La Rioja y Catamarca, que permitieron lograr en pocos años la mayor superficie cultivada de olivos en América del Sur. A principios de la década del '90 nuestro país contaba con alrededor de 30.000 hectáreas implantadas, pero hacia fines de la década pasada había sobrepasado las 100.000 hectáreas. Aunque existen algunas diferencias regionales en cuanto al destino principal de la producción, en promedio, el 70 % de la misma se destina a la fabricación de aceite, siendo los cultivares Arbequina y Manzanilla los más utilizados para este propósito.

El cv. Arauco (Fig. 1) es el único de origen argentino reconocido por el Consejo Olivícola Internacional (IOOC, 2000). Su origen es incierto; probablemente se originó a partir de la selección de esquejes provenientes de España en tiempos coloniales. Presenta similitudes con los cultivares Azapa de Chile y Sevillana de Perú. Se considera una variedad auto-estéril, de elevado vigor, porte abierto y alta densidad de copa. Su productividad es medio-alta pero con frecuencia alternada, debido probablemente a una inadecuada condición de cultivo. Los frutos son asimétricos, de peso elevado (valor medio 8.5 g), forma elíptica, con ápice apuntado y base truncada. Su longitud promedio es de 27 mm y su diámetro transversal de 20 mm. El endocarpo es de peso elevado (> 0.45 g) y forma alargada, con base truncada y ápice apuntado. La superficie es rugosa y el número de surcos fibrovasculares es alto (valor medio 9.5). En relación a su comportamiento agronómico, el cv. Arauco resulta tolerante a suelos áridos, salinos y calcáreos. Por el contrario, no posee una buena resistencia al frío y a la elevada

humedad atmosférica, adaptándose bien a ambientes secos. Presenta baja tolerancia a las enfermedades más comunes del olivo: mosca del olivo (*Bractocera oleae*), repilo (*Cycloconium olaginum*), cochinilla gris (*Melanaspis paulista*), cochinilla negra (*Saissetia oleae*), tuberculosis (*Pseudomonas savastanoi*) y verticilosis (*Verticillum dahliae*). Por el contrario, su resistencia a *Gloeosporium olivarum*, causante del mal conocido como “aceituna jabonosa”, es elevada (Torres et al., 2007).

Hasta inicios de la década de 1990, Arauco fue el cultivar más difundido en nuestro país para la elaboración de aceituna en conserva, debido fundamentalmente al tamaño y elevada relación pulpa/hueso de sus frutos (Garrido Fernández, 1997). No obstante, se ha observado que las características físicas de los frutos de Arauco pueden variar considerablemente en función del ambiente de cultivo lo que puede transformarse en un obstáculo para su comercialización como variedad de mesa. Por otra parte, estudios preliminares han demostrado que, a la madurez, los frutos de este cultivar poseen un contenido de aceite relativamente elevado (Torres et al., 2007) lo que ha despertado el interés en su utilización como materia prima para la producción de aceite.

Figura 1: Árbol, ramas fructíferas y frutos en distintos estadios de desarrollo y maduración del cv. Arauco.



## **Fases del desarrollo del fruto del olivo**

Desde el punto de vista botánico el fruto del olivo es una drupa formada por tres tejidos principales: endocarpo (hueso o carozo), mesocarpo (pulpa o carne) y exocarpo (piel o capa externa). El conjunto de estos tres tejidos recibe el nombre de pericarpio y tiene su origen en la pared del ovario. El endocarpo es la parte leñosa de la oliva y contiene la semilla. Comienza a crecer a partir de la fecundación y aumenta de tamaño los dos meses siguientes. En el estado maduro el endocarpo está totalmente compuesto por células esclerificadas, las cuales deben su dureza a la deposición de una doble pared secundaria con alto contenido en lignina. El mesocarpo es un tejido carnoso que comienza a desarrollarse a partir de la fecundación y que sigue creciendo hasta la maduración. Sus células son parenquimáticas, poco diferenciadas, pero con una gran capacidad de crecimiento. El exocarpo o epicarpo es la capa exterior y más fina del fruto. Este tejido está compuesto por la epidermis y su cutícula. La cutícula es fina cuando el ovario se encuentra todavía protegido por los pétalos, pero rápidamente se desarrolla para formar una gruesa capa protectora. Cuando la oliva está completamente desarrollada, la pulpa representa un 70 - 90 %, el hueso un 9 – 27 % y la semilla un 2 - 3% del peso total del fruto. La composición de este último varía en función de la variedad, y dentro de una misma variedad en función de su estado de desarrollo y maduración (Beltrán et al., 2008). Los componentes mayoritarios de la pulpa y de la semilla son el agua y el aceite, le siguen en importancia los azúcares y polisacáridos.

El desarrollo del fruto del olivo sigue una curva doble sigmoidal (Rallo y Cuevas, 2008), con tres estadios o fases diferentes. Los límites entre las fases varían de acuerdo al genotipo, carga y estado nutritivo del árbol, y condiciones ambientales y de cultivo. En algunos casos, la delimitación de las fases es poco evidente (Lavee, 1986).

Durante la fase I, de crecimiento rápido, ocurre un notable aumento de tamaño debido principalmente a división celular. En esta fase se produce fundamentalmente el desarrollo de endocarpo, que llega a ocupar hasta un 80 % del volumen de la aceituna. Tras un periodo durante el cual el crecimiento se ralentiza o detiene y que coincide con el endurecimiento del carozo (fase II), el fruto experimenta un nuevo incremento de tamaño principalmente a causa de la elongación de las células del mesocarpo (fase III de crecimiento). En esta fase el fruto alcanza su tamaño real y, al final de la misma, ocurre el enverado o cambio de color de la epidermis que marca el comienzo del periodo de maduración. Aunque se asume que estas pautas de crecimiento son de ocurrencia general, existen evidencias que indican que tanto la tasa como la duración de los procesos de división y expansión celular pueden presentar variaciones considerables sobre todo entre variedades de olivo que poseen amplias diferencias en el tamaño de los



frutos (Rallo y Rapoport, 2001). A su vez, aquellas variaciones pueden afectar la tasa de acumulación de los lípidos de reserva (Romano et al., 2004).

### **Biogénesis, acumulación y composición del aceite**

En el fruto del olivo, la mayor proporción de los lípidos de reserva (principalmente triglicéridos) se sintetiza y acumula en células del mesocarpo, las cuales tienen la capacidad de metabolizar fotoasimilados fijados tanto en hojas como en cloroplastos de los propios frutos (Salas et al., 2000; Hernández et al., 2009). La biogénesis del aceite tiene lugar durante casi todo el periodo de desarrollo del fruto, el cual comprende un proceso de larga duración (4 a 5 meses). Las particularidades mencionadas suponen un sistema complejo sujeto a sustanciales variaciones estacionales de temperatura y otras variables ambientales.

En general, la fase más intensa de acumulación del aceite ocurre durante el desarrollo del mesocarpo, luego de la fase de endurecimiento del carozo. Durante el periodo de maduración de los frutos la tasa de acumulación de lípidos se reduce significativamente en la mayor parte de las variedades estudiadas (Conde et al., 2008).

La formación de lípidos de almacenamiento involucra la síntesis *de novo* de ácidos grasos y su posterior incorporación a unidades de glicerol-3-fosfato mediante una serie de reacciones mediadas enzimáticamente (Fig. 2). La síntesis *de novo* de los ácidos grasos es un proceso que tiene lugar en los plastidios y necesita la actividad conjunta de dos enzimas, acetil-CoA carboxilasa (ACCasa) y el sistema enzimático ácido graso sintetasa (AGS). La primera cataliza la condensación, con consumo de ATP, de una molécula de bicarbonato y otra de acetil-CoA para producir malonil-CoA. Antes de entrar en la ruta de síntesis, el grupo malonil es transferido de la CoA a un factor proteico (ACP, proteína transportadora de acilos) por la enzima malonil transacilasa.

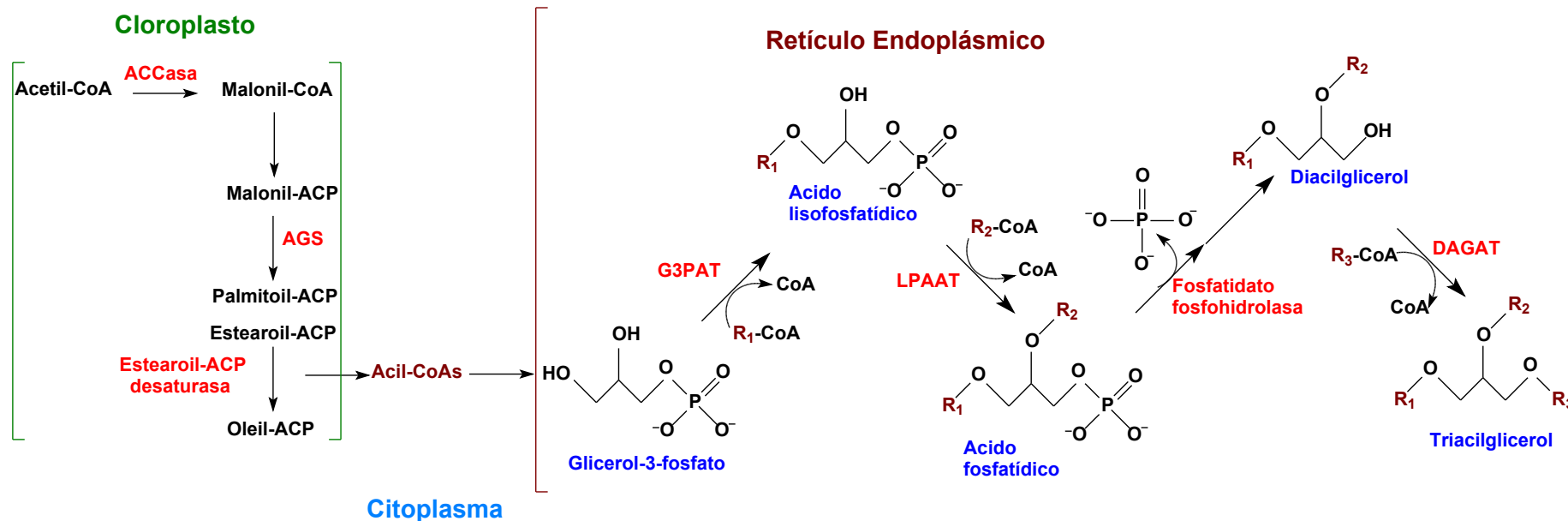
El proceso enzimático que cataliza la síntesis de ácidos grasos saturados de cadena larga a partir de acetil-CoA, malonil-CoA y NADPH, culmina con la formación de palmitoil-ACP el cual puede ser elongado a estearoil-ACP en un ciclo posterior, de manera que el producto final del complejo multi-enzimático ácido graso sintetasa es casi siempre una mezcla de palmitato y estearato. La relación entre ellos está directamente relacionada con el grado de insaturación del producto oleoso final ya que el palmitato es el ácido graso saturado más abundante del aceite de oliva y los ácidos grasos de dieciocho átomos de carbono son prácticamente en su totalidad insaturados.

El proceso de elongación y desaturación de los ácidos grasos termina con la liberación de los grupos acilo de las proteínas transportadoras de acilos, mediante la acción de tioesterasas presentes en los plastidios o con su transferencia a lípidos complejos mediante aciltransferasas.

El acoplamiento de las unidades de acil-CoA a unidades de glicerol-3-fosfato tiene lugar en el retículo endoplásmico y se conoce como la ruta de Kennedy (“Kennedy pathway”). La actividad y las especificidades de las enzimas (aciltransferasas) que intervienen, respecto de la posición que esterifican y del ácido graso que incorporan preferentemente determinan la composición de los glicéridos parciales y, finalmente, la composición general y la tasa de acumulación del aceite. En frutos maduros, este último está compuesto mayoritariamente por triacilglicéridos, los cuales representan hasta el 98 % del total del aceite (Kiritsakis, 1992).

Por otra parte, resulta oportuno remarcar que la mayor parte de las investigaciones acerca de las variaciones en la composición de ácidos grasos durante la ontogenia del fruto del olivo se han realizado en el periodo de maduración de los frutos, siendo escasa la información disponible sobre patrones de biogénesis del aceite en etapas tempranas del desarrollo de los mismos. Así por ejemplo, Baccouri et al. (2008) han informado que en los cultivares Chétoui y Chemlali se produce una disminución en el contenido de ácido oleico y un incremento del ácido linoleico a medida que avanza la madurez de los frutos. Beltrán et al. (2004) estudiaron la composición del aceite de la variedad Picual durante la maduración del fruto en tres años sucesivos. Estos autores encontraron reducciones en el contenido de ácidos grasos saturados e incrementos en los ácidos oleico y linoleico con el retraso de la fecha de recolección y determinaron que, además de la influencia estacional, el año de cultivo ejerce un efecto marcado sobre las concentraciones de estos ácidos grasos. Sakouhi et al. (2011) han observado en cambio que las variaciones más importantes en la composición de ácidos grasos en el cv. Sayali ocurren durante el desarrollo de los frutos, en tanto pequeñas modificaciones se registran durante la maduración. A su vez, Uceda et al. (2008) sostienen que, independientemente de la variedad y una vez finalizada la lipogénesis, la maduración conlleva una disminución del contenido en ácido palmítico y aumento del ácido linoleico, manteniéndose constante la proporción de ácido oleico. Aunque éste último constituye uno de los parámetros clave para definir la calidad de los aceites de oliva, existen pocas evidencias de los cambios que experimenta su concentración durante el desarrollo del mesocarpo del fruto del olivo. En particular, no hay antecedentes publicados en el cv. Arauco.

Figura 2: Esquema simplificado de la biosíntesis de triacilglicéridos en células vegetales.



Referencias: ACCasa, acetil-coenzima A carboxilasa; AGS, ácido graso sintetasa; ACP, proteína transportadora de acilo (“acil carrier protein”); G3PAT, glicerol-3-fosfato aciltransferasa; LPAAT, lisofosfatidato aciltransferasa; DAGAT, diacilglicerol aciltransferasa; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub> representan grupos acilo de diferentes ácidos grasos.

### **Construcción de la hipótesis de trabajo y objetivos**

Si bien se asume que en el fruto del olivo las dinámicas de síntesis y acumulación del aceite siguen patrones generales, dichos procesos pueden experimentar variaciones considerables sobre todo entre genotipos que presentan diferencias amplias en el tamaño de los frutos. Se presume que el cultivar Arauco presenta un patrón temporal de acumulación de aceite característico, en el que la síntesis del mismo se completa en una fase muy temprana de la maduración de los frutos.

### **Objetivo general**

Estudiar el patrón y la dinámica de la acumulación y composición del aceite durante el crecimiento y desarrollo del fruto de olivo del cv. Arauco.

### **Objetivos específicos**

- Establecer el marco temporal y la contribución de las distintas fases del desarrollo de los frutos a la síntesis y acumulación del aceite en el cv. Arauco.
- Estudiar la dinámica de los cambios en la composición de acilglicéridos en función del grado de desarrollo de los frutos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal y caracterización del sitio de estudio**

El estudio se llevó a cabo en una plantación de olivos (*Olea europaea* L. cv. Arauco) ubicada en la Estación Experimental Agropecuaria INTA-San Juan (31°39', 68°35' W; Dpto. Capital, provincia de San Juan). Dadas las condiciones de aridez, los suelos de esta región se caracterizan por ser jóvenes e inmaduros con escasa evolución hacia horizontes pedogenéticos. Son pobres en materia orgánica, pero bien provistos en potasio y medianamente en fósforo. Se clasifican como Entisoles y están constituidos por sedimentos gravitatorios, eólicos y fluviales (Moscatelli et al., 1990).

El clima árido desértico domina toda la región. Las precipitaciones están concentradas principalmente en el periodo estival y, en general, no superan los 100 mm anuales. La región se caracteriza por presentar alta heliofanía, baja nubosidad y gran intensidad de radiación solar. El período libre de heladas oscila entre 220 y 300 días, extendiéndose desde el mes de octubre hasta mayo. La temperatura media anual varía entre 16 °C y 18 °C, con máximas absolutas que puede superar los 45 °C y mínimas absolutas entre 5 °C y 10 °C bajo cero.

En el sitio de estudio y teniendo en cuenta el total de precipitación efectiva recibida durante el ciclo de cultivo estudiado, se aplicó riego suplementario para totalizar una lámina de agua equivalente a 800 mm/año. El suministro de agua a los árboles se llevó a cabo mediante riego por surco.

Se trabajó con plantas de aproximadamente 70 años de edad, dispuestas en un marco de plantación de 10 m x 10 m. Dentro de la parcela experimental, se escogieron aleatoriamente 10 árboles de los cuales se seleccionaron finalmente 5, en base a las semejanzas que presentaban en sus niveles de carga frutal.

A partir de la finalización de la fase I de crecimiento de los frutos (aproximadamente 30 días después de plena floración, DDPF), a intervalos quincenales y durante el transcurso de la mañana (entre las 8 y las 10 horas) se tomaron muestras de los mismos (aproximadamente 300 g/árbol) provenientes de las cuatro orientaciones de cada uno de los árboles seleccionados, a una altura de copa comprendida entre los 1.5 y los 2.5 m.

Para determinar DDPF se siguió el protocolo sugerido por Farinelli et al. (2012). En cada árbol seleccionado, se marcaron 6 ramas que contenían en promedio 70 - 80 inflorescencias. Desde el inicio de la floración, se realizaron observaciones diarias para establecer el momento de plena floración (PF), es decir, cuando el 80 % de las flores se encontraban abiertas.

Para determinar el índice de madurez se utilizó la metodología propuesta por Beltrán et al. (2008). Los frutos se clasificaron en las 8 clases o categorías que se detallan a continuación:

Clase 0: Piel verde intenso.

Clase 1: Piel verde-amarillento.

Clase 2: Piel verde con manchas rojizas en menos de la mitad del fruto. Inicio de envero.

Clase 3: Piel rojiza o morada en más de la mitad del fruto. Final de envero.

Clase 4: Piel negra y pulpa blanca.

Clase 5: Piel negra y pulpa morada sin llegar a la mitad de la pulpa.

Clase 6: Piel negra y pulpa morada sin llegar al hueso.

Clase 7: Piel negra y pulpa morada totalmente hasta el hueso.

El índice de madurez (IM) se obtuvo en base a la siguiente fórmula:

$$IM = (A \times 0 + B \times 1 + C \times 2 + D \times 3 + E \times 4 + F \times 5 + G \times 6 + H \times 7) / 100$$

siendo A, B, C, D, E, F, G y H, el número de frutos de las clases 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7, respectivamente.

### **Estudios morfométricos, histoquímicos y de microscopía**

A partir de alícuotas de 100 frutos por muestra (fecha de muestreo x árbol) se determinó el peso de los mismos mediante el empleo de una balanza de precisión. Por otra parte, se seleccionaron aleatoriamente 10 frutos, los cuales se cortaron en secciones de 3-4 mm de espesor. Las mismas se fijaron en FAA (50% etanol 95°, 35 % agua destilada, 10 % formaldehído y 5 % ácido acético glacial) para su posterior análisis mediante microscopía óptica. A partir del material conservado en FAA, se realizaron cortes transversales semifinos. Los mismos fueron teñidos con Oil Red y Astra Blue (0.2 %) y posteriormente se montaron en preparados semipermanentes con gelatina glicerizada. Estos cortes se utilizaron para observar la formación y el acúmulo de aceite en las células del mesocarpo, mediante un fotomicroscopio Axiophot de luz transmitida y epifluorescencia (20X). Las imágenes obtenidas fueron registradas con una cámara digital y procesadas con un software analizador de imágenes (MacBiophotonics ImageJ).

### **Extracción del aceite, determinación del rendimiento y caracterización de la composición de ácidos grasos**

A partir de los lotes de frutos obtenidos en cada una de las fechas de muestreo, se seleccionó aleatoriamente una muestra de aproximadamente 150 g. La misma se utilizó para separar los distintos tejidos (semilla y pulpa, considerando en esta última

mesocarpo y epicarpo) formadores de aceite. Una alícuota de aproximadamente 100 g de pulpa se trituró en molino de cuchillas de acero inoxidable. A partir de 20 g de este material se determinó el porcentaje de humedad (estufa, 100 °C) lo que permitió calcular el contenido de materia seca de los frutos. El resto de la pulpa se liofilizó hasta obtener peso seco constante y se conservó a -20 °C. Una parte del material liofilizado (20 g) se utilizó para la obtención de aceite, mediante extracción continua sólido-líquido en equipo Soxhlet, durante 8 horas, empleando n-hexano como disolvente. El contenido de aceite se cuantificó por diferencia de pesos previo y posterior a la extracción (AOCS, 1998) y se expresó como porcentaje según base seca (% SBS).

### **Composición de ácidos grasos totales**

La composición de ácidos grasos de los aceites obtenidos a partir del mesocarpo se determinó por cromatografía gaseosa (CG). Los aceites (0,5 g) se saponificaron con 5 mL de solución de hidróxido de potasio 0,5 N en metanol mediante reflujo durante 5 min. A la mezcla de reacción se le adicionaron 15 mL de solución de cloruro de amonio/ácido sulfúrico en metanol y se llevó nuevamente a reflujo durante 5 min. Se dejó enfriar y se particionó con 10 mL de n-hexano. Se recuperó esta última fase, se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró (papel Whatman N° 1) y concentró en evaporador rotatorio a 40 °C. La mezcla de ésteres metílicos de ácidos grasos se analizó en una columna de fase Supelcowax, de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µ de espesor de fase. Se empleó nitrógeno como gas portador (1 mL/min); temperatura de horno programada desde 180 hasta 220 °C (2°C/min); temperaturas de inyector y detector (FID), 250 °C. Los ácidos grasos se identificaron por comparación de sus tiempos de retención relativos con respecto a patrones corridos bajo idénticas condiciones y datos tomados de bibliografía (Torres et. al 2009). El contenido de cada uno de los ácidos grasos identificados se expresó como valor porcentual en relación al contenido total de los mismos.

### **Composición de ácidos grasos en las fracciones de glicéridos**

A partir de los aceites obtenidos del mesocarpo, se analizó la composición de ácidos grasos de las diferentes fracciones de glicéridos. Las mismas se separaron mediante cromatografía en capa delgada (CCD), empleando sílica gel (0.5 mm de espesor) como fase estacionaria y n-hexano : éter dietílico : ácido acético (90 : 10 : 1 v/v) como fase móvil. Una vez finalizado el desarrollo de las placas cromatográficas, se retiraron de las cubas y se colocaron bajo campana hasta completa evaporación del disolvente. Posteriormente, las placas se revelaron con vapores de yodo. La fracciones de interés (diglicéridos, triglicéridos y una fracción polar conteniendo lisofosfoglicéridos)



se removieron de las placas y se resuspendieron en cloroformo : metanol (2 : 1, v/v) (fracción polar) o en n-hexano (di y triglicéridos). La fracción polar se purificó nuevamente mediante CCD utilizando sílica gel como fase estacionaria y cloroformo : metanol : agua (65 : 32.5 : 2.5 v/v) como fase móvil, empleando 1-palmitoil-lisofosfatidilcolina como estándar para la identificación de la fracción de lisofosfoglicéridos. Una vez realizado el desarrollo cromatográfico, y luego de la evaporación del disolvente bajo campana, esta última fracción se resuspendió en cloroformo : metanol (2 : 1, v/v). Finalmente se analizó la composición de ácidos grasos del extracto de cada una de las fracciones purificadas (lisofosfoglicéridos, di y triglicéridos) de acuerdo a la metodología utilizada para el análisis de la composición de ácidos grasos totales, previo filtrado de la sílica y evaporación de los disolventes.

#### *Análisis estadístico de los resultados*

Los datos se analizaron estadísticamente mediante análisis de la varianza (ANOVA) o test no paramétricos de Kruskal-Wallis, según la distribución de la variable. En aquellos casos en donde se observaron diferencias estadísticamente significativas entre fechas de muestreo se utilizó un test a posteriori de comparación múltiple (LSD).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Evolución del peso e índice de madurez de los frutos

En la Figura 3 se presenta la evolución del índice de madurez (IM), peso fresco y contenido de materia seca desde etapas tempranas del desarrollo de los frutos hasta la maduración. A partir de los 30 días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF), el peso de las drupas comienza a incrementarse rápidamente, en forma casi lineal, hasta alcanzar 4.5 g/fruto a los 110 DDPF. Luego de un corto periodo (aproximadamente entre 110 y 140 DDPF) durante el cual el peso no varía significativamente, tiene lugar una segunda fase de crecimiento rápido. Al cabo de la misma, el fruto alcanza un peso final promedio cercano a los 7.5 g/fruto. De esta manera, la evolución de este parámetro muestra una curva de tipo sigmoide, la que incluye tres fases principales. Beltrán et al. (2008) indican que estas fases corresponden predominantemente, aunque no en forma excluyente, a los siguientes eventos: a) un primer periodo de crecimiento rápido del fruto debido a la intensa división y expansión celular que tienen lugar durante el crecimiento y desarrollo del endocarpo; b) el endurecimiento del endocarpo, durante el cual la división celular prácticamente se detiene y el crecimiento del fruto se ralentiza; c) el desarrollo del mesocarpo debido fundamentalmente a la expansión de células pre-existentes. Sin embargo, a diferencia de otros cultivares, en los frutos del cv. Arauco el proceso de endurecimiento del endocarpo tiene lugar en etapas más tempranas, entre los 60 y 80 DDPF.

El peso del fruto del olivo es una característica determinada genéticamente, pero puede ser afectada considerablemente por prácticas agronómicas (riego, poda, aclareo) y factores agro-ecológicos propios de la región de cultivo. En la evolución normal del crecimiento del fruto, en plantas cultivadas en ausencia de déficit hídrico, la carga del árbol, es decir la población de frutos, es determinante del peso y tamaño de los mismos, existiendo una correlación negativa entre el número de frutos por árbol y el peso promedio de los frutos a la madurez. Bajo las condiciones de cultivo empleadas en este trabajo, los frutos del cv. Arauco alcanzan su peso definitivo aproximadamente a los 200 DDPF. Cuando se analiza la dinámica de acumulación de materia seca, se observa un incremento significativo, casi lineal, hasta esa misma época. La máxima acumulación de materia seca (3,40 g/fruto) se logra aproximadamente a los 200 DDPF y resulta superior al valor promedio (2,98 g/fruto) obtenido por Rondanini et al. (2014) para esta misma variedad cultivada en distintos ambientes de la provincia de La Rioja.

Los primeros cambios en la pigmentación de la epidermis de los frutos, que marcan el inicio del periodo de maduración, tienen lugar aproximadamente a los 130 – 140 DDPF, momento en el cual comienza la ralentización en la acumulación de materia

seca, y el peso fresco no presenta variaciones. La madurez fisiológica (considerada como el peso seco máximo acumulado) se alcanza en frutos que se encuentran en el inicio del envero (IM próximo a 2).

De acuerdo a los resultados mencionados anteriormente, el patrón de crecimiento del fruto, considerado como ganancia de peso fresco, no coincide exactamente con la acumulación de materia seca. Este hecho puede deberse a que el contenido de agua del fruto experimenta variaciones importantes debido fundamentalmente a la disponibilidad de agua. Asimismo, se destaca la importancia de considerar este último parámetro (materia seca) a los efectos de analizar la dinámica de acumulación de otros componentes, como el aceite, ya que su síntesis puede ralentizarse o aún detenerse antes de ocurrir el máximo crecimiento del fruto.

### **Dinámica de la acumulación de aceite**

La formación de aceite en células del mesocarpo comienza en fases muy tempranas del desarrollo de los frutos (Fig. 4). Las drupas cosechadas a partir de 30 DDPF revelan la presencia de pequeños oleosomas cuya fusión da lugar posteriormente a la aparición de pequeñas gotas de aceite. De acuerdo a estudios realizados por Matteucci et al. (2011) las mismas se segregan en los extremos del retículo endoplasmático y seguidamente se fusionan para formar gotas de mayor volumen. Se ha sugerido que la ausencia de oleosinas en el fruto del olivo (Ross et al., 1993) favorece la coalescencia de la fase oleosa resultando en la formación de gotas de gran volumen (Rangel et al., 1997), que alcanzan un tamaño final de aproximadamente 30  $\mu\text{m}$  de diámetro. En el cv. Arauco, en fases tempranas de la maduración (IM = 1, 160 DDPF), el aceite se acumula en forma de una única gota, de forma casi esférica, con un área promedio de un valor próximo a 1300  $\mu\text{m}^2$  y un diámetro de hasta 41  $\mu\text{m}$ , que ocupa gran parte del volumen de la célula (Figs. 4 y 5).

En la Figura 4 se muestra el patrón de acumulación de aceite, expresado como g/100 g materia seca (% SBS). En los primeros estadios de desarrollo, hasta los 60 – 70 DDPF, se registra una baja tasa de síntesis, coincidiendo con la fase de endurecimiento del endocarpo. La fase de acumulación más intensa se observa entre los 80 y 160 DDPF. La duración de esta fase resulta similar a la observada en otros cultivares de olivo (Conde et al., 2008; Breton et al., 2009; Sakouhi et al., 2011).

Vista en su conjunto, la dinámica de la acumulación de aceite en el cv. Arauco sigue una curva de tipo sigmoide, con un incremento casi lineal durante el periodo de síntesis activa mencionado (aproximadamente entre 80 - 160 DDPF). Posteriormente, la biogénesis de aceite se ralentiza y alcanza una meseta en los inicios del periodo de maduración de los frutos. Estos datos indican que la síntesis del aceite está completa en

una fase muy temprana de la maduración. En este sentido, los resultados mencionados difieren de los observados en otros cultivares de olivo, tales como Picual, Frantoio y Cornicabra, donde la acumulación de aceite continúa durante etapas avanzadas de la maduración de los frutos (Salvador et al., 2001; Beltrán et al., 2004).

Figura 3: Evolución del índice de madurez (IM), peso y contenido de materia seca de los frutos del cv. Arauco en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF). Los datos representan el promedio de 5 árboles y las mediciones se realizaron en 100 frutos/árbol.

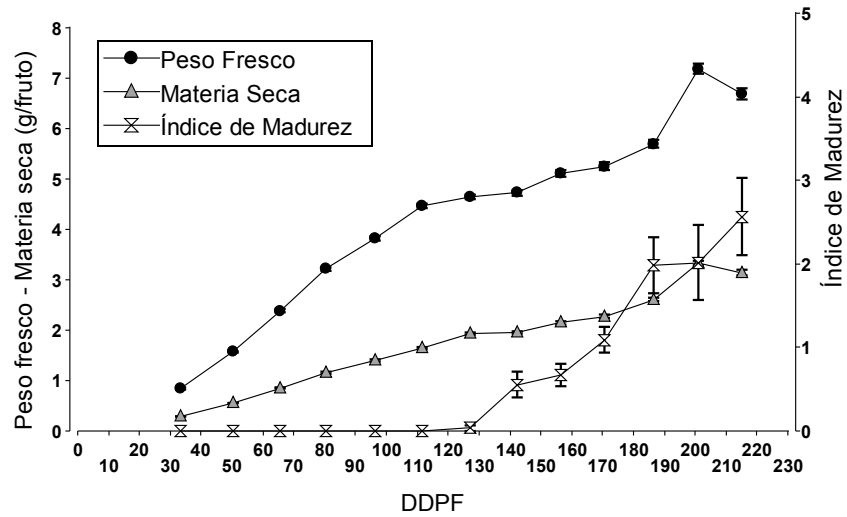


Figura 4: Evolución del área de oleosomas ( $\mu\text{m}^2$ ) en células de la sección media del mesocarpo y dinámica de la acumulación de aceite (g/100 g mesocarpo, según base seca) del cv. Arauco en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF). Los datos representan el promedio de 5 árboles. Las mediciones del área de oleosomas se realizaron en 10 frutos/árbol.

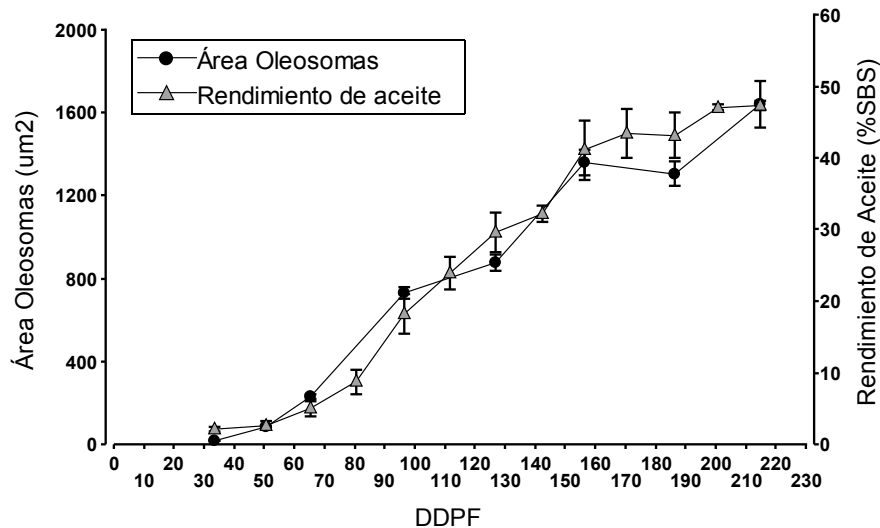
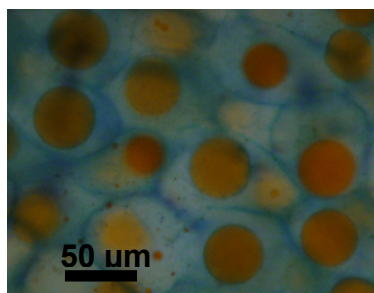


Figura 5: Células del mesocarpo, conteniendo un único glóbulo de aceite, de frutos del cv. Arauco obtenidos a partir de 150 días posteriores a la fase fenológica de plena floración.



## **Evolución de la composición de ácidos grasos totales**

En las figuras 6 y 7 se muestra la evolución del contenido de los ácidos grasos (AG) principales de los aceites en los estadios de desarrollo y maduración analizados.

El patrón general de variación de la concentración de los dos AG saturados presenta tendencias muy similares. En etapas tempranas del desarrollo de los frutos y hasta aproximadamente 60 – 80 DDPF se observa una disminución significativa de sus concentraciones. En este periodo, el contenido de ácido palmítico se reduce desde valores del 27 % a concentraciones próximas al 20 %. Posteriormente y hasta los 200 DDPF (IM 2), su contenido no registra variaciones significativas. Finalmente, con IM superior a 2 se observa una leve disminución a valores cercanos al 17 %.

Para el ácido esteárico la reducción va del 3,8 al 2,3 % (60 – 70 DDPF). A continuación se registra un aumento gradual y significativo que resulta en porcentajes próximos al 3 % a los 110 DDPF. A partir de este momento, la concentración se mantiene prácticamente estable.

Al considerar las concentraciones de cada uno de los ácidos saturados desde el inicio de la madurez, se observa que las mismas se mantienen dentro de los rangos establecidos por el COI (7,5 – 20 % para el ácido palmítico, 0,5 – 5 % para el ácido esteárico) para aceites de oliva extra virgen.

En general, las tendencias mencionadas anteriormente difieren parcialmente de aquellas descritas para otros cultivares (Beltrán et al., 2008; Baccouri et al., 2008; Menz y Vriesekoop, 2010), en los cuales los niveles de los dos ácidos saturados disminuyen durante la maduración de los frutos. Gómez-González et al. (2011) han observado asimismo que, en los cultivares Arbequina y Manzanilla, la suma de las concentraciones de ambos ácidos saturados muestra una tendencia decreciente durante la maduración.

En relación a la evolución del contenido de ácido palmitoleico, el cual se forma a expensas del ácido palmítico, se observa un aumento gradual, prácticamente lineal, hasta los 200 DDPF.

La dinámica de acumulación del ácido oleico presenta dos fases netamente definidas. La primera, de incremento rápido, culmina aproximadamente a los 80 DDPF con porcentajes cercanos al 70 % antes del inicio del periodo de maduración de los frutos. Posteriormente, se observa una fase de decrecimiento en la cual la concentración disminuye gradualmente y se estabiliza en valores próximos al 62 % luego de 180 DDPF. Entre los 60 - 70 DDPF y hasta el final del periodo de muestreo evaluado, las concentraciones de ácido oleico se mantienen dentro del rango establecido por el COI (55 - 83 %) para aceites de oliva extra virgen.

En general, los resultados mencionados en el párrafo anterior coinciden con datos obtenidos por Rondanini et al. (2014) en diversas variedades de olivo cultivadas en la

provincia de La Rioja. Estos investigadores observaron que durante el desarrollo del fruto el ácido oleico alcanza valores similares, cercanos al 70 %, en el aceite de todas las variedades evaluadas (Arauco, Arbequina, Barnea, Coratina, Frantoio y Manzanilla Fina). Sin embargo, su contenido se reduce marcadamente en los cultivares Arbequina y Arauco, hasta valores por debajo del 50 % antes del inicio de la maduración de los frutos.

Beltrán et al. (2008) y Hernández et al. (2009) han observado que durante la primer fase del crecimiento (antes del endurecimiento del endocarpo) los frutos jóvenes se comportan como órganos fotosintéticos, teniendo la capacidad de metabolizar fotoasimilados fijados tanto en hojas como en cloroplastos de los propios frutos (Salas et al., 2000). Se ha sugerido que dicha actividad se produce principalmente en el tejido subyacente a la epidermis, el cual es más activo que el mesocarpo en la síntesis de ácidos grasos poli-insaturados (Hernández et al., 2009). En drupas muy jóvenes (30 - 35 DDPF), las proporciones de los dos ácidos poli-insaturados es relativamente alta (21 % para ácido linoleico, 17 % para ácido linolénico). A continuación, experimentan una disminución rápida y abrupta hasta llegar a valores próximos al 6 % (ácido linoleico) y al 1,5 % (ácido linolénico), aproximadamente a los 80 DDPF. Posteriormente, la concentración del ácido linoleico se incrementa de manera casi lineal hasta llegar a valores constantes, próximos al 15 %, luego de 190 DDPF. De esta manera, la evolución que experimenta el contenido de este ácido graso sigue una curva en forma de V con un mínimo que coincide con el máximo de acumulación de ácido oleico.

En el caso del ácido linolénico, en el lapso comprendido entre 80 y 130 DDPF, tiene lugar una disminución leve pero estadísticamente significativa. Posteriormente, las concentraciones se mantienen estables con valores por debajo del 1 %.

La tendencia opuesta entre las concentraciones de los ácidos oleico y linoleico, ampliamente documentada en lípidos de reserva de semillas (Maestri et al., 1998; Martínez y Maestri, 2008; Werteker et al., 2010), también se observa en el aceite del mesocarpo del fruto del olivo. Al considerar las concentraciones de ambos ácidos grasos durante las fases de desarrollo y maduración evaluadas, la evolución de las mismas se ajusta a una regresión lineal con un valor de  $R^2 = 0,77$  (fig. 8).



Figura 6: Evolución del contenido de los ácidos grasos totales mayoritarios (palmítico, 16:0; oleico, 18:1; linoleico, 18:2) del aceite del cv. Arauco en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF). Los datos representan el promedio de 5 árboles.

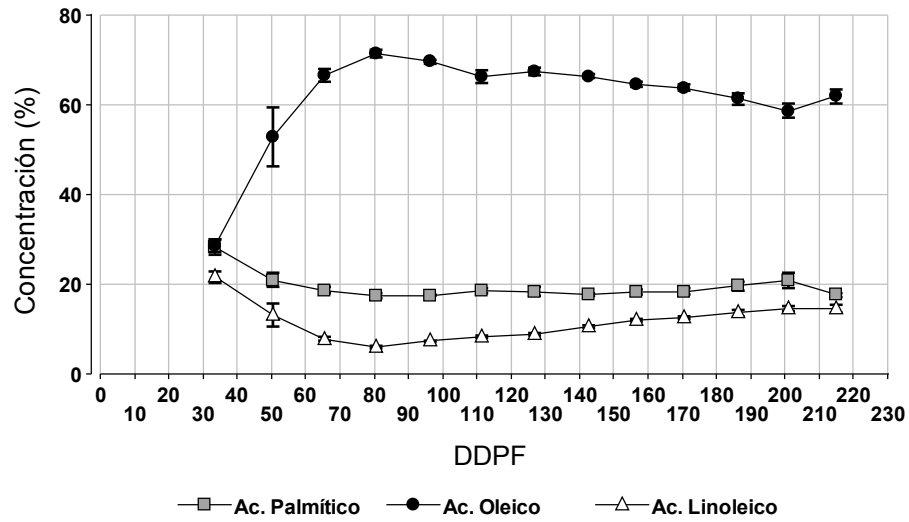


Figura 7: Evolución del contenido de los ácidos grasos totales minoritarios (palmitoleico, 16:1; esteárico, 18:0; linolénico, 18:3) del aceite del cv. Arauco en función de días posteriores a la fase fenológica de plena floración (DDPF). Los datos representan el promedio de 5 árboles.

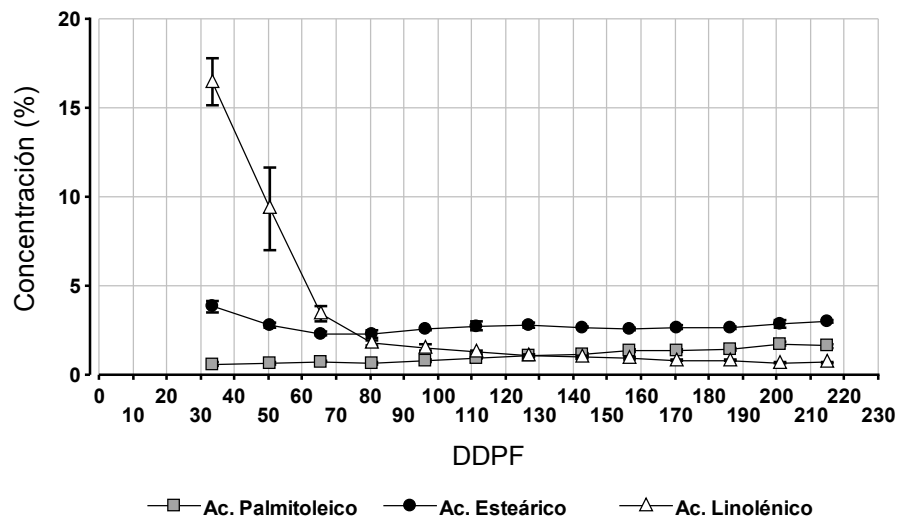
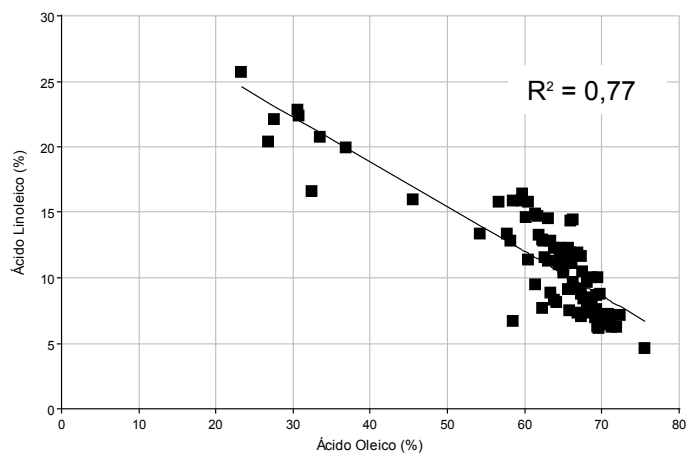


Figura 8: Análisis de regresión entre las concentraciones (% respecto del total de ácidos grasos del aceite) de los ácidos oleico y linoleico en el aceite del cv. Arauco.



## Dinámica de los cambios en la composición de glicéridos

La síntesis de glicéridos, que culmina con la acumulación de oleosomas en las células del mesocarpo, ocurre a través de una serie de cuatro reacciones principales (Fig. 2). En la primera de ellas, la acilación del glicerol-3-fosfato da lugar a la formación del ácido lisofosfatídico correspondiente. Esta reacción es mediada por la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa (G3PAT) (Salas et al., 2000). Los datos analíticos obtenidos luego del fraccionamiento de las muestras de aceite provenientes de los primeros estadios de desarrollo de los frutos, muestran que la fracción de lisofosfatidato se encuentra marcadamente enriquecida en ácido palmítico (Tabla 1). Esta característica se mantiene en las drupas cosechadas aproximadamente hasta los 65 DDPF, aunque su contenido sigue siendo elevado hasta los 80 DDPF. A partir de los 50 DDPF, la composición de esta fracción refleja una disminución gradual en el contenido de ácido palmítico, y al mismo tiempo, un aumento progresivo del contenido de ácido oleico, el cual sobrepasa al del ácido palmítico al finalizar la fase de endurecimiento del endocarpo, aproximadamente 80 DDPF. La enzima G3PAT ha sido aislada y purificada a partir de células del mesocarpo de algunos frutos con alto contenido de aceite (palma, palta) (Eccleston y Harwood, 1995; Chen et al., 2011). El estudio de su actividad ha puesto en evidencia que, si bien es activa frente a una variedad de ácidos grasos, muestra preferencia por palmitato, aunque también puede aceptar oleato, especialmente si éste está presente en concentraciones elevadas (Salas et al., 2000; Conde et al., 2008). Aunque no existen estudios detallados de la especificidad de la enzima G3PAT presente en células del mesocarpo del fruto del olivo, el análisis estereoespecífico de sus glicéridos ha revelado que la posición *sn*-1 (el sitio de actividad de G3PAT) se encuentra esterificado mayoritariamente por estos dos ácidos grasos (Sakohui et al., 2011; Ollivier et al., 2014).

El análisis de la composición de ácidos grasos totales muestra que hasta los 70 – 80 DDPF la evolución del contenido de los ácidos palmítico y oleico presenta tendencias opuestas (Fig. 6). La concentración del primero registra valores próximos al 30 % en drupas obtenidas a los 33 DDPF y disminuye significativamente hasta valores cercanos al 20 % a los 80 DDPF. En este mismo periodo, el contenido de ácido oleico se incrementa casi linealmente hasta alcanzar su máxima concentración (72 %). Si bien las concentraciones iniciales (medidas a los 33 DDPF) de estos ácidos grasos en el aceite total resultan muy similares, la predominancia de ácido palmítico en la fracción de lisofosfatidato constituye una evidencia a favor de la hipótesis que sostiene una mayor selectividad de la enzima G3PAT por palmitato antes que por oleato. Sin embargo, a partir de los 80 DDPF, la composición de esta fracción muestra predominio de ácido oleico. Este resultado es concordante con estudios realizados en diversas especies donde se ha observado que G3PAT puede incorporar ácido oleico cuando el mismo

alcanza una proporción elevada en el “pool” de ácidos grasos presentes (Harwood, 1998).

Las reacciones que conducen a la formación de diglicéridos involucran la actividad, en forma sucesiva, de las enzimas lisofosfatidato aciltransferasa (LPAAT) y fosfatidato fosfohidrolasa. Mientras la primera de ellas cataliza la incorporación de un nuevo grupo acilo a la posición *sn*-2 del lisofosfatidato, la segunda escinde el enlace éster fosfórico dando lugar a la liberación del correspondiente diacilglicérido. Debido a la especificidad con respecto al ácido graso que incorpora, LPAAT podría tener un papel determinante en la composición del aceite. En la mayor parte de las especies vegetales estudiadas, los estudios cinéticos realizados demuestran que LPAAT presenta una fuerte especificidad por oleil-CoA y es prácticamente inactiva frente a acil-CoAs de ácidos grasos saturados. No hay antecedentes de estudios sobre la actividad de esta enzima en el fruto del olivo. En el presente trabajo se observa que el ácido oleico predomina marcadamente en la composición de la fracción de diglicéridos a lo largo de todo el periodo de crecimiento y desarrollo de los frutos. Otros estudios que aportan datos sobre la estereoquímica de los glicéridos del aceite de oliva (Aranda et al., 2004; Galeano Díaz et al., 2005; Sakouhi et al., 2011; Ollivier et al., 2014) dan cuenta de la elevada proporción de ácido oleico en la posición *sn*-2 de los mismos. Estas evidencias sugieren que LPAAT presente en frutos del olivo tendría un comportamiento similar al observado en semillas de varias especies oleaginosas, entre ellas la colza, el cártamo y el ricino (Ichihara et al., 1987; Cao et al., 1990), donde esta enzima es altamente selectiva por oleil-CoA.

La última fase en la biosíntesis de triglicéridos, es decir, el acoplamiento de una unidad de diacilglicerol con una de acil-CoA, es catalizada por la enzima diacilglicerol aciltransferasa (DAGAT). En semillas, esta enzima parece mostrar una baja especificidad con respecto al ácido graso que esterifica (Snyder et al., 2009). De acuerdo a Lung y Weselake (2006) la selectividad de DAGAT depende en gran medida de la concentración y composición del “pool” de ácidos grasos presentes en la célula, por lo cual su especificidad podría variar entre las distintas especies. Así, se ha observado que en semillas de soja y maíz el linoleato es el sustrato preferido, mientras que en maní y en ricino la enzima es más activa frente a palmitato (Cao y Huang, 1986). En semillas de cártamo, en cambio, DAGAT no muestra selectividad en la incorporación de ácidos grasos saturados e insaturados (Ichihara et al., 1988). Por último, en fracciones microsomales de células del mesocarpo del fruto de la palma el orden de especificidad de la enzima es oleato > palmitato > miristato > estearato (Oo y Chew, 1992).

Aunque el análisis realizado en el presente estudio no permite conocer específicamente el o los ácido/s grasos que se incorporan en la última fase de la

biosíntesis de los glicéridos, se observa que: a) el ácido oleico predomina marcadamente en la fracción de triglicéridos en todos los estadios de desarrollo y maduración evaluados, b) a partir de los 110 DDPF esta fracción experimenta un incremento en las proporciones relativas de los ácidos palmítico y linoleico, c) a los 170 DDPF la composición de triglicéridos refleja aproximadamente la composición del aceite total (Figs. 6 y 7). Estos resultados se corresponden con estudios realizados por Sakouhi et al. (2011) y Ollivier et al. (2014) en numerosos cultivares de olivo, donde se ha encontrado que la posición *sn*-3 de los triglicéridos está esterificada mayormente por oleato y, en menor proporción, por palmitato y linoleato.

Si bien los datos de composición de los glicéridos parciales permiten inferir cierta selectividad en la secuencia de acilación, ésta parece estar influenciada por la abundancia relativa de los sustratos (los grupos acilo de los diferentes ácidos grasos) presentes en las distintas fases de la biogénesis del aceite. Esta hipótesis es soportada por resultados obtenidos en experimentos realizados bajo condiciones *in vitro* (cultivos de tejidos de mesocarpo de olivo y palma) donde se ha observado que la síntesis de glicéridos y su composición dependen del balance entre la formación de ácidos grasos (síntesis *de novo*) y su posterior incorporación al glicerol-3-fosfato según la secuencia ya descrita (“Kennedy pathway”) (Ramli et al., 2002).

Tabla 1: Variación de la composición de ácidos grasos de las fracciones de acilglicéridos en el aceite del cv. Arauco obtenido a partir del mesocarpo de frutos en distintos estadios de desarrollo.

DDPF <sup>a</sup>	Fracción <sup>b</sup>	Ácidos grasos <sup>c</sup>					
		C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3
33	1	69,9 ± 16,4	Tr	1,75 ± 1,50	21,7 ± 18,8	5,21 ± 7,21	1,43 ± 1,18
	2	10,2 ± 1,15	Tr	0,60 ± 0,01	89,5 ± 1,01	0,13 ± 0,02	0,55 ± 0,01
	3	5,32 ± 0,50	Tr	0,30 ± 0,01	83,9 ± 1,52	10,6 ± 1,04	0,30 ± 0,01
50	1	79,1 ± 5,5	Tr	0,90 ± 0,62	16,9 ± 3,71	2,70 ± 1,73	0,40 ± 0,19
	2	10,6 ± 0,39	Tr	0,60 ± 0,01	89,2 ± 2,80	0,15 ± 0,07	0,60 ± 0,05
	3	15,0 ± 6,12	Tr	2,08 ± 1,25	75,3 ± 11,0	4,59 ± 0,78	4,02 ± 3,55
65	1	57,4 ± 2,89	Tr	0,13 ± 0,04	42,3 ± 2,91	0,17 ± 0,02	0,60 ± 0,07
	2	10,4 ± 0,30	Tr	0,14 ± 0,02	88,9 ± 4,40	0,22 ± 0,20	0,17 ± 0,10
	3	16,3 ± 4,32	Tr	2,00 ± 1,20	73,9 ± 7,90	5,15 ± 1,11	1,68 ± 0,64
80	1	37,3 ± 19,6	Tr	7,47 ± 1,12	46,5 ± 4,06	8,30 ± 3,22	0,47 ± 0,71
	2	10,0 ± 0,26	Tr	0,15 ± 0,11	89,3 ± 0,58	0,23 ± 0,20	0,19 ± 0,11
	3	16,3 ± 5,77	Tr	3,22 ± 1,48	72,5 ± 12,8	6,26 ± 2,14	0,69 ± 0,44
96	1	18,1 ± 2,05	Tr	7,55 ± 0,92	67,6 ± 4,21	5,33 ± 1,13	1,34 ± 0,22
	2	14,1 ± 3,41	Tr	5,79 ± 1,02	70,1 ± 3,25	6,07 ± 0,80	3,93 ± 1,15
	3	17,9 ± 0,64	Tr	4,43 ± 0,93	70,1 ± 4,60	5,92 ± 1,72	0,41 ± 0,16
111	1	17,5 ± 1,49	Tr	8,19 ± 0,96	62,8 ± 12,2	9,95 ± 0,09	1,52 ± 0,32
	2	15,3 ± 1,49	Tr	8,12 ± 3,49	71,5 ± 0,38	3,14 ± 0,63	1,98 ± 0,59
	3	22,0 ± 3,83	0,91 ± 0,20	5,20 ± 2,73	64,0 ± 7,09	5,55 ± 1,72	3,19 ± 0,91
127	1	ND					
	2	1,50 ± 0,23	Tr	0,15 ± 0,08	98,1 ± 0,42	0,23 ± 0,1	0,06 ± 0,02
	3	20,4 ± 1,71	1,01 ± 0,01	5,78 ± 2,14	64,4 ± 6,60	7,59 ± 3,21	1,53 ± 0,96
142	1	ND					
	2	1,29 ± 0,06	Tr	0,09 ± 0,05	98,4 ± 0,19	0,14 ± 0,07	0,04 ± 0,02
	3	21,3 ± 3,17	1,50 ± 0,77	3,69 ± 0,38	63,0 ± 3,44	9,07 ± 1,27	1,41 ± 0,42
156	1	ND					
	2	ND					
	3	21,9 ± 1,84	0,97 ± 0,36	2,79 ± 2,16	61,7 ± 1,95	11,7 ± 1,11	1,09 ± 0,41
170	1	ND					
	2	ND					
	3	20,9 ± 2,57	1,39 ± 0,28	2,03 ± 0,49	61,3 ± 1,12	13,0 ± 1,84	1,06 ± 0,32
186	1	ND					
	2	ND					
	3	20,4 ± 2,79	1,28 ± 0,88	2,44 ± 1,44	62,0 ± 1,86	13,2 ± 1,04	0,76 ± 0,38

Referencias: <sup>a</sup> días después de plena floración; <sup>b</sup> 1, lisofosfatidato; 2, diacilglicerol; 3, triacilglicerol; <sup>c</sup> C16:0, palmitato; C16:1, palmitoleato; C18:0, estearato; C18:1, oleato; C18:2, linoleato; C18:3, linolenato. Valores medios (n = 5) ± desvío estándar. Tr: traza (< 0.1 %); ND: no detectado.

## CONCLUSIONES

En el cv. Arauco, la dinámica de acumulación de aceite durante el desarrollo del mesocarpo se adapta a una curva de tipo sigmoide con tres fases más o menos definidas. La primera, de acumulación lenta, caracteriza a los frutos recién formados y tiene lugar hasta la finalización del periodo de endurecimiento del endocarpo, aproximadamente a los 80 DDPF. La segunda fase, de acumulación rápida, se extiende hasta los 160 DDPF. Durante la misma tiene lugar una síntesis activa de triglicéridos. En la tercera fase se produce una ralentización y finalmente la paralización de la síntesis lipídica. El inicio de esta fase prácticamente estacionaria coincide con los primeros cambios de coloración de la epidermis que marcan el inicio de la maduración. Durante la misma, no se observan diferencias en el contenido de aceite de los frutos. El proceso de acumulación de aceite culmina con la formación de una única gota que ocupa gran parte del volumen de la célula.

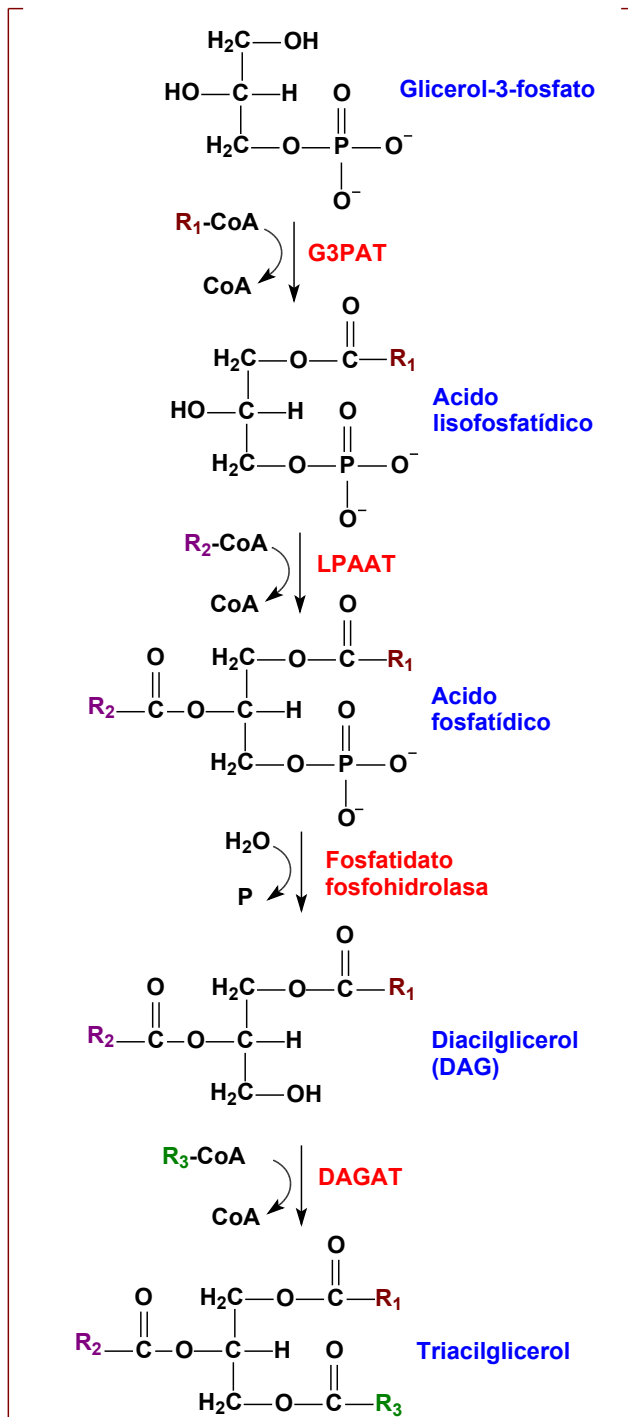
La información que proporciona el estudio de la composición de ácidos grasos de las diferentes fracciones de glicéridos, junto con el análisis estereoquímico de triglicéridos de diversos aceites de oliva, aportan evidencias sobre la selectividad de las enzimas que participan en la biosíntesis de estos últimos. De esta manera, en el aceite del cv. Arauco, la secuencia de incorporación de ácidos grasos en los glicéridos parciales parece ocurrir según un patrón donde la transferencia de palmitil-CoA, mediada por G3PAT, prevalece en la primera fase de la biosíntesis (la formación del ácido lisofosfatítico), en estadios tempranos de desarrollo de los frutos (aproximadamente hasta 65 DDPF). A la vez, su tasa de incorporación se reduce al mismo tiempo que se incrementa la del ácido oleico. Este último no sólo contribuye a la fracción de lisofosfatidato sino también, fundamentalmente, a la formación de di y triacilglicéridos por acilaciones sucesivas en las posiciones *sn-2* y *sn-3*, mediadas por LPAAT y DAGAT, respectivamente. La presencia de triacilglicéridos se registra desde fases muy tempranas del desarrollo, al principio con una elevada una proporción de ácido oleico (> 80 %) y posteriormente con un descenso paulatino de su concentración hasta alcanzar valores constantes en el periodo previo al inicio de la maduración de los frutos. A partir de este momento, se observa un incremento en las proporciones de los ácidos palmítico y linoleico, los cuales logran concentraciones relativamente estables durante la fase de envero. La incorporación de los tres ácidos grasos principales a los glicéridos de los aceites analizados se puede resumir según la secuencia indicada en la Figura 9.

Desde un punto de vista práctico, el comienzo precoz de la fase de disminución en el contenido de ácido oleico que tiene lugar en el periodo previo al inicio de la maduración de los frutos, antes de alcanzar la máxima concentración de aceite, representa un inconveniente a los fines de establecer una época óptima de cosecha para la producción



de este último. Sobre la base de la evolución de estos dos parámetros, el periodo de recolección apropiado podría establecerse antes del inicio del envero ( $IM < 2$ ), momento en el cual finaliza la fase de síntesis activa del aceite y el contenido de ácido oleico no muestra su máxima declinación.

Figura 9: Esquema propuesto para la incorporación de los tres ácidos grasos principales (palmítico, oleico, linoleico) a los glicéridos del aceite del cv. Arauco.



$R_1$  = Principalmente Palmitato (hasta los 60 - 70 DDPF), posteriormente Oleato.

$R_2$  = Casi exclusivamente Oleato.

$R_3$  = Principalmente Oleato, en menor proporción Palmitato y Linoleato.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la educación pública y gratuita de mi país, en especial a la Universidad Nacional de Córdoba, por abrirme sus puertas, mantenerlas siempre abiertas, y otorgarme la posibilidad de alcanzar un título universitario.

A los miembros del Laboratorio de la Cátedra de Química Orgánica: Julio, Sebastián, Romina, Marcela, José, por sus cuidados y enseñanzas, por su apoyo, colaboración y conocimientos compartidos.

Principalmente a mi Director, Damián Maestri, por su permanente predisposición, sus conocimientos, su ayuda incondicional, por su tiempo, y por brindarme la oportunidad de culminar la carrera. Sobre todo por su inagotable paciencia y comprensión.

A Sebastián Dambolena, por su guía, su valiosa ayuda y su voluntad.

Al tribunal evaluador, Dr. Julio Zygadlo, Dr. Damián Maestri y Dra. Diana Labuckas, por su predisposición y buena voluntad.

Al más especial de mis amigos, mi compañero, soporte y sostén, Santiago Ariel, quien dio el puntapié final, el empuje decisivo que me impulsó a concluir la Tesina, y recibir el título de Bióloga. Sin su apoyo y paciencia, no hubiera sido posible.

Por último, a mis hijos y a mis padres, a quienes dedico este trabajo y todos mis esfuerzos. A ellos, por creer y confiar en mí en todo momento, y ser los pilares fundamentales de apoyo en mi vida. A Germán, Joaquín y Santiago, mi motivación esencial de vida, por ser el motor que me inspira y me da fuerzas. A mi padre, por su incansable insistencia y perseverancia incitándome siempre a terminar mi carrera. Y muy especialmente a mi madre, quien me ayudó incondicionalmente a lo largo de toda mi historia académica, haciendo posible mi dedicación y esfuerzo. A ella le debo la enorme e invaluable oportunidad de atender mis estudios.

## BIBLIOGRAFIA

- AOCS (1998). Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. AOCS Press, Champaign, USA.
- Aranda, F., Gómez-Alonso, S.G., Rivera del Alamo, R.M., Salvador, M.D., Fregapane, G. (2004). Triglyceride, total and 2-position fatty acid composition of Cornicabra virgin olive oil: Comparison with other Spanish cultivars. *Food Chem.* 86: 485-492.
- Baccouri, O., Guerfel, M., Baccouri, B., Cerretani, L., Bendini, A., Lercker, G., Zarrouk, M., Ben Miled, D.D. (2008). Chemical composition and oxidative stability of Tunisian monovarietal virgin olive oils with regard to fruit ripening. *Food Chem.* 109: 743-754.
- Beltrán, G., Del Río, C., Sánchez, S., Martínez, L. (2004). Influence of harvest date and crop yield on the fatty acid composition of virgin olive oils from cv. Picual. *J. Agric. Food Chem.* 52: 3434-3440.
- Beltrán, G., Uceda, M., Hermoso, M., Frías, L. (2008). Maduración. En: El cultivo del olivo (Barranco, D.; Fernández- Escobar, R. y L, Rallo, Eds.). Ediciones Mundi Prensa. Andalucía, España, pp. 163-187.
- Breton, C., Souyris, I., Villemur, P., Berville, A. (2009). Oil accumulation kinetic along ripening in four olive cultivars varying for fruit size. *OCL* 16: 58-64.
- Cao, Y., Huang, A.H.C. (1986). Diacylglycerol acyltransferase in maturing oil seeds of maize and other species. *Plant Physiol.* 82: 813-820.
- Cao, Y., Oo, K., Huang, A.H.C. (1990). Lysophosphatidate acyltransferase in the microsomes from maturing seeds of meadowfoam (*Limnanthes alba*). *Plant Physiol.* 94: 1199-1206.
- Chen, X., Snyder, C.L., Truksa, M., Shah, S., Weselake, R.J. (2011). *sn*-Glycerol-3-phosphate acyltransferases in plants. *Plant Signal Behav.* 6: 1695-1699.
- Civantos, L. (2008). La olivicultura en el mundo y en España. En: El cultivo del olivo (Barranco, D.; Fernández- Escobar, R. y L, Rallo, Eds.). Ediciones Mundi Prensa. Andalucía, España, pp. 17-35.
- Conde, C., Delrot, S., Gerós, H. (2008). Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive development and ripening. *J. Plant Physiol.* 165: 1545-1562.
- Dag, A., Kerem, Z., Yogev, N., Zipori, I., Lavee, S., Ben-David, E. (2011). Influence of time of harvest and maturity index on olive oil yield and quality. *Sci. Hortic.* 127: 358-366.
- Damak, N., Bouaziz, M., Ayadi, M., Sayadi, S., Damak, M. (2008). Effect of the maturation process on the phenolic fractions, fatty acids, and antioxidant activity of the Chétoui olive fruit cultivar. *J. Agric. Food Chem.* 56: 1560-1566.

- Eccleston, V.S., Harwood, J.L. (1995). Solubilization, partial purification and properties of acyl-CoA:glycerol-3-phosphate acyltransferase from avocado (*Persea americana*) fruit mesocarp. *Biochim. Biophys. Acta.* 1257: 1-10.
- Farinelli, D., Pierantozzi, P., Palese, A.M. (2012). Pollenizer and cultivar influence on seed number and fruit characteristics in *Olea europaea* L. *Hort. Science* 47: 1430-1437.
- Galeano Díaz, T., Durán Merás, I., Sánchez Casas, J., Alexandre Franco, M.F. (2005). Characterization of virgin olive oils according to its triglycerides and sterols composition by chemometric methods. *Food Control* 16: 339-347.
- Garrido Fernández, A., Fernández Díez, M.J., Adams, M.R. (1997). Table olives. Production and processing. Chapman & Hall, London, UK.
- Gómez-González, S., Ruiz-Jiménez, J., De Castro, M.D.L. (2011). Oil content and fatty acid profile of Spanish cultivars during olive fruit ripening. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88: 1737-1745.
- Harwood, J.L. (1998). Fundamentals and agricultural applications. En: Plant Lipid Biosynthesis (Harwood, J.L., Ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 1-26.
- Hernández, M.L., Padilla, M., Mancha, M., Martínez-Rivas, J.M. (2009). Expression analysis identifies FAD2-2 as the olive desaturase gene mainly responsible for the linoleic acid content in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 57: 6199-6206.
- Ichihara, K., Asahi, T., Fujii, S. (1987). 1-Acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase in maturing safflower seeds and its contribution to the non-random fatty acid distribution of triacylglycerol. *Eur. J. Biochem.* 167: 339-347.
- Ichihara, K., Takahashi, T., Fujii, S. (1988). Diacylglycerol acyltransferase in maturing safflower seeds: its influences on the fatty acid composition of triacylglycerol and on the rate of triacylglycerol synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 958: 125-129.
- IOOC (2000). International Olive Oil Council. World Catalogue of Olive Varieties. Madrid, Spain.
- Kiritsakis, A.K. (1992). Química del aceite de oliva. En: El aceite de oliva. A. Madrid Vicente Ediciones. Madrid, España, pp. 45-76.
- Lavee, S. (1986). Olive. En: Handbook of fruit set and development (Monselise, S., Ed.). CRC Press, pp. 261-276.
- Lazzez, A., Perri, E., Caravita, M.A., Khlif, M., Cossentini, M. (2008). Influence of olive maturity stage and geographical origin on some minor components in virgin olive oil of the chemlali variety. *J. Agric. Food Chem.* 56: 982-988.
- Lung, S., Weselake, R.J. (2006). Diacylglycerol acyltransferase: a key mediator of plant triacylglycerol synthesis. *Lipids* 41: 1073-1088.

- Maestri, D.M., Guzmán, C.A. (1995). A comparative study of seed lipid components of *Nicotianeae* (Solanaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 23: 201-207.
- Maestri, D.M., Labuckas, D.O., Meriles, J.M., Lamarque, A.L., Zygodlo, J.A., Guzmán, C.A. (1998). Seed composition of soybean cultivars evaluated in different environmental regions. *J. Sci. Food Agric.* 77: 494-498.
- Martínez, M.L., Maestri, D.M. (2008). Oil chemical variation in walnut (*Juglans regia* L.) genotypes grown in Argentina. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110: 1183-1189.
- Matteucci, M., D'Angeli, S., Errico, S., Lamanna, R., Perrotta, G., Altamura, M.M. (2011). Cold affects the transcription of fatty acid desaturases and oil quality in the fruit of *Olea europaea* L. genotypes with different cold hardiness. *J. Exp. Bot.* 62: 3403-3420.
- Menz, G., Vriesekoop, F. (2010). Physical and chemical changes during the maturation of Gordal Sevillana olives (*Olea europaea* L., cv. Gordal Sevillana). *J. Agric. Food Chem.* 58: 4934-4938.
- Moscattelli, G., Muro, E.E., Salazar, L.P., Gorgas J.C. (1990). Atlas de suelos de la República Argentina. Buenos Aires
- Ollivier, D., Pinatel, C., Ollivier, V., Artaud, J. (2014). Composición de ácidos grasos y triglicéridos de aceites de oliva vírgenes de 34 variedades y 8 denominaciones de origen francesas, y de 2 variedades extranjeras implantadas en Francia: elaboración de un banco de datos (Parte I). *Olivae* 119: 37-49.
- Oo, K.C., Chew, Y. H. (1992). Diacylglycerol acyltransferase in microsomes and oil bodies of oil palm mesocarp. *Plant Cell Physiol.* 33: 189-195.
- Rallo, P., Rapoport, H.F. (2001). Early growth and development of the olive fruit mesocarp. *J. Hort. Sci. Biotech.* 76: 408-412.
- Rallo, L., Cuevas, J. (2008). Fructificación y producción. En: El cultivo del olivo (Barranco, D.; Fernández- Escobar, R. y Rallo, L., Eds.). Ediciones Mundi Prensa. Andalucía, España, pp. 127-162.
- Ramli, U.S., Baker, D.S., Quant, P.A., Harwood, J.L. (2002). Control analysis of lipid biosynthesis in tissue cultures from oil crops shows that flux control is shared between fatty acid synthesis and lipid assembly. *Biochem. J.* 364: 393-401.
- Ramli, U.S., Baker, D.S., Quant, P.A., Harwood, J.L. (2002). Control mechanisms operating for lipid biosynthesis differ in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and olive (*Olea europaea* L.) callus cultures. *Biochem. J.* 364: 385-391.
- Rangel, B., Platt, K.A., Thomson, W.W. (1997). Ultrastructural aspects of the cytoplasmic origin and accumulation of oil in olive fruit (*Olea europaea*). *Physiol. Plant.* 101: 109-114.

- Rapoport, H.F. (2008). Botánica y morfología. En: El cultivo del olivo (Barranco, D.; Fernández- Escobar, R. y Rallo, L., Eds.). Ediciones Mundi Prensa. Andalucía, España, pp. 37-62.
- Romano, R., De Micco, V., Aronne, G. (2004). Caratteristiche istologiche e citologiche dei frutti di alcune cultivar di olivo. *Riv. Ital. Sost. Grasse* LXXXI: 73-79.
- Rondanini, D.P., Castro, D.N., Searles, P.S., Rousseaux, M.C. (2014). Contrasting patterns of fatty acid composition and oil accumulation during fruit growth in several olive varieties and locations in a non-Mediterranean region. *Eur. J. Agron.* 52: 237-246.
- Ross, J.H.E., Sánchez, J., Millán, F., Murphy, D.J. (1993). Differential presence of oleosins in oleogenic seed and mesocarp tissue in olive (*Olea europaea*) and avocado (*Persea americana*). *Plant Sci.* 93: 203-210.
- Sakouhi, F., Herchi, W., Sebei, K., Absalon, C., Kallel, H., Boukhchina, S. (2011). Accumulation of total lipids, fatty acids and triacylglycerols in developing fruits of *Olea europaea* L. *Sci. Hortic.* 132: 7-11.
- Salas, J.L., Sánchez, J., Ramli, U.S., Manaf, A.M., Williams, M., Harwood, J.L. (2000). Biochemistry of lipid metabolism in olive and other oil fruits. *Progress Lipid Res.* 39: 151-180.
- Salvador, M.D., Aranda, F., Fregapane, G. (2001). Influence of fruit ripening on Cornicabra virgin olive oil quality. A study of four successive crop seasons. *Food Chem.* 73: 45-53.
- Snyder, C.L., Yurchenko, O.P., Siloto, R.M., Chen, X., Liu, Q., Mietkiewska, E., Weselake, R.J. (2009). Acyltransferase action in the modification of seed oil biosynthesis. *New Biotechnol.* 26: 11-16.
- Torres, M.M., Pierantozzi, P., Maestri, D.M., Orecchia, E., Santos, E. (2007). Catálogo de las variedades de olivo de la provincia de Córdoba. Ediciones INTA, Córdoba, Argentina.
- Torres, M.M., Pierantozzi, P., Cáceres, M. E., Labombarda, P., Fontanazza G., Maestri, D.M. (2009). Genetic and chemical assessment in Arbequina olive cultivar grown in Córdoba province (Argentina). *J. Sci. Food Agric.* 89: 523-530.
- Uceda, M., Hermoso, M., Aguilera, M.P. (2008). La calidad del aceite de oliva. En: El cultivo del olivo (Barranco, D.; Fernández- Escobar, R. y L, Rallo, Eds.). Ediciones Mundi Prensa. Andalucía, España, pp. 699-727.
- Werteker, M., Lorenz, A., Johannes, H., Berghofer, E., Findlay, C.S. (2010). Environmental and varietal influences on the fatty acid composition of rapeseed, soybeans and sunflowers. *J. Agron. Crop Sci.* 196: 20–27.