

**ESCUELA DE INGENIERÍAS AGRARIAS**



**ESTUDIO DE LA ADICIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES  
PARA LA REDUCCIÓN DE ACRILAMIDA EN ACEITUNAS NEGRAS  
OXIDADAS.**

TRABAJO FIN DE GRADO  
CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS.

Mercedes García Moreno.

Badajoz, julio 2019.

*Mercedes*

*García*

*Moreno.*

**ESTUDIO DE LA ADICIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES PARA  
LA REDUCCIÓN DE ACRILAMIDA EN ACEITUNAS NEGRAS  
OXIDADAS.**

**Ciencia y  
tecnología de los  
alimentos.**

**Julio, 2019**

**ESCUELA DE INGENIERÍAS AGRARIAS**



**ESTUDIO DE LA ADICIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES  
PARA LA REDUCCIÓN DE ACRILAMIDA EN ACEITUNAS NEGRAS  
OXIDADAS.**

TRABAJO FIN DE GRADO  
CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LOS ALIMENTOS.

Mercedes García Moreno.

Badajoz, julio 2019.

**TRABAJO FIN DE GRADO**

**ESTUDIO DE LA ADICIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES  
PARA LA REDUCCIÓN DE ACRILAMIDA EN ACEITUNAS NEGRAS  
OXIDADAS.**

**AUTOR:** MERCEDES GARCÍA MORENO.

**TUTOR/ES:** FRANCISCO PÉREZ NEVADO    DANIEL MARTÍN VERTEDOR

**Tutor**

**Cotutor**

**Fdo:**.....

**Fdo:**.....

**TRIBUNAL CALIFICADOR**

Vocal

Presidente

Secretario

Fdo.:\_\_\_\_\_

Fdo.:\_\_\_\_\_

Fdo.:\_\_\_\_\_

**Fecha lectura:**

## **ÍNDICE.**

## ÍNDICE

1.	Resumen.....	4
2.	Introducción.....	7
2.1.	Situación actual de la aceituna de mesa.....	7
2.2.	Definición de aceituna de mesa.....	10
2.3.	Procesado de la aceituna negra oxidada al estilo californiano.....	11
2.4.	Aparición de compuestos tóxicos en las aceitunas negras oxidadas.....	12
2.5.	Compuestos fenólicos, importancia y propiedades.....	14
2.6.	Extractos naturales.....	16
2.6.1.	Las hojas de olivo como fuentes de compuestos fitoquímicos.....	17
3.	Objetivos.....	21
4.	Material y métodos.....	22
4.1.	Materia prima empleada en los estudios.....	23
4.2.	Material vegetal: extractos vegetales.....	23
4.2.1.	Preparación de los extractos.....	23
4.2.2.	Adición de los extractos y tratamientos de esterilización de las aceitunas negras oxidadas.....	24
4.3.	Diseño experimental.....	25
4.3.1.	Análisis físico-químico del extracto.....	26
4.3.2.	Análisis físico-químico de las aceitunas.....	31
4.3.3.	Análisis instrumental de las aceitunas.....	32
4.3.4.	Análisis sensorial.....	33
4.3.5.	Análisis estadístico de los datos.....	36
5.	Resultados y discusión.....	38
5.1.	Caracterización de los extractos vegetales.....	38
5.1.1.	Estudio de la composición fenólica de los extractos.....	38
5.1.2.	Estudio de la actividad antioxidante de los extractos.....	40

5.2. Estudio de la adición de extractos a aceitunas de mesa oxidadas. ....	41
5.3. Análisis de los parámetros físico-químicos de las aceitunas tratadas con extractos de hoja de olivo.....	45
5.4. Estudio del contenido en acrilamida en aceitunas negras oxidadas tratadas con extractos de hoja de olivo.....	48
5.5. Estudio del perfil sensorial de las aceitunas tratadas con extracto de hoja de olivo. ....	50
6. Conclusiones. ....	54
7. Bibliografía.....	56

## **1. RESUMEN.**

## 1. RESUMEN.

Actualmente España se encuentra como el primer país productor de aceituna de mesa seguido de otros países del mundo. Dentro de España las Comunidades Autónomas con mayor producción son Andalucía y Extremadura. Uno de los procesos de elaboración de aceitunas de mesa más frecuentes es el de las aceitunas negras oxidadas o negras al estilo californiano. Sin embargo, el producto final no es estable microbiológicamente por lo que es obligatoria una esterilización con la aplicación de temperaturas entre 121 y 126°C durante 15 y 30 minutos, que produce una sustancia tóxica, la acrilamida. Por ello, el objetivo principal de este trabajo pretende determinar el efecto de la adición de extractos vegetales de hojas de olivo, sobre la concentración de acrilamida en las aceitunas negras oxidadas. Se utilizaron aceitunas negras oxidadas de la variedad Manzanilla Cacerreña, sometidas a un tratamiento con NaOH y oxidación con aire y finalmente esterilizadas térmicamente. Se realizaron 3 tratamientos experimentales: i) aceitunas negras oxidadas con adición del líquido de gobierno habitualmente usado por la empresa (Control); ii) aceitunas negras oxidadas con adición de extracto de hoja de olivo (ACEX1:10) y aditivos alimentarios propios de la empresa; y iii) aceitunas negras oxidadas con adición de extracto de hoja de olivo (ACEX1:100) y aditivos alimentarios propios de la empresa. A las latas de aceitunas de estos tratamientos se les determinaron: polifenoles totales, actividad antioxidante, pH, cloruros, acidez, acrilamida, color y análisis sensorial.

Los parámetros físico químicos de las aceitunas mostraron una acidez y cloruros con valores dentro de la normalidad para este tipo de aceitunas. Del mismo modo, los fenoles totales y la actividad antioxidante de las aceitunas fueron superiores con la adición del extracto más concentrado. Las aceitunas mostraron valores similares en la textura; sin embargo, con la adición del extracto 1:10, la dureza disminuyó ligeramente. Las aceitunas con extracto presentaron una tonalidad roja-amarillenta, y menor luminosidad. Respecto al contenido en acrilamida, las muestras que presentaron mayor contenido en este compuesto fueron las aceitunas negras oxidadas sin adición de extracto de hoja de olivo (Control). La adición de los extractos de hojas de olivo a las latas de aceitunas, previa a la esterilización térmica, disminuyó el contenido en dicha sustancia tóxica. Así, las muestras que presentaron menor contenido en acrilamida (120,7 ng/g), fueron las que contenían el extracto más concentrado (ACEX1:10). No obstante, ambos extractos (1:10 y 1:100) se consideraron positivos, ya que redujeron el contenido en acrilamida presente en las aceitunas negras oxidadas. En la evaluación sensorial del producto final, se obtuvieron las puntuaciones más

bajas en las aceitunas con el extracto más concentrado. Sin embargo, las aceitunas con el extracto fenólico más diluido, presentó atributos sensoriales con puntuaciones mayores. Por tanto, las hojas de olivo estudiadas en este trabajo son bastante interesantes por su alto poder inhibidor sobre la formación de dicha sustancia tóxica, además de ser considerados subproductos de las industrias oleícolas ya que son fuente natural de compuestos fenólicos con un carácter funcional debido a su efecto antioxidante.

**Palabras clave:** aceituna negra oxidada; extracto de hoja de olivo; compuestos fenólicos; acrilamida; textura; análisis sensorial.

## **2. INTRODUCCIÓN.**

## 2. INTRODUCCIÓN.

### 2.1. Situación actual de la aceituna de mesa.

En la actualidad, España se encuentra actualmente como el primer país productor de aceituna de mesa. La producción media a nivel mundial de las últimas 5 campañas asciende a 2.751.500 toneladas (Comité Oleícola Internacional, 2019). La producción española representa aproximadamente el 71% de la producción de la UE y el 22% de la mundial (COI, 2019).



FIGURA 2.1.1 Producción mundial de aceituna de mesa. Media campañas 2013-2018. (Fuente: COI, 2019).

Según los datos del Consejo Oleícola Internacional (COI), a día de hoy existe una superficie mundial de olivar constituido por unos 850 millones de árboles que ocupan una superficie de unos 10 millones de hectáreas, de las cuales más de 1 millón están dedicadas a la producción de aceituna de mesa. (ASEMESA, 2018). España presenta 2.697.445 hectáreas de olivar, de las cuales, 187.232 (6,94%) se destinan a la aceituna de mesa (Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos, 2019).

TABLA 2.1.1 Superficie del cultivo olivar en España. (Fuente: ESYRCE, 2019).

	Cultivo secano	Cultivos en regadío o invernaderos	
ACEITUNA DE MESA	42.685	33.871	76.556
ACEITUNA DE DOBLE APTITUD	72.367	38.309	110.676
ACEITUNA DE ALMAZARA	1.763.888	746.324	2.510.213
<b>OLIVAR (OL)</b>	<b>1.878.941</b>	<b>818.505</b>	<b>2.697.445</b>

Dentro de España, las principales CCAA con mayor superficie de olivar para aceitunas de mesa son: Andalucía con 56.247 (ha) y Extremadura con 20.076 (ha), seguidas de Valencia, Canarias, Baleares, Cataluña, La Rioja, País Vasco, Murcia y por último Aragón. (ESYRCE, 2018).

TABLA 2.1.2 Provincias españolas con mayor superficie de olivar para aceitunas de mesa en los últimos 5 años. (Fuente: ESYRCE, 2018).

	2014	2015	2016	2017	2018
Sevilla	49.337	47.986	48.212	48.350	48.934
Cáceres	20.053	20.058	19.984	19.832	19.842
Huelva	5.675	5.683	5.676	5.861	5.859
Córdoba	168	538	555	670	669
Jaén	463	446	446	446	446
Resto	259	367	436	508	572

En cuanto a la producción nacional, como se muestra en la Figura 2.1.2, en la campaña 2018/2019, Andalucía se encuentra en primer lugar con 482.391,29 toneladas seguida de Extremadura con 98.135,3 toneladas (AICA, 2019).

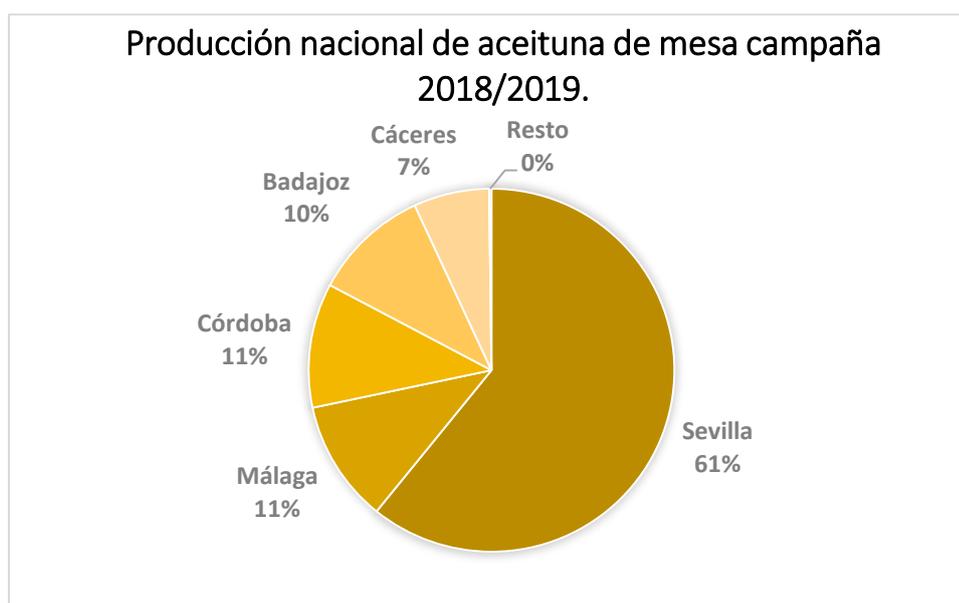


FIGURA 2.1.2 Producción nacional de aceitunas de mesa en la campaña actual 2018/2019. (Fuente: AICA, 2019).

El consumo medio de aceitunas de mesa a nivel internacional, desde los últimos 5 años en las últimas campañas, según los datos recogidos por el COI (Consejo Oleícola Internacional), asciende a 2.545.900 toneladas y se reparten según el siguiente gráfico (ASEMESA, 2018).



FIGURA 2.1.3 Grafico del consumo mundial de aceitunas de mesa según las últimas campañas. (Fuente: COI, 2019).

España se sitúa en el primer puesto como país exportador de aceituna de mesa con 177.400 toneladas, según la campaña 2018/2019, seguidos principalmente por Marruecos, Egipto, Grecia y Turquía. Analizando los países a los que España exporta (actualmente son más de 180 países) en las exportaciones llevadas a cabo de aceitunas de mesa, en 2018 su principal mercado fue Estados Unidos con un 23,7% de las exportaciones, seguido de Italia, Francia y Alemania (ASEMESA, 2018).

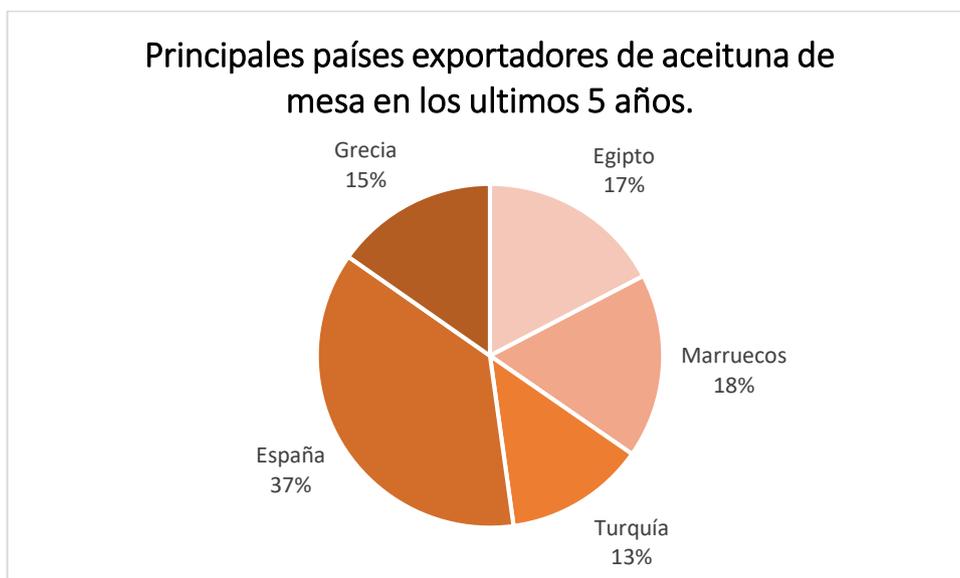


FIGURA 2.1.4 Principales países exportadores de aceituna de mesa de los últimos 5 años. (Fuente: COI, 2019).

Actualmente, hay presente un grave problema frente a las exportaciones a EEUU, que afecta transcendentamente a la Política Agraria Común (PAC) de la Unión Europea y

principalmente se califica como un ataque al sector olivarero español, tras la imposición de un arancel del 34,75% (se impone un arancel medio de 14,75% por la investigación antisubvención, más el impuesto por la investigación *antidumping* del 20%) sobre las exportaciones de las aceitunas negras (Okdiario, 2018).

## **2.2. Definición de aceituna de mesa.**

Pueden encontrarse varias definiciones de Aceituna de mesa, aunque ambas son similares, según el *Codex Alimentarius* (2013):

Se denomina Aceituna de mesa al preparado a partir de frutos sanos de variedades de olivo cultivado (*Olea europea* L.), que han alcanzado un grado de maduración apropiado para su procesamiento y que han sido elegidas por producir frutos cuyo volumen, forma, proporción de pulpa respecto al hueso, delicadeza de la pulpa, sabor, firmeza y facilidad para separarse del hueso los hacen particularmente aptos para la elaboración; sometido a tratamientos para eliminar el amargor natural y conservado mediante fermentación natural y/o tratamiento térmico, y/o por otros tratamientos, para evitar su deterioro y para asegurar la estabilidad del producto en condiciones apropiadas de almacenamiento a temperatura ambiente, con o sin conservantes; envasado con un medio de cobertura líquido apropiado (Codex Alimentarius 66-1981, revisada en 2013).

Las aceitunas se pueden clasificar, según el grado de maduración del fruto fresco, de la siguiente manera:

- 1) Aceitunas verdes: Frutos recogidos durante su periodo de madurez, antes del envero y cuando han alcanzado un tamaño normal.
- 2) Aceitunas de color cambiante: Frutos recogidos antes de su completa madurez, durante el envero.
- 3) Aceitunas negras: Frutos recogidos en plena madurez o poco antes de ella, pudiendo presentar, según la zona de producción y la época de recogida, color negro rojizo, negro violáceo, violeta oscuro, negro verdoso o castaño oscuro (Codex Alimentarius, 2013)

Esta última, según el Real Decreto 679/2016, se denomina Aceitunas negras naturales, añadiendo una más a la clasificación:

- 1) Aceitunas negras: son las obtenidas de frutos que no están totalmente maduros, han sido oscurecidos mediante oxidación (BOE Real Decreto 679/2016).

### 2.3. Procesado de la aceituna negra oxidada al estilo californiano.

En cuanto al procesado de las aceitunas negras oxidadas, destacar que son aquellas tratadas mediante inmersión en solución alcalina de hidróxido sódico, con una concentración de 1 a 4% en la solución, que se oxigenará con el aire y lavado posterior. Esta operación será repetida de forma cíclica y sucesiva. La elaboración de ennegrecido se realiza en depósitos abiertos, construidos generalmente en hormigón o poliéster, de forma paralelepédica y fondos con fuertes pendientes para facilitar el movimiento de las aceitunas en su aireación (Figura 2.3.1). Una vez tratado el fruto con la solución alcalina, las aceitunas son sumergidas en agua o salmuera diluida y posteriormente aireada, produciéndose poco a poco el ennegrecimiento. Este ennegrecimiento se consigue tras sucesivos lavados, dando lugar a una aceituna de color negro brillante, dicho color se fija mediante la adición de sales de hierro (Figura 2.3.2) (Estrada, 2011).



FIGURA 2.3.1 Tanques de oxidación. (Fuente: Estrada, 2011).



FIGURA 2.3.2 Aceitunas negras oxidadas deshuesadas y en rodajas. (Fuente: Estrada, 2011).

Diagrama de flujo de las aceitunas negras oxidadas.

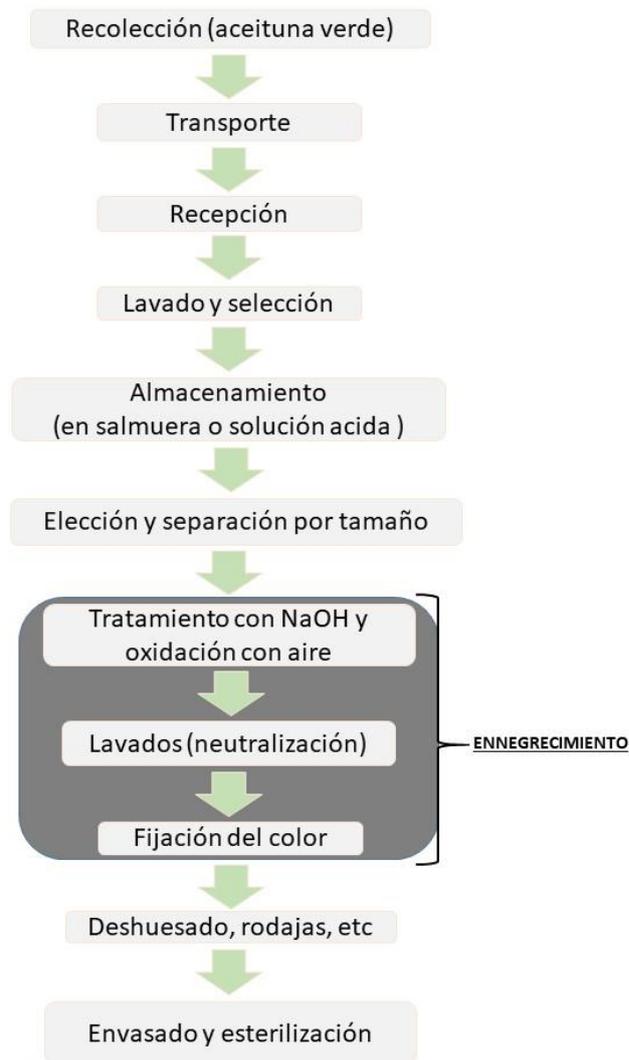


FIGURA 2.3.3 Diagrama del procesado de las aceitunas negras oxidadas. (Fuente: Elaboración propia).

#### 2.4. Aparición de compuestos tóxicos en las aceitunas negras oxidadas.

El estudio de los contaminantes en los alimentos ha crecido considerablemente en los últimos años convirtiéndose en una cuestión fundamental para el mantenimiento de la seguridad alimentaria a nivel mundial. Esto ha hecho que se descubran nuevos riesgos como es el caso del hidroximetilfurfural (HMF) y la acrilamida. El HMF es un aldehído cíclico formado tanto a través de la Reacción de Maillard como de la deshidratación de los azúcares (caramelización).

La acrilamida es una sustancia química que se crea de forma natural en productos alimenticios que contienen almidón durante procesos de cocción cotidianos a altas temperaturas (fritura, cocción, asado y también durante procesos industriales a partir de 120°C

y a baja humedad). Se forma principalmente gracias a los azúcares y aminoácidos (sobre todo, la asparagina) que están presentes de forma natural en muchos alimentos. El proceso químico que causa esto se conoce como la reacción de Maillard, que también oscurece los alimentos y afecta al sabor. (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2018). Se detectó por primera vez en alimentos en abril de 2002, aunque es probable que haya estado presente en los alimentos desde que comenzó la cocción. La acrilamida también tiene muchos usos industriales no alimentarios y está presente en el humo del tabaco (EFSA, 2015).

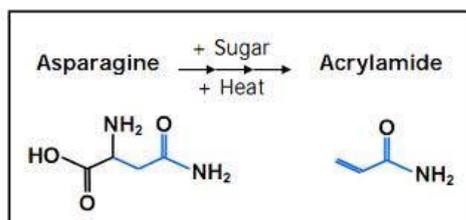


FIGURA 2.5.1 Formación de acrilamida. (Fuente: AECOSAN, 2017).

La evidencia de estudios en animales muestra que la acrilamida y su metabolito glicidamida son genotóxicos y carcinógenos: dañan el ADN y causan cáncer. Los estudios en humanos proporcionan pruebas limitadas e inconscientes en cuanto al aumento del riesgo de desarrollo de cáncer relacionado con la exposición a la acrilamida a través de la dieta. (EFSA, 2015). En dos estudios se informa de la relación inversa entre la exposición a la acrilamida y el peso al nacer y otros marcadores de crecimiento fetal (AECOSAN, 2018).

Las aceitunas negras oxidadas constituyen un producto microbiológicamente inestable por lo que su elaboración tradicional termina con una esterilización térmica para así garantizar la seguridad alimentaria. Este proceso de esterilización contribuye a la formación la acrilamida (Pérez-Nevado *et al.*, 2018).

La Comisión Europea y algunas instituciones, como la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), alertan del peligro del consumo de esta sustancia; ya en su artículo de "Evaluación científica de acrilamida en alimentos" incluyen a las aceitunas negras oxidadas como alimento potencial en el contenido de acrilamida. Destacar que la Unión Europea ha establecido medidas de mitigación y niveles de referencia para reducir la presencia de acrilamida en ciertos alimentos, y de esta forma mejorar la salud de los consumidores, mediante la publicación del Reglamento (UE) 2017/1258 de la Comisión de 20 de noviembre de 2017 (Pérez-Nevado *et al.*, 2018).

## 2.5. Compuestos fenólicos, importancia y propiedades.

Los compuestos fenólicos conforman un amplio grupo de moléculas caracterizadas por poseer un anillo aromático (C<sub>6</sub>), con al menos un sustituyente hidroxilo y una cadena lateral y dobles enlaces conjugados a partir de los cuales ejercen su actividad antioxidante.

Los polifenoles se clasifican como flavonoides, ácidos fenólicos, lignanos y estilbenos en función del número de anillos fenólicos y de los elementos estructurales que se unen a estos anillos (Carratú *et al.*, 2005).

Los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos, aunque todos los productos finales se caracterizan por ser polifenólicos y solubles en agua. Se han identificado y aislado alrededor de 9.000 flavonoides, pero sin duda aún hay muchos más por descubrir.

Los flavonoides, comparten una estructura común que consiste en 2 anillos aromáticos unidos por 3 átomos de carbono que forman un heterociclo oxigenado. Pueden dividirse en 6 subclases en función del tipo de heterociclo involucrado: los flavonoles, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas, y flavanoles (catequinas y proantocianidinas) (Manach *et al.*, 2004). La capacidad de los flavonoides para actuar como antioxidantes, por cesión de un electrón o un hidrógeno, depende directamente del potencial de reducción y de la reactividad de los grupos hidroxilo (Pokorny y *et al.*, 2001).

Desde el punto de vista químico, los difenilpropanos, se dividen en diferentes clases dependiendo del grado de oxidación del anillo heterocíclico. El número y la localización específica de los grupos OH o la naturaleza de los grupos funcionales determinan la función de los flavonoides como agentes antioxidantes, anti-inflamatorios, citotóxicos y mutagénicos *in vitro* o, demostrando cómo pequeñas diferencias en la estructura determinan grandes diferencias en la actividad biológica (Carratú *et al.*, 2005).

La categoría de isoflavonas, ha recibido especial atención debido a sus peculiares cualidades; estos compuestos también se incluyen en el grupo de sustancias vegetales con actividad estrogénica llamados fitoestrógenos. Los fitoestrógenos son sustancias ubicuas de origen vegetal que tienen propiedades hormonales de estrógenos y han sido identificados en más de 300 plantas. En los alimentos de origen vegetal, se encuentran presentes los precursores de la forma activa de estos fitoestrógenos, que después de su ingestión, se metabolizan y son activadas por la flora intestinal bacteriana para ser absorbidas en su forma biológicamente activa.

Los ácidos fenólicos se pueden dividir en dos: los derivados del ácido benzoico y los derivados del ácido cinámico. Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes que los ácidos hidroxibenzoicos y agrupan principalmente a los ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico. Estos ácidos se encuentran raramente en formas libres, excepto en los alimentos procesados que han sufrido congelación, esterilización, o fermentación. El ácido caféico y el ácido quínico se combinan para formar el ácido clorogénico, que se encuentra en muchos tipos de frutas y en altas concentraciones en el café.

Los lignanos están formados por 2 unidades de fenilpropano. Los lignanos son metabolizados a enterodiol y enterolactona por la microflora intestinal. Las bajas cantidades de secoisolariciresinol y matairesinol que se ingieren como parte de nuestra dieta normal no tienen en cuenta las concentraciones de los metabolitos enterodiol y enterolactona que son clásicamente medidos en plasma y orina. Por lo tanto, hay sin duda lignanos de origen vegetal que son precursores de enterodiol y enterolactona y que aún no han sido identificados.

Finalmente, los estilbenos tienen un esqueleto básico de 14 carbonos (C<sub>6</sub>-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>) y su distribución en alimentos vegetales no es muy amplia, siendo más abundante en uvas y vino.

Entre los compuestos fenólicos presentes en la aceituna, se encuentran: Tirosol, Hidroxitirosol y la Oleuropeína, los cuales tiene mayor interés para la salud humana (Ferrant, 2015).

El término «compuestos fenólicos» engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. Los compuestos fenólicos tienen su origen en el mundo vegetal. Son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas. Estas sustancias influyen en la calidad, aceptabilidad y estabilidad de los alimentos, ya que actúan como colorantes, antioxidantes y proporcionan sabor. Así, por ejemplo, las aceitunas contienen compuestos fenólicos, que dan sabor amargo producido por la oleuropeína presente en las mismas (Gimeno, 2014). La composición cuantitativa de estas sustancias depende del clima, del grado de maduración, del cultivo y del secado de la planta entre otros (Ferrant, 2015).

Los compuestos fenólicos intervienen como antioxidantes naturales en los alimentos, por lo que la obtención y preparación de productos con un alto contenido de estos compuestos supone una reducción en la utilización de aditivos antioxidantes, pudiendo englobarlos dentro de los llamados alimentos funcionales (Berra *et al.*, 1995). Los componentes que hacen que

un alimento sea funcional han estado siempre presentes en la naturaleza, pero es en las últimas décadas cuando los investigadores han comenzado a identificarlos de forma aislada y a determinar los beneficios concretos que éstos proporcionan a nuestro organismo. De esta forma, se pueden aprovechar los alimentos que contienen estas sustancias beneficiosas de forma natural, es decir, alimentos que poseen cantidades importantes de compuestos bioactivos intrínsecamente y sin necesidad de recurrir siempre a los alimentos los cuales fueron enriquecidos o modificados. La investigación en el campo de los alimentos funcionales es un campo muy novedoso en el sector agroindustrial, y hoy en día se enfoca en el estudio de los siguientes campos; crecimiento y desarrollo, metabolismo o utilización de nutrientes, sistema cardiovascular y fisiología y funcionamiento intestinal, entre otros menos importantes.

Estos compuestos bioactivos que se encuentran de forma natural en muchos alimentos, no se han estudiado de forma extensiva hasta tiempos recientes, razón por la cual no existan definiciones consensuadas de los mismos, si bien si existen ciertas consideraciones que se hacen para todos ellos de forma general. Así pues, se puede considerar “compuesto bioactivo” de un alimento a aquel que aporta un beneficio para la salud más allá de las consideraciones de la nutrición básica. Estos componentes se encuentran, en general, en pequeñas cantidades en los productos de origen vegetal. Se pueden considerar como componentes bioactivos, tanto a algunas vitaminas y minerales, como a otros compuestos no nutrientes, presentes fundamentalmente en plantas (fitoquímicos), que inducen efectos metabólicos derivados de su actividad biológica constatada en modelos de laboratorio, y asociada a efectos beneficiosos sobre la salud humana, como por ejemplo la mejora de funciones fisiológicas o reducción del riesgo de padecer enfermedades (Olmedilla *et al.*, 2007).

## **2.6. Extractos naturales.**

Los extractos vegetales son productos extraídos directamente de los frutos, hojas, semillas o raíces de una planta, los cuales contienen componentes que pueden realizar una función beneficiosa en el organismo cuando se ingieren a través de un alimento, un complemento alimenticio, o cuando los aplicamos en la piel mediante un cosmético. También actúan como conservantes y antioxidantes de dichos alimentos y cosméticos. Un ejemplo de un extracto vegetal con potentes propiedades antioxidantes y múltiples beneficios para la salud y la piel es el extracto de fruto de olivo con altos contenidos en Hidroxitirosol (Bas, 2017).

Un extracto contiene los componentes activos más importantes del vegetal, de manera muy concentrada. De hecho, la cantidad del compuesto puede ser miles de veces superior a la que se encuentra originariamente en el vegetal. El uso de un extracto vegetal en la alimentación puede incorporar un compuesto activo a un alimento para aumentar su vida útil. Los extractos pueden minimizar los ataques microbianos, retrasar el enranciamiento de un alimento y ralentizar la pérdida de color. Por ejemplo, el romero es un excelente agente antioxidante y antimicrobiano para alimentos procesados como los embutidos. Antiguamente se utilizaban hojas en la elaboración artesanal de estos productos, pero hoy gracias a los extractos se puede potenciar las propiedades de esta planta a nivel industrial, sustituyendo los ingredientes sintéticos (Bas, 2017).

El uso de extractos naturales de plantas y de residuos agroalimentarios, para su aplicación en alimentos y bebidas, es una tendencia creciente en la industria alimentaria. La selección de estos extractos de plantas y su aplicación depende de sus propiedades funcionales, la disponibilidad, la rentabilidad, la sensibilización de los consumidores y su efecto en los atributos sensoriales del producto final.

Los extractos de plantas han ganado una considerable atención como agentes antimicrobianos y los compuestos antioxidantes han constituido la base de muchas aplicaciones incluidas en la conservación de alimentos frescos y procesados (Jayaprakasha *et al.*, 2000).

Los antioxidantes naturales obtenidos a partir de subproductos de la industria agroalimentaria se pueden utilizar para aumentar la vida útil de los alimentos mediante la prevención de la peroxidación lipídica y la protección del daño oxidativo. Además del color y el flavor, aspectos como el coste de producción, la actividad antioxidante, tóxicos o actividad de patógenos debe ser considerada. La búsqueda de fuentes baratas, renovables y abundantes de compuestos antioxidantes atrae el interés en todo el mundo (Moure *et al.*, 2001).

### **2.6.1. Las hojas de olivo como fuentes de compuestos fitoquímicos.**

Las hojas de olivo constituyen una materia prima barata que puede utilizarse como una fuente adecuada de productos de alto valor añadido (Briante *et al.*, 2002) y una potencial fuente antioxidante de origen natural debido a su alto contenido en compuestos fenólicos. El compuesto más abundante en el extracto de hoja de olivo es la oleuropeína, seguido de hidroxitirosol, los flavona-7-glucósidos de luteolina y apigenina y verbascósido (Benavente-García *et al.*, 2000).

La oleuropeína es el compuesto fenólico mayoritario en el extracto de hojas de olivo al igual que en el aceite de oliva virgen, de modo que la incorporación de tales extractos en la industria alimentaria puede contribuir significativamente a aspectos beneficiosos para la salud de los consumidores y a alargar la vida útil de los alimentos. El hidroxitirosol es un precursor de la oleuropeína y el verbascósido es un glucósido conjugado de hidroxitirosol y ácido cafeico.

Las moléculas bioactivas de las hojas de olivo son: hidroxitirosol, tirosol, ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido vanílico, vainillina, oleuropeína, luteolina, diosmetina, rutina, verbascósido, luteolina-7-glucósido, apigenina-7-glucósido y diosmetina-7-glucósido (Bianco *et al.*, 2000).

Diversos trabajos han mostrado que los extractos de hoja de olivo tienen la capacidad de disminuir la presión arterial e incrementar el flujo en las arterias coronarias, corregir arritmias y prevenir espasmos intestinales, como el publicado por Benavente-García *et al.*, (2000). Respecto a alargar la vida útil y restablecer la pérdida de estabilidad de los aceites de oliva refinados, Gibriel *et al.*, (2004) sugieren la adición de hojas de olivo durante la molienda de las aceitunas. Posteriormente, y en este mismo sentido, otros estudios encontraron que los compuestos fenólicos de las hojas de olivo tienen un efecto fuertemente protector frente a la oxidación del aceite (Paiva-Martins *et al.*, 2007), de forma que el enriquecimiento con extracto obtenido de 1Kg de hojas era suficiente para reforzar en polifenoles de 50 a 320L de aceite refinado y alcanzar una estabilidad similar a la que presenta un aceite de oliva virgen.

Históricamente las hojas de olivo se han utilizado como tratamiento contra la malaria y la fiebre (Benavente-García *et al.*, 2000). Se ha demostrado, además, que el extracto de hoja de olivo tiene una variedad de actividades biológicas incluyendo: antioxidantes, antivirales, antimicrobianos y anti-inflamatorios (Bouaziz *et al.*, 2008; Micol *et al.*, 2005; Visioli *et al.*, 2002). Por lo tanto, la hoja de olivo tiene beneficios quimiopreventivos potenciales frente a las principales enfermedades vinculadas a la oxidación y pueden ser parte de una dieta saludable (Rubió *et al.*, 2012).

Rubió *et al.*, (2012) demostraron que los compuestos fenólicos individuales en el extracto de hoja de olivo muestran fuertes actividades *in vitro*, las actividades antioxidantes y antimicrobianas de los compuestos fenólicos combinados muestran efectos similares o mejores que los fenólicos individuales.

Por lo tanto, estos resultados sugieren que el extracto de hoja de olivo tiene un gran potencial como ingrediente de alimentos funcionales, en particular como fuente de compuestos fenólicos.

En definitiva, la masa de hoja de olivo obtenida tras las actividades de extracción de aceite de oliva, así como las características que poseen, hacen de este residuo una excelente fuente a la cual aplicar el concepto de sostenibilidad y revalorización.

### **3. OBJETIVOS.**

### **3. OBJETIVOS.**

El objetivo general que se pretende, es determinar el efecto de diferentes extractos vegetales sobre la concentración de acrilamida durante el proceso de elaboración de aceitunas negras oxidadas.

Para su consecución, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Preparar extractos vegetales para su adición a aceitunas de mesa negras oxidadas.
2. Realizar tratamientos de esterilización a aceitunas tras la adición de extractos al líquido de gobierno.
3. Analizar el contenido en acrilamida y compuestos fenólicos de las aceitunas tras el proceso de esterilización.

#### **4. MATERIAL Y MÉTODOS.**

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### **4.1. Materia prima empleada en los estudios.**

Para la realización del presente estudio se utilizaron aceitunas envasadas y esterilizadas procedentes de un olivar experimental de una finca colaboradora, situada en el norte de Cáceres, de la variedad ‘Manzanilla Cacereña’, que habían sido recolectadas en el mes de octubre, según procedía para la realización de los diferentes estudios experimentales, en el estado de maduración verde antes del envero de las aceitunas. Posteriormente, las aceitunas que se habían conservado en ácido acético al 3% hasta su elaboración, fueron tratadas con una solución alcalina diluida durante 3h aproximadamente. Tras lo cual, se ennegrecieron mediante sucesivas oxigenaciones con aire y posteriores lavados de forma cíclica. El color se fijó con sales de hierro. Como últimas operaciones, las aceitunas fueron envasadas y esterilizadas.

### **4.2. Material vegetal: extractos vegetales.**

Para este trabajo se han utilizado hojas de olivo, tomadas sin infección alguna o daño físico, y recogidas, durante la campaña 2018/2019, de la almazara del Instituto Tecnológico Agroalimentario de Extremadura (INTAEX), que se encuentra situado junto a la Escuela de Ingenierías Agrarias.

#### **4.2.1. Preparación de los extractos.**

Una vez recogidas, las hojas de olivo, fueron lavadas con agua destilada para retirar cualquier suciedad presente en la hoja, posibles restos de residuos de plaguicidas y fertilizantes, se secaron y posteriormente fueron llevados a un deshidratador a 120°C durante unos 12 minutos, las muestras se iban removiendo con frecuencia. Una vez secas, fueron trituradas en un molino convencional. Ya molidas, fueron llevadas al laboratorio de investigación de la Escuela de Ingenierías Agrarias, situada en Badajoz (España), donde ha sido realizado todo el trabajo de investigación.

Para la obtención de los extractos de hoja de olivo hemos usado agua destilada como disolvente. Se añadieron 200 gr de hojas de olivo trituradas en un bote de cristal y seguidamente enrasamos hasta 2000 ml de agua destilada, según el método descrito por Delgado-Adámez *et al.*, (2014), y posteriormente fueron llevadas al autoclave (P-selecta,

modelo: Presoclave 75) (Figura 4.2.1). La mezcla se sometió a un tratamiento de 121 °C durante 15 minutos.



FIGURA 4.2.1 Autoclave. (Fuente: Laboratorio 75, Escuela de Ingenierías Agrarias).

Una vez autoclavada la muestra, fue llevada a enfriar y seguidamente filtrada a vacío, obteniéndose así el extracto con el disolvente, en este caso agua destilada (Figura 4.2.2)



FIGURA 4.2.2 Obtención del extracto acuoso mediante filtrado a vacío.

Una vez filtrado el extracto y enfriado, se realizó un extracto más diluido. En un matraz aforado de 100 ml se añadió 1 ml del extracto inicial y se enrasó hasta los 100ml con agua destilada.

#### **4.2.2. Adición de los extractos y tratamientos de esterilización de las aceitunas negras oxidadas.**

Las aceitunas son envasadas en latas de hojalata de 350 gramos. Los tratamientos experimentales estudiados fueron los siguientes:

- Control: Aceitunas negras oxidadas con adición del líquido de gobierno habitualmente usado por la empresa;
- ACEX1:10: Aceitunas negras oxidadas con adición de extracto de hoja de olivo y aditivos alimentarios propios de la empresa;
- ACEX1:100: Aceitunas negras oxidadas con adición de extracto de hoja de olivo y aditivos alimentarios propios de la empresa.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

El líquido de gobierno habitualmente utilizado por la empresa está compuesto de 2% de cloruro de sodio y 0,015% (10-40 ppm) de solución de gluconato ferroso.

Una vez preparadas las latas de aceituna de los distintos tratamientos experimentales, las mismas fueron esterilizadas mediante tratamiento térmico para destruir o inactivar los gérmenes capaces de producir toxinas o alterar el alimento en conserva, pero sobre todo se pretende prevenir el crecimiento del *Clostridium botulinum*, una bacteria que puede producir una toxina altamente letal y cuyas esporas son muy resistentes al calor sobreviviendo a temperaturas superiores a los 100 °C.



FIGURA 4.2.3 Preparación de la aceituna negra oxidada.

### 4.3. Diseño experimental.

Lo primero que se realizó fue la extracción acuosa del extracto de hoja de olivo como ya se ha explicado en el epígrafe anterior; una vez extraído se determinaron los polifenoles totales y la actividad antioxidante, analizado el extracto, se realizaron los tres tratamientos experimentales indicados, y se llevaron a cabo los siguientes análisis físico-químicos: polifenoles totales, actividad antioxidante, pH, cloruros, acidez y acrilamida. Por otro lado, a las aceitunas negras oxidadas se les realizó un análisis de textura y color.

En la siguiente figura se muestran cuáles han sido los análisis realizados tras la obtención del extracto a lo largo de este trabajo fin de grado (Figura 4.3.1).

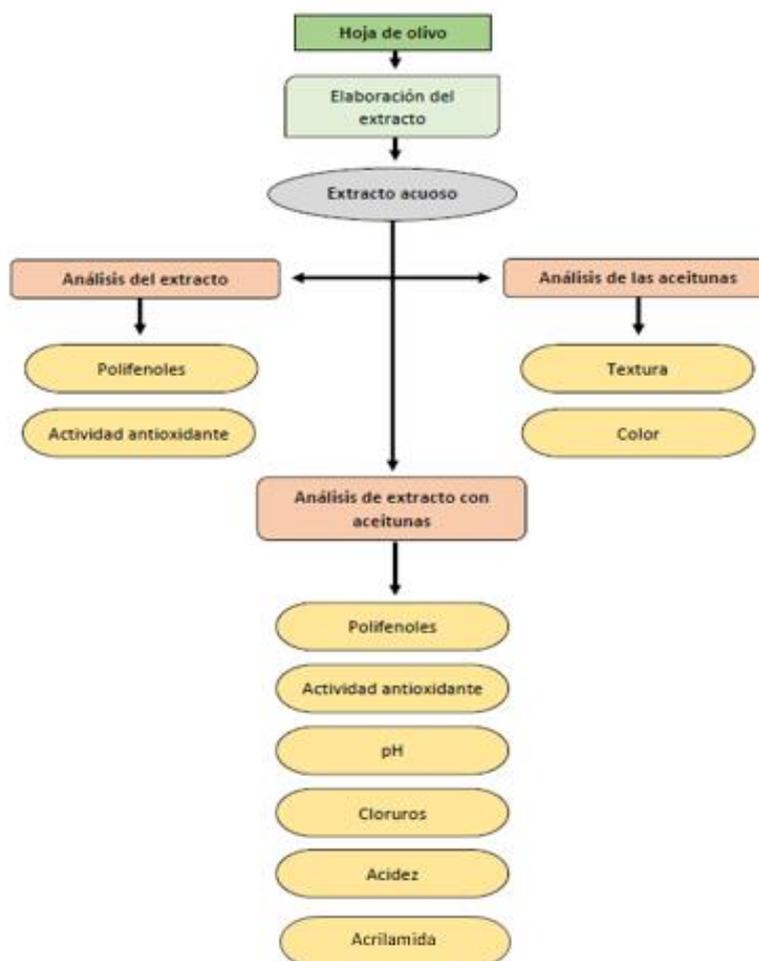


FIGURA 4.3.1 Esquema de los diferentes análisis realizados a lo largo del trabajo.

#### 4.3.1. Análisis físico-químico del extracto.

Los siguientes análisis físico químicos fueron realizados en los extractos de hojas de olivo y en la salmuera de las aceitunas negras oxidadas tras la esterilización (Figura 4.3.1).

##### 4.3.1.1. Determinación del pH del extracto con aceitunas.

La medida del pH del extracto con aceituna, se midió directamente de cada muestra mediante un pHmetro. Cada muestra fue analizada por triplicado.

El equipo que se usó fue un pHmetro de electrodo combinado de la marca: CRISON, modelo: Basic20 (Figura 4.3.2).

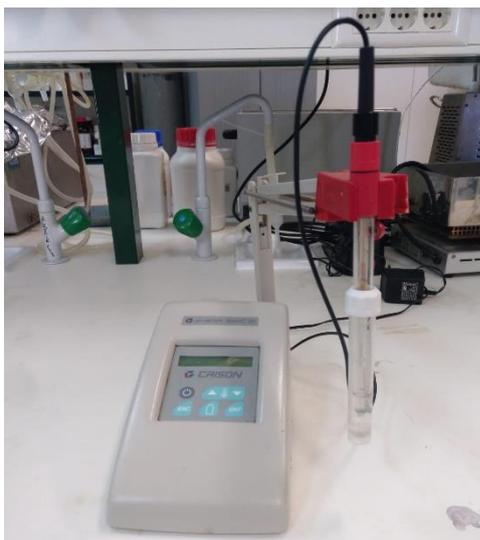


FIGURA 4.3.2 pHmetro. (Fuente: elaboración propia).

#### 4.3.1.2. Determinación de cloruros del extracto con aceitunas.

La determinación de NaCl de la muestra se llevó a cabo mediante la adición en un vaso precipitado de: 9 ml de H<sub>2</sub>O destilada, 0,5 ml muestra (salmuera), 0,3 g bicarbonato y cromato potásico (K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>) al 5%, (2-3 gotas) como indicador. Posteriormente se valoró con nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>) 1N en bureta, hasta que se produjo el viraje a un color más oscuro.

En nuestro caso cada muestra se realizó por duplicado y el resultado se expresó en porcentaje en peso de NaCl existente en 100 ml de muestra y se obtuvo de la siguiente fórmula:

$$\text{Cloruros} = V(\text{gastado}) * 0,00585 * 100 \frac{\text{g NaCl}}{100 \text{ ml}}$$

(Ec. 4.3.1)

V = Volumen gastado de AgNO<sub>3</sub>.



FIGURA 4.3.3 Determinación de cloruros del extracto.

#### 4.3.1.3. Determinación de la acidez del extracto con aceitunas.

La forma de determinar la acidez del extracto con la aceituna se midió tomando de muestra 10 ml de salmuera, se valoró con una solución de sosa (NaOH) 0,1N en bureta y como indicador se le añadió fenolftaleína, hasta que se produjera el viraje a un color rosáceo.

La ecuación de la acidez se calculó con el volumen total gastado de NaOH, este cálculo se realizó con cada muestra y se expresó como gramos de ácido láctico por 100 ml de salmuera.

$$Acidez\ total = 0,9 * N * V(gastado) \frac{g\ \acute{a}cido\ l\acute{a}ctico}{100\ ml\ salmuera}$$

(Ec. 4.3.2)

N= Normalidad (0,1).

V = Volumen gastado de NaOH.

#### 4.3.1.4. Determinación de los compuestos fenólicos totales.

La determinación de los compuestos fenólicos de la muestra se llevó a cabo mediante el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu modificado, usando como patrón el ácido gálico (Montedoro, G. *et al.*, 1992). Este método consiste en una reacción química producida entre los compuestos fenólicos y el reactivo de Folin-Ciocalteu (amarillo), que es reducido dando como resultado una coloración azul. Se lleva a cabo en matraces aforados de 25 ml, en el cual se le añaden: 10 ml de agua destilada, 0,1 ml del extracto y 1 ml de Folin-Ciocalteu, se agita y se deja en oscuridad durante 8 minutos. Transcurrido ese tiempo se le adicionan 2 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, se enrasa con agua destilada y se agita para llevar a oscuridad durante 80 minutos. Pasados los 80 minutos, se mide la absorbancia (a 760 nm), con una cubeta, en un espectrofotómetro (Biochrom, modelo libra S50) (Figura 4.3.5) y con un blanco de agua destilada. Una vez medidas las muestras se realizó una recta de calibrado con ácido gálico (Figura 4.3.4).



FIGURA 4.3.4 Determinación de compuestos fenólicos totales.



FIGURA 4.3.5 Espectrofotómetro. (Fuente: Laboratorio de investigación, Escuela de Ingenierías Agrarias).

#### 4.3.1.5. Determinación de la actividad antioxidante del extracto.

La determinación de la actividad antioxidante del extracto se lleva a cabo por el método DPPH. Este método se fundamenta en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH, por los antioxidantes (Brand-Willams *et al.*, 1995).

Para la realización del DPPH, mediante una balanza de precisión (METTLER TOLEDO, modelo AB54-S) (Figura 4.3.6) se pesaron 0,0098g y se disolvió poco a poco en metanol. Posteriormente se enrasó en un matraz aforado de 250 ml.

Se cubrió con papel de aluminio y se llevó al frigorífico para evitar la evaporación del metanol y la luz. El DPPH se mantuvo 24 horas en el frigorífico tapado y en oscuridad, pasadas las 24 horas se midió la absorbancia mediante espectrofotómetro a 515 nm.

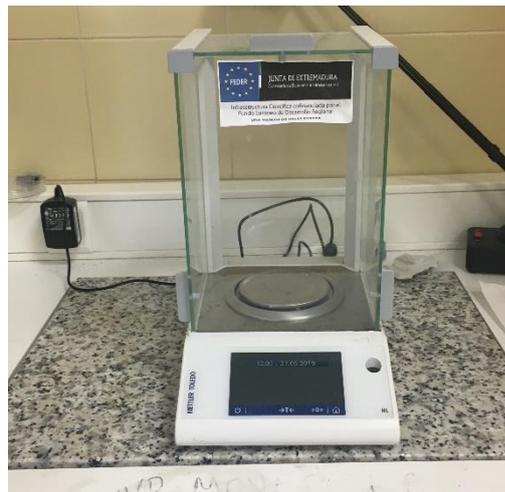


FIGURA 4.3.6 Balanza de precisión. (Fuente: Laboratorio de investigación, Escuela de Ingenierías Agrarias).

Se realizó una recta de calibrado, para la cual se partió de una disolución madre, que se realizó con 0,005 g de Trolox y 10 ml de metanol. Se realizaron diferentes concentraciones (Tabla 4.3.1) y se repartieron en 5 eppendorf respectivamente con un volumen total de 1 ml.

TABLA 4.3.1 Preparación de las muestras para la recta de calibrado. (Fuente: elaboración propia).

	Disolución madre	Muestra
<b>B</b>	0	1 ml
<b>0,2 mM</b>	100 µl	900 µl
<b>0,4 mM</b>	200 µl	800 µl
<b>1 mM</b>	500 µl	500 µl
<b>1,4 mM</b>	700 µl	300 µl
<b>2 Mm</b>	1 ml	0

En 2 cubetas, a cada una, se le añadieron 2950 µl del radical (DPPH) y 50 µl de muestra respectivamente, la mezcla se homogenizó y se midió a tiempo 0, se mantuvo en completa oscuridad hasta la siguiente medida (30 minutos). El blanco se realizó con metanol y cada una de las muestras se midieron por triplicado a una absorbancia de 515 nm.

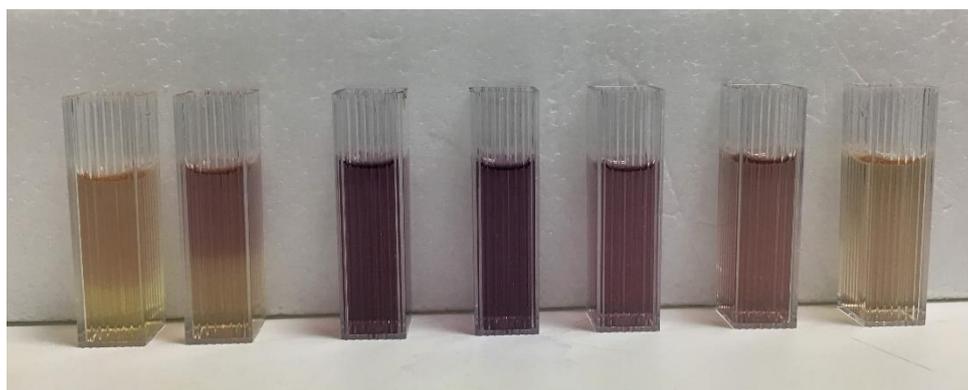


FIGURA 4.3.7 Determinación de la actividad antioxidante del extracto y recta de calibrado.

Una vez realizadas todas las medidas, recogidas en un programa informático, se realizó el cálculo del porcentaje de la actividad antioxidante del extracto en base al DPPH medido inicialmente. Este porcentaje se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$AA' = \frac{Abs.DPPH (inicial) - Abs.T 30' (muestra)}{Abs.DPPH (inicial)} * 100$$

(Ec. 4.3.3)

## 4.3.2. Análisis físico-químico de las aceitunas.

### 4.3.2.1. Determinación del color de la aceituna.

Para la determinación del color de las aceitunas, se realizaron las medidas de color en la superficie de las aceitunas mediante un colorímetro Konica Minolta Spectrophotometer CM-600d (Figura 4.3.8). Se midió la reflectancia con un ángulo sobre la vertical de visión de  $0^\circ$  con iluminante tipo D65. El análisis de color se realizó determinando las coordenadas del espacio CIELAB ( $L^*$ : luminosidad;  $a^*$ : coordenada roja-verde y  $b^*$ : coordenada amarillo-azul) calculándose la cromaticidad global de la muestra, saturación o intensidad del color ( $C^*$ ) y el ángulo de Hue (ángulo con el que un vector irradia dentro de un cuadrante del rojo ( $0^\circ$ ) al verde ( $90^\circ$ ) o tono ( $H^*$ )).

La determinación se realizó en la apertura de la muestra experimental y se analizaron todas las aceitunas del frasco, cada medida se realizó por triplicado.



FIGURA 4.3.8 Colorímetro. (Fuente: Laboratorio de investigación, Escuela de Ingenierías Agrarias).

### 4.3.2.2. Determinación de la textura de la aceituna.

La monitorización de la textura de las aceitunas se llevó a cabo mediante el texturómetro modelo: TA.TX2 (Stable Micro System©, U.K) (Figura 4.3.9). En cada análisis se tomaron 20 aceitunas de cada muestra. Las 20 aceitunas, que se usaron para determinar la textura, se analizaron por el método de punción. Para cada muestra se analizó la dureza que se cuantificó como la fuerza máxima alcanzada durante la punción del fruto. Los datos obtenidos con esta determinación fueron fuerza máxima expresada en kg, distancia en mm y pendiente de la curva obtenida y área de la penetración expresada en  $\text{mm}^2$ .

TABLA 4.3.2 Valores de los parámetros para las medidas realizadas por punción.( Fuente: elaboración propia).

	Valores
Velocidad de ensayo (mm/s)	1
Deformación (%)	15
Tiempo (s)	2
Fuerza de activación (N)	0,05



FIGURA 4.3.9 Texturómetro. (Fuente: elaboración propia).

### 4.3.3. Análisis instrumental de las aceitunas.

#### 4.3.3.1. Análisis de acrilamida en aceitunas.

Para llevar a cabo la extracción de acrilamida en pasta de aceituna se siguió el protocolo descrito por Bermudo *et al.*, (2006) con ligeras modificaciones. Se optó por este protocolo después de un análisis por el Grupo de Investigación y con el apoyo del Servicio de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Extremadura que la mayoría de los laboratorios de análisis aplicaban el método de HPLC-MS/MS para la determinación de acrilamida. De este modo se planteó un estudio optimizado del método de determinación de acrilamida mediante LC-MS/MS siguiendo este proceso descrito que detallamos a continuación:

Se llevan 2 gramos de muestra (pasta de aceituna / salmuera) a un Erlenmeyer y se añaden 10 ml de agua mili-Q. Se agita durante 60 min.

A continuación, se trasvasa a un Falcon de 15 ml y se centrifuga a 4°C 30 minutos a 3500 rpm.

Con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico se retira la capa superior y se desecha. Con pipeta Pasteur de cristal se toma una alícuota de la fase acuosa de aproximadamente 5 ml y se filtra mediante un filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ .

Se acondiciona un cartucho Telos con 4 ml de MeOH seguido de 4 ml de agua Milli-Q. Se pasan 3 ml de la muestra y se eluye con 3 ml de agua Mili-Q directamente en el cartucho Scharlab, el cual ha sido previamente acondicionado de igual modo que el Telos (4 ml de MeOH seguido de 4 ml de agua Mili-Q). Se recoge directamente la muestra en un vial, se toma exactamente 1 mL y se analiza mediante LC-MS-QQQ.

Tras el análisis se adiciona al vial 20  $\mu\text{l}$  de 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de acrilamida y se analiza de nuevo. Esto se repite dos veces.

Las muestras se analizaron utilizando un cromatógrafo de líquidos Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies), acoplado con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6460 (Agilent Technologies). El volumen de inyección fue de 3  $\mu\text{L}$  y la elución se realizó usando una columna de HPLC de fase inversa Zorbax XDB-C18 (3,5  $\mu\text{m}$ , 150 mm x 2,1 mm) a 30 ° C siguiendo el método utilizado por Pérez-Nevado *et al.*, (2018). La determinación se realizó por duplicado.

Nótese que este método de extracción diluye el contenido de acrilamida 5 veces. Teniendo en cuenta esto, los límites de detección y cuantificación se sitúan en:

$$\text{LOD}=1,38 \mu\text{g}/\text{kg} \qquad \text{LOQ}=4,60 \mu\text{g}/\text{kg}$$

#### **4.3.4. Análisis sensorial.**

Para el análisis sensorial de las aceitunas se utilizó la hoja de cata propuesta por González *et al.*, (2007) (Figura 4.3.10).

La cata se llevó a cabo en la sala especializada para ello, situada en la plata piloto de la Escuela de Ingenierías Agrarias. La cata fue realizada por un panel de 6 jueces catadores expertos, llevándose a cabo en un periodo comprendido entre comidas para evitar sensaciones de inapetencia o de excesivo apetito que pudieran influir en la objetividad de los catadores. Cada juez recibió una hoja de cata por muestra a analizar.

Se utilizaron escalas normalizadas para la valoración de los colores del fruto (de amarillo a verde oliva) y el aspecto de las aceitunas (de muy malo a muy bueno).

Las características sensoriales del producto en boca: dureza, acidez, sabor salado y amargor se evaluaron sobre una escala gráfica horizontal estructurada de 15,0 cm de longitud, anclada a 1,0 cm de cada extremo en función de la intensidad.

La identificación de la intensidad del aroma (de poco aromático a muy aromático), defectos olfativos-gustativos (de nada defectuosa a muy defectuosa) y evaluación global del producto (de muy negativa a muy positiva). Las evaluaciones se llevaron a cabo en una misma sesión.

**Nombre y apellidos:**

**Código:**

**Fecha:**

**1. Características visuales del producto**

**1.1. Color de la aceituna:**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Amarillo Verde oliva

**1.2. Aspecto de la aceituna:**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Muy malo Muy bueno

**2. Características olfativas del producto:**

**2.1. Intensidad del aroma nasal:**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Poco aromático Muy aromático

**3. Características del producto en la boca:**

**3.1. Dureza:**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

**3.2. Acidez:**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

**3.3. Salado:**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

**3.4. Amargo:**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

**3.7. Defectos olfato-gustativos:**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Nada defectuosa Muy defectuosa

**Tipo de defecto:**

**4. Evaluación global del producto:**

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----

Muy negativa Muy positiva

FIGURA 4.3.10 Hoja de cata. (Fuente: Laboratorios, Escuela de Ingenierías Agrarias).

#### **4.3.5. Análisis estadístico de los datos.**

Las diferencias significativas y los grupos homogéneos de medias se establecieron mediante un análisis de varianza (ANOVA) siguiendo el procedimiento de una vía. Cuando la diferencia entre los valores de las medias fue significativa, se realizó un test de comparación de medias por el método de Tukey (análisis univariante) que determina la diferencia mínima entre las medias de cada grupo para que ésta sea estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

En el tratamiento estadístico de los datos se empleó el programa informático IBM SPSS STATISTICS VERSION 19 para Windows.

## **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 5.1. Caracterización de los extractos vegetales.

#### 5.1.1. Estudio de la composición fenólica de los extractos.

En este trabajo se realizó un estudio de la caracterización de los extractos de hoja de olivo mediante extracción acuosa. Para ello, se determinó la concentración de polifenoles totales que estaban presentes en extractos concentrados 1:10 y 1:100, utilizando el método de Folin-Ciocalteu mediante la cuantificación espectrofotométrica a una absorbancia de 760 nm, como ya se ha comentado con anterioridad. Se utilizaron hojas de olivo como fuente de compuestos fenólicos, debido a estudios previos (Delgado-Adámez *et al.*, 2014) que destacaron la mayor concentración de estos compuestos en las hojas de olivo. Dentro de todos los compuestos antioxidantes naturales se encuentran los compuestos fenólicos polares, denominados polifenoles totales y que analíticamente se refieren como ppm de ácido gálico en el de extracto.

En la Figura 5.1.1 se muestra el contenido en compuestos fenólicos totales de las diferentes muestras analizadas de los extractos de hojas de olivo en dos diluciones diferentes.

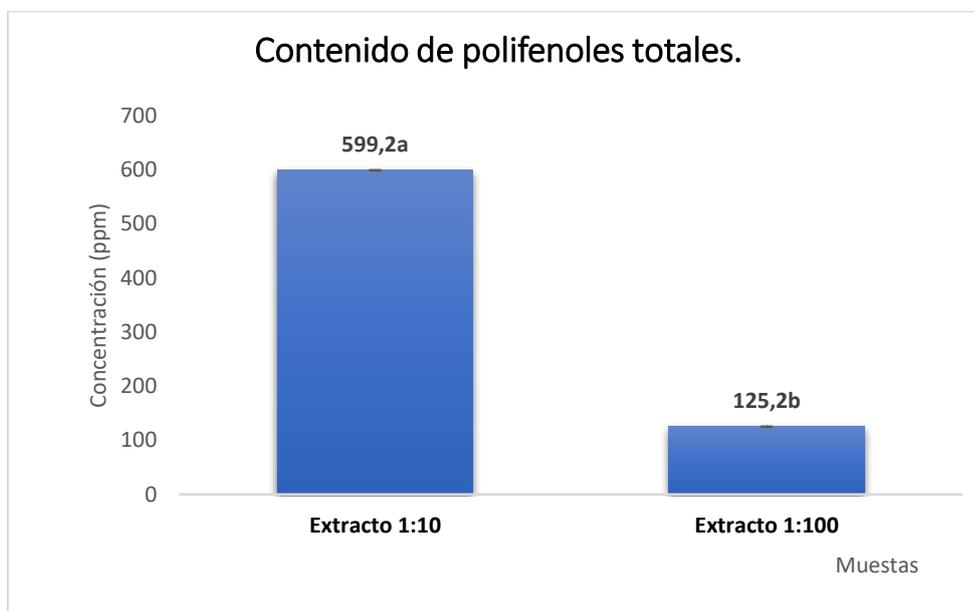


FIGURA 5.1.1 Perfil de polifenoles totales del extracto acuoso de hojas de olivo. Las letras en minúscula indican diferencias significativas entre las muestras. (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

En cuanto a los resultados obtenidos, se observa que las muestras analizadas muestran diferencias significativas entre los distintos extractos elaborados. Así, se observa que la

muestra con el extracto diluido 1:100 es la que menos cantidad presenta de compuestos fenólicos. Sin embargo, la muestra con extracto más concentrado, contiene mayor cantidad de dicho compuesto. Como era de esperar, al diluir la muestra a 1:100, el contenido en compuestos fenólicos en la muestra con extracto de hojas de olivo 1:100 se redujo un 79,10%. Estos extractos son interesantes ya que fueron obtenidos por extracción acuosa, sin el uso de disolventes orgánicos y por tanto el proceso de obtención fue totalmente natural.

Autores como Obied *et al.*, (2009), llevaron a cabo la extracción mediante el uso de disolventes, descartando la extracción acuosa a pesar de que cada día cobra más interés en el sector agroalimentario. Es interesante destacar que en el presente estudio se utilizó agua como solvente de extracción y se decidió no utilizar metanol o hexano debido a su posible toxicidad (Japón-Luján *et al.*, 2008). De esta manera fue posible obtener un extracto fenólico que podría utilizarse como un nuevo aditivo alimentario para la industria.

Esta alternativa permite adentrarse en el diseño de productos y procesos químicos que reducen o eliminan la producción y el uso de sustancias peligrosas para el medio ambiente y la salud humana. Así, la incorporación de estos extractos naturales obtenidos de fuentes de residuos agroalimentarios, puede resultar de gran interés en las industrias ya que el desarrollo e investigación de nuevos métodos se debe al interés mostrado por diversas industrias (De Bock, 2013).

Destacar que se tuvo en cuenta, a la hora de realizar el extracto, que la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) ha aceptado y calificado las hojas de olivo del extracto acuoso como un producto seguro. Esta consideración facilita el uso del extracto de hoja de olivo como aditivo alimentario en la industria (Delgado-Adámez, *et al.*, 2014).

Muchas investigaciones se han centrado en aumentar la calidad en los productos alimenticios desde una perspectiva de salud. Entre los diversos compuestos bioactivos potenciales, los consumidores están particularmente interesados en fenoles, debido a sus propiedades antioxidantes. Estos compuestos se pueden mejorar mediante la modificación de la composición del producto inicial a través de procesos tecnológicos. Como es el caso del estudio que se llevó a cabo por Pérez-Nevado *et al.*, (2018), en el que se le adicionaron extractos de hojas de olivo a la aceituna de mesa fermentada con el fin de obtener una aceituna de mesa de buena calidad y saludable de cara al consumidor, mejorando el color y aumentando el contenido fenólico.

Son muchos los autores que han estudiado el contenido de polifenoles totales en el extracto de hoja de diferentes frutos, como es el caso de López (2012), que estudió el contenido de fenoles totales de un extracto acuoso de hojas secas de *Agave angustifolia* Haw, el cual obtuvo unos resultados superiores a los nuestros en cuanto a fenoles totales y actividad antioxidante.

Además, cabe resaltar que aquellos extractos con mayor contenido en polifenoles y antioxidantes, se consideran más saludables debido a las propiedades beneficiosas que confieren al alimento los compuestos fenólicos presentes en él. Destacar que el compuesto fenólico hidroxitirosol, presente en el extracto de hoja de olivo (Martín-Vertedor *et al.*, 2016) muestra unas buenas propiedades para la salud, tal y como se indica en el Reglamento 432/2012, donde se puede decir que la ingesta diaria de 5 mg de hidroxitirosol y sus derivados contribuyen a la protección de los lípidos de la sangre frente al daño oxidativo. Numerosas investigaciones (González, 2005; Schaffer *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2015; Warleta *et al.*, 2011; Lee-Huang *et al.*, 2007; Fistoníc *et al.*, 2012; Hagiwara *et al.*, 2011) atribuyen a su consumo efectos beneficiosos para la salud. Algunos de estos efectos son: protector del sistema cardiovascular, protector frente a los procesos neurodegenerativos, protector muscular y articular, antiinflamatorio, protector frente al cáncer y el SIDA. También potencia el sistema inmunitario y previene la osteoporosis entre otros.

### **5.1.2. Estudio de la actividad antioxidante de los extractos.**

Además, a los extractos de hoja de olivo se les determinó la actividad antioxidante mediante el método DPPH (Figura 5.1.2). Este método, como ya se ha indicado en el apartado de Material y Métodos, se fundamenta en la reducción de la absorbancia medida a 515 nm del radical DPPH, por los antioxidantes. (Brand-Williams *et al.*, 1995). En la Figura 5.1.2 se muestra la actividad antioxidante de los extractos fenólicos naturales, mostrando los resultados del presente estudio, en el que se produjeron variaciones en función de la dilución de los extractos estudiados, con diferencias estadísticamente significativas.

Así, los resultados obtenidos de la actividad antioxidante se encuentran correlacionados con la cantidad de compuestos fenólicos totales de las muestras, siendo la muestra con mayor captación de DPPH, como era de esperar, el extracto más concentrado con dilución 1:10, (85.08%), frente al extracto diluido 1:100 el cual presentaba una menor captación de DPPH.

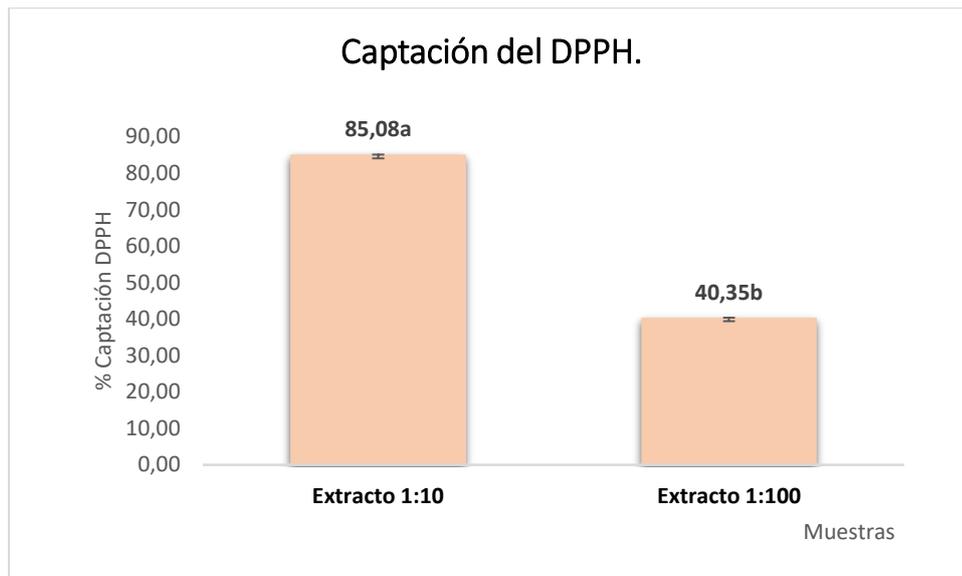


FIGURA 5.1.2 Comparación de los extractos por el método DPPH. Las letras en minúscula indican diferencias significativas entre las muestras. (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Autores como Kuskoski *et al.*, (2005), llevaron a cabo la aplicación de diversos métodos químicos para determinar la actividad antioxidante en la pulpa de varios frutos. Entre los métodos empleados se encontraba la determinación de actividad antioxidante por el método DPPH. Estos investigadores mostraron unos valores inferiores a los obtenidos en nuestro ensayo, pero igualmente presentaban una misma tendencia de la actividad antioxidante con los compuestos fenólicos. Estos resultados son normales ya que en nuestro estudio se empleó un método tecnológico para concentrar la cantidad de compuestos fenólicos de los extractos de hojas de olivo, y por tanto el contenido en compuestos fenólicos y actividad antioxidante fue muy elevado, tal y como muestran los resultados (Figuras 5.1.1 y 5.1.2).

## 5.2. Estudio de la adición de extractos a aceitunas de mesa oxidadas.

A las aceitunas negras oxidadas, como ya se ha dicho en Materiales y Métodos, se les adicionaron los dos extractos y se les realizó el control de textura, por el método de punción y el control de color.

### *Control de la textura*

El estudio de la textura permitió evaluar la firmeza de la piel del fruto, así como la resistencia que éste ofrece al ser comprimido. En la Tabla 5.2.1 se muestran la textura de las aceitunas de los diferentes tratamientos experimentales aplicados. Los resultados mostraron mayor resistencia y firmeza de la piel, así como una mayor turgencia en las aceitunas negras oxidadas que no contenían extractos de hoja de olivo (Control). Por otro lado, la de menor

resistencia y, por tanto, con menor dureza fueron las muestras con el extracto diluido 1:100 (ACEX1:100) por lo que, la adición del extracto concentrado ha proporcionado un leve ablandamiento en la piel de las aceitunas negras oxidadas a diferencia de las aceitunas que no contenían extracto.

TABLA 5.2.1 Control de la textura por ensayo de punción. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar.

	Fuerza	Distancia	Pendiente F-D 1:2	Área F-D 1:2
Muestra	(kg)	(mm)	(kg/mm)	(mm <sup>2</sup> )
CONTROL	2,364 $\pm$ 1,03a	2,210 $\pm$ 0,958a	1,201 $\pm$ 0,522b	2,464 $\pm$ 1,352a
ACEX1:10	2,192 $\pm$ 0,612b	1,976 $\pm$ 0,866b	1,285 $\pm$ 0,58b	2,289 $\pm$ 1,511a
ACEX1:100	2,166 $\pm$ 0,584b	1,599 $\pm$ 0,541b	1,513 $\pm$ 0,688a	1,969 $\pm$ 0,728b

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las aceitunas de las diferentes muestras. (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Para el parámetro “Fuerza máxima” (indicativo de la resistencia que presenta la piel a la penetración de la sonda) hubo diferencias significativas entre las distintas muestras. El mayor valor correspondió a la muestra Control con 2,364 kg, teniendo valores menores las aceitunas tratadas con extracto (Tabla 5.2). Nuevamente la adición de extractos disminuyó ligeramente la textura de las aceitunas a las que se adicionó.

En el parámetro “Distancia” (indicativo de la elasticidad de la piel de la aceituna) según la tabla se observaron diferencias entre las distintas muestras con valores comprendidos entre 1,599 y 2,210 mm, siendo la muestra Control la que obtuvo el mayor valor de distancia y la muestra ACEX1:100 la que obtuvo el menor valor de distancia, por lo las aceitunas de esta muestra presentaron una piel con menor elasticidad.

Para la “Pendiente” (relacionada con la consistencia de la pulpa) se obtuvieron diferencias significativas con valores entre 1,201 y 1,513 kg/mm, el extracto 1:10 (ACEX1:10) presentó valores menores a diferencia de la muestra ACEX1:100 que obtuvo el mayor valor.

Por último, para el “Área” (indicativo del área de los picos que se obtienen durante la penetración de la sonda) se observaron diferencias significativas entre las muestras con valores comprendidos entre 1,969 y 2,464 mm<sup>2</sup>, siendo el mayor valor el de la muestra Control y el menor el de la muestra ACEX1:100.

En el presente estudio, hay que destacar que la adición del extracto ha producido una ligera disminución de la textura que posteriormente se intentará correlacionar con el análisis sensorial.

En el estudio realizado por Schaide *et al.*, (2019), en el cual se analizaron aceitunas al estilo español fermentadas con extractos de hoja de olivo, se demostró que la adición del extracto no supuso ningún cambio significativo de la textura de las aceitunas al final del proceso de fermentación.

Autores como Fadda *et al.*, (2014), realizaron un estudio en aceitunas fermentadas y al utilizar fermentación natural en aceitunas de mesa, observaron que el máximo de fuerza aumentó a lo largo de la fermentación. Además, Romeo *et al.*, (2009) explicó que la estabilidad de la textura de la aceituna de mesa durante la fermentación se debe a la cantidad de concentración de sal utilizada.

Otros estudios relacionados con el ablandamiento de la aceituna fue el realizado por Sciancalepore *et al.*, (1984), estudiaron el efecto de la temperatura de la lejía en la preparación de aceitunas, y hallaron que el aumento de la temperatura incrementaba el ablandamiento. Además, según el estudio realizado a frutos por Sexton (1997), la fuerza de la piel y pulpa disminuyó al aumentar el tiempo de madurez, por otro lado, (Heredia *et al.*, 1993) midió la fuerza de corte máxima con un método de compresión y obtuvo una disminución durante la maduración de aceitunas.

A la vista de los resultados sería interesante la adición en el líquido de gobierno de las aceitunas con extractos de hojas de olivo (ACEX1:10 Y ACEX1:100) de cloruro cálcico ya que, este aditivo alimentario, autorizado en este tipo de industrias, provoca un endurecimiento de la pulpa de la aceituna y tras la esterilización térmica, hace que estas pequeñas disminuciones de la textura, no aparezcan. Además, resaltar que los consumidores se preocupan cada día más por las innovaciones tecnológicas y piden que los alimentos sean lo más naturales posible y con menor procesado. En este caso, la textura y la forma de la aceituna son esenciales para el consumidor final, que cada día es más exigente con la calidad final de los productos alimentarios que consumen.

### ***Control del color.***

En la Tabla 5.2.2 se muestra la media de los valores para cada parámetro medido en las distintas muestras.

TABLA 5.2.2 Control del color de las aceitunas negras oxidadas. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar.

	a*(D65)	b*(D65)	L*(D65)	C*(D65)	h(D65)
CONTROL	3,425 $\pm$ 0,841b	6,826 $\pm$ 2,247c	25,376 $\pm$ 1,658a	7,650 $\pm$ 2,359c	62,594 $\pm$ 3,803c
ACEX1:10	4,238 $\pm$ 0,835a	9,526 $\pm$ 2,903a	23,143 $\pm$ 1,701b	10,368 $\pm$ 3,004a	66,141 $\pm$ 3,472a
ACEX1:100	4,039 $\pm$ 0,707a	8,494 $\pm$ 1,735b	23,376 $\pm$ 1,155b	9,409 $\pm$ 1,853b	64,396 $\pm$ 1,775b

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las aceitunas de las diferentes muestras. (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Según los resultados obtenidos y mostrados en la Tabla 5.2.2, las aceitunas presentaron diferencias significativas relacionadas con todos los parámetros analizados. En cuanto al parámetro “a\*” (un valor positivo de a\* (+a\*) indica una coloración roja, mientras que un valor negativo (-a\*) daría una tonalidad verde). Las aceitunas en general presentaron tonalidades con tendencias al rojo, debido a que son aceitunas negras oxidadas. La muestra ACEX1:10 presentó valores superiores a las muestras Control y ACEX1:100 (4,238). Este resultado era de esperar puesto que, el extracto concentrado presentaba una coloración marrón intenso. En el estudio realizado por Ramírez *et al.*, (2015), determinaron el color de aceitunas de mesa al estilo español que presentaban coloraciones parduzcas y se obtuvieron valores de “a\*” un poco superior a los del presente trabajo, siendo aceitunas negras oxidadas.

En el parámetro “b\*” (el valor “+b\*” significa amarilla, y un valor “-b\*” azul), las aceitunas sin extracto presentaron el menor valor (6,8260), mientras que las muestras con extracto 1:10 obtuvieron los valores más altos (9,526). Autores como Arroyo *et al.*, (2016), obtuvieron valores superiores de “b\*” (34,1), en comparación con los nuestros, la tonalidad que presentan estas aceitunas son más amarillas, al igual que los resultados obtenidos por Ramírez *et al.*, (2015), en ambos casos se trata de aceitunas verdes, mientras que en nuestro caso eran negras.

En el parámetro “L\*” (la claridad 0: negro y 100: blanco). Nuestras muestras presentaron luminosidades bajas en torno a los 20, siendo la muestra ACEX1:10 (23,143) la de menor valor y la muestra Control (25,376) la de mayor luminosidad. En nuestro caso, los parámetros “a\*” y “L\*” presentaron una relación, siendo la muestra ACEX1:10, con la mayor concentración de extracto, la que presentaba un valor superior de “a\*” con aceitunas de tonalidades más rojas y a su vez las aceitunas presentaban una menor luminosidad (21,434). En el estudio realizado por Ramírez *et al.*, (2015), se obtuvieron unos valores superiores para “L\*” (próximos a 55), puesto que se trataba de aceitunas verdes y presentaron mayor luminosidad.

Por último, para el parámetro “C\*”, se aprecian diferencias significativas entre las distintas muestras. La muestra Control obtuvo el menor valor (7,650) y en cambio, la muestra ACEX1:10 el mayor (10,368). El parámetro “h” no presentó diferencias muy significativas, los valores que se obtuvieron estaban en torno a 60.

Tamer *et al.*, 2013, comprobaron que las aceitunas verdes al conservarse dentro de los primeros 30 días de almacenamiento tendían a oscurecerse y sus parámetros de color cambiaban, asemejándose a los nuestros. Las diferencias entre los valores L \*, a \* y b \* fueron estadísticamente significativas y comparando con la muestra Control, los valores a \* aumentaron, pero los valores L \* y b \* disminuyeron para todos los procesos siendo estos resultados más semejantes a los nuestros en aceitunas negras. Ambos parámetros indican que el color de la superficie de las aceitunas se oscureció con el tiempo. Este efecto puede atribuirse a la degradación por la luz de los derivados de la clorofila presentes en las aceitunas.

En definitiva, se observa una relación entre los diferentes parámetros del espacio CIELAB, siendo siempre la muestra Control (aceitunas negras oxidadas sin extracto de hojas de olivo) la que presenta un valor menor en cuanto a los parámetros a\*, b\* y C\* y la muestra ACEX1:10 (aceitunas negras oxidadas con extracto 1:10) la que presenta valores superiores. Para el parámetro L\* ocurre lo contrario; la adición del extracto diluido 1:10, ha generado un cambio de color, otorgándole una coloración más intensa a las aceitunas. Esto es normal, ya que la elaboración del extracto presentó una coloración marrón que provocó estos cambios en los parámetros CIELAB de la coloración de la aceituna. No obstante, esta modificación no ha influido negativamente en la apariencia, por lo que es importante para que a la hora de consumirlas no se produzca un rechazo por parte del consumidor.

### **5.3. Análisis de los parámetros físico-químicos de las aceitunas tratadas con extractos de hoja de olivo.**

En la Tabla 5.3.1 se muestran los parámetros físico-químicos realizados a las diferentes muestras del líquido de gobierno.

TABLA 5.3.1. Análisis físico-químico del extracto de hoja de olivo adicionado a las aceitunas negras oxidadas. Los valores corresponden a la media  $\pm$  desviación estándar.

	% Acidez	pH	% Cloruros
<b>CONTROL</b>	0,20 $\pm$ 0,00b ns	7,52 $\pm$ 0,006a	1,68 $\pm$ 0,03a
<b>ACEX1:10</b>	0,7 $\pm$ 0,17a	4,96 $\pm$ 0,04b	1,85 $\pm$ 0,09a
<b>ACEX1:100</b>	0,20 $\pm$ 0,00b ns	6,19 $\pm$ 0,051a	1,56 $\pm$ 0,03a

Las letras en minúscula indican diferencias significativas entre las muestras. (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

#### ***Control de la acidez libre.***

Se determinó la acidez de las aceitunas muestreadas encontrándose solo una diferencia significativa en los valores de las mismas entre las distintas muestras (Tabla 5.3.1). Así, la muestra que contenía el extracto más concentrado (ACEX1:10), fue la que presentó una acidez más elevada, relacionada con el extracto empleado. Además, los datos de acidez mostraron un rango que osciló de 0,2 a 0,7, datos que se consideran habituales en este tipo de producto elaborado industrialmente, ya que en el proceso de elaboración de las aceitunas negras oxidadas no se produce fermentación previa al oscurecimiento, como ocurre con las aceitunas al estilo español, por tanto, estos datos se consideran dentro de la normalidad. En el estudio llevado a cabo por Del Pino (2015), también se determinó la acidez libre, en este caso en aceitunas verdes y se obtuvieron valores de 0,7, por lo que obtuvieron valores similares a los obtenidos en el extracto más concentrado (ACEX1:10).

Otros autores como Cohaila (2017) realizaron un estudio, en este caso, de aceitunas de mesa negras, las cuales habían sido sometidas a un proceso de fermentación, presentando unos resultados que estaban comprendidos entre 0,09 y 0,62, por lo que fueron inferiores a los obtenidos en nuestro trabajo.

#### ***Control del pH.***

Se determinó el pH de las salmueras, con los distintos extractos, encontrándose una diferencia significativa entre los valores de pH de las distintas muestras. Destacar que la muestra que contiene el extracto más concentrado (ACEX1:10) presenta un valor de pH de 4,6, por lo que se considera un pH ácido, debido a la adición del extracto; datos que coinciden con los de la acidez vistos anteriormente. En otros estudios realizados por Tang *et al.*, (2016) se analizó el pH de aceitunas negras maduras y se obtuvieron unos valores medios de 6,5, mientras que los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran pH en un rango de 6 a 7,5.

### ***Control de cloruros.***

En cuanto a la determinación de los cloruros de las salmueras con los distintos extractos como se muestra en la Tabla 5.3.1, se observó que no presentaron diferencias significativas entre los diferentes valores de las mismas. Estos resultados son los esperables, ya que se adicionó NaCl en todos los tratamientos experimentales realizados, y por tanto la adición fue idéntica en todas las muestras estudiadas, con cierta diferencia entre las mismas, debido a las posibles precipitaciones de estas sales. De hecho, las muestras mostraron un rango de valores entre 1,6 y 1,8% de NaCl. Destacar que en el estudio físico-químico llevado a cabo por De la Torre *et al.*, (1993), se obtuvieron unos valores de NaCl en torno al 5% tras el proceso de fermentación, por lo que los resultados obtenidos fueron bastante más superiores a los valores obtenidos en este trabajo.

Según los datos obtenidos por Estrada (2011), las aceitunas verdes o de color cambiante, frescas, que van a ser destinadas a negras oxidadas, se suelen conservar en medio ácido, añadiendo ácido acético hasta alcanzar un valor de 0,5 a 3 %. El proceso se inicia con un valor entre 5 a 7 % en la solución de salmuera, valores similares a los obtenidos en el presente trabajo, y en el inicio el pH debe tener un valor mínimo en torno a 4,3 unidades. Después se deberá mantener el valor del pH en torno a 4,3 unidades. Si aumenta se deberá corregir añadiendo ácido acético, como ocurre en las muestras Control y ACEX1:100 que se obtuvieron valores muy superiores a 4,3 unidades.

### ***Contenido en fenoles y actividad antioxidante.***

En la Tabla 5.3.2 se muestra el contenido en compuestos fenólicos y actividad antioxidante en aceitunas con extracto y sin el mismo.

TABLA 5.3.2 Contenido en fenoles totales y actividad antioxidante en aceitunas con y sin extracto.

	<b>Fenoles totales mg/L Ác. Gálico</b>	<b>Actividad antioxidante % Cap. DPPH</b>
<b>CONTROL</b>	167,20±0,04c	51,93c
<b>ACEX1:10</b>	1561,87±0,02a	104,19a
<b>ACEX1:100</b>	561,87±0,01b	82,80b

Las letras en minúscula indican diferencias significativas entre las muestras. (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

En cuanto a los resultados obtenidos, como era de esperar, el contenido de compuestos fenólicos y actividad antioxidante es mayor en la muestra de las aceitunas negras oxidadas con el extracto más concentrado (ACEX1:10). En este caso los datos son similares a los obtenidos tras el análisis de compuestos fenólicos y actividad antioxidante de ambos extractos.

Autores como Lee *et al.*, (2010), sugirieron que el extracto de hoja de olivo tuvo un gran potencial como ingrediente funcional para enriquecer distintos alimentos, debido al elevado contenido en compuestos fenólicos del mismo. En el estudio llevado a cabo por Repo de Carrasco *et al.*, (2008), determinaron la actividad antioxidante por el método DPPH en diferentes frutos rojos, y se obtuvieron unos datos, en cuanto a la capacidad de captación del DPPH, inferiores a los obtenidos en nuestro trabajo, presentando un rango de valores del 25 al 80%.

#### **5.4. Estudio del contenido en acrilamida en aceitunas negras oxidadas tratadas con extractos de hoja de olivo.**

Para determinar el contenido en acrilamida las muestras se analizaron utilizando un cromatógrafo de líquidos Agilent 1290 Infinity II. El contenido de acrilamida en aceitunas negras oxidadas se muestra en la Figura 5.4.1. El intervalo de concentración de acrilamida fue de 120,7 a 194,9 ng/g en aceitunas. Las muestras que presentaron mayor contenido en acrilamida fueron las aceitunas negras oxidadas sin adición de extracto de hoja de olivo, que actuaron como muestras Control. La muestra que presentó menor contenido en acrilamida (120,7 ng/g), fue la que contenía el extracto más concentrado de hoja de olivo (ACEX1:10), mientras que, el contenido más alto de acrilamida correspondía a las aceitunas que no presentaban extracto adicionado al líquido de gobierno. Se puede observar una graduación en la concentración de acrilamida, de mayor a menor, conforme se va aumentando la concentración de extracto añadido a las aceitunas. No obstante, ambos extractos (1:10 y 1:100) se consideraron positivos, ya que redujeron el contenido en acrilamida presente en las aceitunas negras oxidadas. Por tanto, queda patente que el extracto de hoja de olivo inhibe la formación de acrilamida durante el proceso de esterilización.

Otros autores como Casado *et al.*, (2010) demostraron una inhibición de la formación de acrilamida en las aceitunas negras maduras al agregar diferentes vegetales naturales con altas propiedades antioxidantes. El ajo blanqueado mostró una inhibición significativa (23%) del contenido de acrilamida debido a las propiedades del compuesto de aliina presente en este

alimento. Además, el romero y el orégano provocaron una ligera disminución del contenido de acrilamida, pero sin diferencias significativas. Otros investigadores han encontrado que el romero reduce la formación de acrilamida en la elaboración del pan (Hedegaard *et al.*, 2008). Sanhuesa *et al.*, (2017) mostraron un efecto sinérgico al combinar extractos de fenol de orujo de uva con antibióticos para mejorar la efectividad del medicamento.

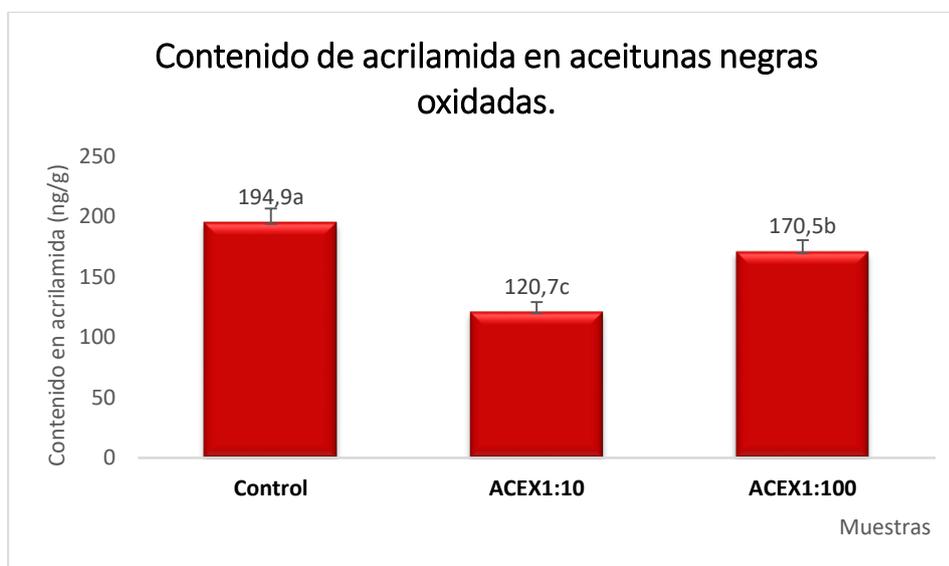


FIGURA 5.4 Contenido en acrilamida (ng/g) en Aceitunas negras oxidadas. Las letras en minúscula indican diferencias significativas entre las muestras. (Test de Tukey,  $p < 0,05$ ).

Destacar que los niveles de acrilamida en muestras de aceitunas negras comerciales oxidadas oscilan de 31,5 a 744,0 ng/g en aceitunas y de 59,2 a 1697 ng/g en el líquido de gobierno, siendo, en este último, donde se encuentra un mayor contenido de acrilamida (Pérez-Nevado *et al.*, 2018). Esta variación en el contenido en acrilamida es debido a varios motivos, entre ellos la variedad de aceituna utilizada en el proceso de elaboración. Además, el proceso de esterilización térmica al que han sido sometidas es clave en la formación de acrilamida, puesto que, como ya se ha dicho anteriormente, la formación de acrilamida tiene lugar al final del proceso de elaboración, cuando se les realiza el tratamiento térmico de esterilización. Cuanto más agresivo sea dicho tratamiento, mayor será el contenido en acrilamida. Según el BOE (Boletín Oficial del Estado), 2001, el artículo 12 del Real Decreto 1230 que recogía el tiempo requerido para el proceso de esterilización fue derogado en 2016.

Actualmente, la Unión Europea ha establecido medidas de mitigación y niveles de referencia para reducir la presencia de acrilamida en ciertos alimentos, y de esta forma mejorar la salud de los consumidores, mediante la publicación del Reglamento (UE) 2017/1258 de la Comisión de 20 de noviembre de 2017. Sin embargo, hay que tener en cuenta

el bajo consumo de aceitunas negras oxidadas en comparación con otros alimentos en los que también se produce dicha sustancia indeseable, como son las patatas fritas, chips, galletas, cereales y derivados.

La variedad de aceituna utilizada en nuestro estudio fue la Manzanilla Cacereña y no presentó valores muy elevados (194,9 ng/g). Esta concentración no se considera excesiva ya que según Charoenprasert (2014), nuestros resultados no superan los valores de 250 ng/g de acrilamida, umbral que puede considerarse como potencialmente peligroso tras su ingesta en la salud de los consumidores.

Pérez-Nevado *et al.*, (2018) estudió diferentes marcas comerciales de aceituna negra de estilo californiano en industrias de España y Portugal, aquellas aceitunas que contenían mayor contenido de compuestos fenólicos tenían una cantidad menor de acrilamida, por lo que los fenoles mostraron una correlación lineal negativa con acrilamida. Lodolini *et al.*, (2019) aumentaron la cantidad de fenoles después de la adición de diferentes especias a una aceituna rellena, provocando la disminución de la síntesis de acrilamida.

### **5.5. Estudio del perfil sensorial de las aceitunas tratadas con extracto de hoja de olivo.**

El análisis sensorial se llevó a cabo sobre el producto estabilizado térmicamente y sobre los tres tratamientos experimentales realizados (Control y ACEX1:10 y ACEX1:100). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5.5. El análisis sensorial de las aceitunas se realizó en base a la norma del Consejo Oleica Internacional (COI, 2011). Las principales características sensoriales a analizar en las aceitunas fueron el color, aspecto, intensidad, sabor amargo y salado, acidez, dureza y defectos.

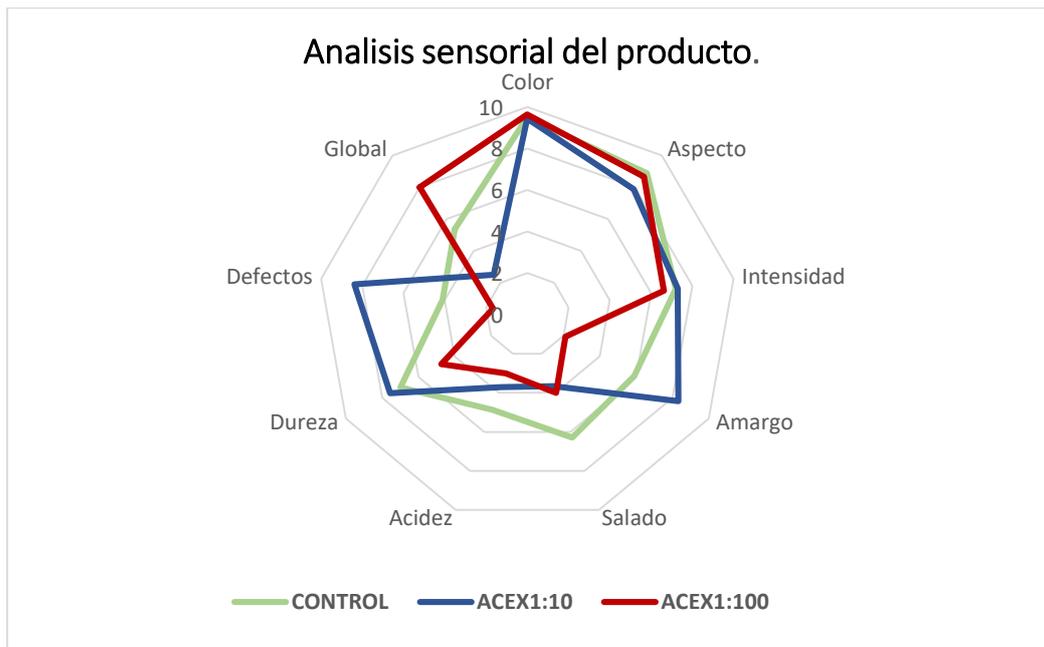


FIGURA 5.5 Análisis sensorial del producto.

En cuanto al color, los catadores clasificaron el atributo con un promedio de 9,5 sobre 10 sin presentar diferencias significativas. El color de las aceitunas de las tres muestras fue favorable y similar entre ellas a pesar de la adición de los extractos. Hay que destacar que este perfil sensorial fue similar al obtenido en los análisis físicos del color mediante el uso del espacio CIELAB. Del mismo modo, el aspecto de las aceitunas de las muestras no presentó diferencias significativas, obteniendo un valor promedio de 8,5, siendo la muestra ACEX1:10 con extracto de hoja de olivo más concentrado, la que obtuvo una menor valoración.

El sabor amargo mostró diferencias significativas en la muestra con extractos de hojas de olivo dilución 1:10 (Figura 5.5). Las aceitunas de mesa más amargas fueron las que contenían el extracto de hojas de olivo más concentrado (ACEX1:10). Esto era de esperar ya que el extracto 1:10 presentaba una concentración elevada de compuestos bioactivos, entre ellos el compuesto fenólico oleuropeína, que es el compuesto responsable del amargor de las aceitunas. Por lo tanto, el sabor amargo de esta sustancia pudo provocar esta alta intensidad de amargor en las aceitunas con extracto 1:10 por parte de los catadores. Por el mismo motivo, los catadores identificaron esta intensidad como un defecto sensorial.

Schaide *et al.*, (2019) añadieron extractos de hoja de olivo al inicio de la fermentación de aceitunas verdes al estilo Español, y no presentaron amargor en las muestras analizadas sensorialmente de las aceitunas fermentadas con dichos extractos. Varios autores han indicado que el sabor amargo de los alimentos está relacionado con los compuestos fenólicos, como los flavonoides, principalmente flavanoles y flavonoles fenoles (Lalas *et al.*, 2011). Estos autores

encontraron diferencias en el atributo amargo de las aceitunas de mesa tratadas con extracto de hoja de olivo, pero este hecho no afectó la aceptabilidad del producto final.

La acidez obtuvo un valor promedio de 4, sin mostrar diferencias significativas entre las muestras analizadas. Sin embargo, el atributo salado obtuvo diferencias significativas entre las muestras, obteniendo el mayor valor (menos salado) la muestra que contenía el extracto diluido, ACEX1:100.

Como resultado de la evaluación global del producto, las puntuaciones más bajas se obtuvieron en la muestra ACEX1:10 que contenía las aceitunas con el extracto más concentrado. No obstante, el extracto más concentrado es interesante ya que disminuye mucho la concentración de acrilamida, aunque sensorialmente presentó ciertos atributos con altas intensidades amargas, que podrían ser rechazados por los consumidores, debido a no estar acostumbrados a este tipo de aceitunas.

La adición de los extractos en este tipo de aceitunas sería beneficioso tanto para la industria, como para la sociedad, ya que estos productos de origen natural y ricos en compuestos fenólicos podrían usarse como aditivos naturales en los alimentos ya que actúan reduciendo el contenido de acrilamida. Este procedimiento podría ser una herramienta atractiva para la futura implementación en la industria. En un futuro sería muy interesante explorar estos extractos vegetales en diferentes variedades de aceitunas para ver su potencial inhibidor en la formación de esta sustancia indeseable.

## **6. CONCLUSIONES.**

## **6. CONCLUSIONES.**

PRIMERA. Se ha demostrado que las hojas de olivo, subproducto de las industrias oleícolas se pueden utilizar para la obtención de extractos de hoja de olivo que son fuente natural de compuestos fenólicos y presentan carácter funcional debido a su efecto antioxidante.

SEGUNDA. El extracto de hoja de olivo ha tenido unos resultados positivos debido a la capacidad para controlar la producción de acrilamida durante la esterilización de aceitunas negras oxidadas y se asocia a la acción de los compuestos fenólicos. Lo que conlleva a que los fenoles se conviertan en unos compuestos claves para neutralizar dicha sustancia tóxica.

TERCERA. Entre las aceitunas tratadas con extractos, las aceitunas más aceptadas sensorialmente fueron con extractos de hoja de olivo con mayor dilución. Aunque la adición de extracto más concentrado produjo una ligera disminución de la textura, sensorialmente dicho no fue detectado.

## **7. BIBLIOGRAFÍA.**

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

**Agencia de Información y Control Alimentario (2019).** AICA. Información de mercado de aceitunas de mesa. Obtenido de: [https://servicio.mapama.gob.es/InformacionMercado\\_Aica/Inicio.aao](https://servicio.mapama.gob.es/InformacionMercado_Aica/Inicio.aao)

**Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2018).** AECOSAN. Seguridad alimentaria. Contaminantes. Acrilamida. Obtenido de: [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/acrilamida.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/acrilamida.htm).

**Arroyo López, F. N., García García, P., Rodríguez Gómez, F., and Garrido Fernández, A. (2016).** Olives: Types and Consumption. Instituto de la Grasa (CSIC), Seville, Spain. Elsevier Ltd

**Asociación Española de Exportadores e Industriales de Aceitunas de Mesa. (2018)** ASEMESSA. Datos generales del sector. Obtenido de: [https://asemesa.es/content/datos\\_generales\\_del\\_sector](https://asemesa.es/content/datos_generales_del_sector).

**Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (2015).** EFSA. La acrilamida en los alimentos es un problema de salud pública.

**Bas G., (2017).** Extractos vegetales. Hoja de olivo. Nutexa, *Natural Ingredients and Science*. Obtenido de: <https://www.nutexa.com/2017/06/13/qa-todo-sobre-los-extractos-vegetales/>. Consultado: 16/05/2019.

**Benavente-García, O., Castillo, J., Lorente, J., Ortuno, A., y Del Rio, JA (2000).** Actividad antioxidante de los fenólicos extraídos de las hojas de *Olea europaea* L. *Química de los alimentos*, 68 (4), 457-462.

**Bermudo, E., Moyano, E., Puignou, L., and Galceran, M. T. (2006).** Determination of acrylamide in foodstuffs by liquid chromatography ion-trap tandem mass-spectrometry using an improved clean-up procedure. *Analytica chimica acta*, 559(2), 207-214.

- Berra, B., Caruso, D., Cortesi, N., Fedeli, E., Rasetti M. F. and Galli, G. (1995).** Antioxidant properties of minor polar components of olive oil on the oxidative processes of cholesterol in human LDL. *Revista Italiana Sost Grasse*. 72:285-291.
- Bianco, A., y Uccella, N. (2000).** Componentes biofenólicos de las aceitunas. *Food Research International*, 33 (6), 475-485.
- BOE (Boletín Oficial del Estado) Real Decreto 679. (2016).** BOE-A-2016-11953. Real Decreto 679/2016, de 16 de diciembre, por el que se establece la norma de calidad de las aceitunas de mesa. Núm. 304 sábado 17 de diciembre de 2016 Sec. I. Pág. 88525.
- Bouaziz, M., Fki, I., Jemai, H., Ayadi, M., and Sayadi, S. (2008).** Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by addition of natural antioxidants from Chemlali olive leaves. *Food Chemistry*, 108(1): 253-262.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, ME, y Berset, CLWT (1995).** Uso de un método de radicales libres para evaluar la actividad antioxidante. *LWT-Ciencia y tecnología de los alimentos*, 28 (1), 25-30.
- Briante, R., Patumi, M., Terenziani, S., Bismuto, E., Febbraio, F., y Nucci, R. (2002).** Olea europaea L. extracto de hoja y derivados: propiedades antioxidantes. *Diario de química agrícola y de alimentos*, 50 (17), 4934-4940.
- Carratu, B., y Sanzini, E. (2005).** Sostiene biologicamente ative presenti negli alimenti di origine vegetale. *ANNALI-ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA*, 41 (1), 7.
- Casado, F. J., Sánchez, A. H., and Montaña, A. (2010).** Reduction of acrylamide content of ripe olives by selected additives. *Food Chemistry*, 119(1), 161-166.
- Cohaila, M. A. C. (2017).** Evaluación sensorial de aceitunas negras fermentada con y sin acetificación de la salmuera. *CIENCIA Y DESARROLLO*, (10).
- Consejo Oleícola Internacional (COI) (2019).** Obtenido de: [http://www.internationaloliveoil.org/?lang=es\\_ES](http://www.internationaloliveoil.org/?lang=es_ES).

- Charoenprasert, S., y Mitchell, A. (2014).** Influencia del procesamiento de aceitunas negras maduras al estilo de California en la formación de acrilamida. *Diario de química agrícola y alimentaria*, 62 (34), 8716-8721.
- De Bock, M., Thorstensen, E. B., Derraik, J. G., Henderson, H. V., Hofman, P. L., and Cutfield, W. S. (2013).** Human absorption and metabolism of oleuropein and hydroxytyrosol ingested as olive (*Olea europaea* L.) leaf extract. *Molecular nutrition & food research*, 57(11): 2079-2085.
- De la Torre, J. E., Moya, E. R., Bota Prieto, E., and Sancho Valls, J. (1993).** Estudio fisicoquímico y microbiológico de la fermentación de aceitunas verdes arbequinas. *Grasas y Aceites*, 1993, vol. 44, núm. 4-5, p. 274-278.4.
- Del Pino Zapata, S. C. P. (2016).** Proceso de la aceituna estilo californiano mediante el reúso de la soda cáustica proveniente del tratamiento alcalino de la preparación de aceituna verde sevillana en la provincia de Tacna, año 2015.
- Delgado-Adámez, J., Baltasar, M. N. F., Yuste, M. C. A., and Martín-Vertedor, D. (2014).** Oxidative stability, phenolic compounds and antioxidant potential of a virgin olive oil enriched with natural bioactive compounds. *Journal of oleo science*, 63(1): 55-65.
- Encuesta sobre Superficies y Rendimientos Cultivos (2018).** Superficie del cultivo olivar en España. ESYRCE. Obtenido de: <https://www.mapa.gob.es/es/estadistica/temas/estadisticas-agrarias/agricultura/esyrce/>  
Consultado: 10/05/2019
- Estrada Cabezas, J. M. (2011).** La aceituna de mesa: nociones sobre sus características, elaboración y cualidades.
- Fadda C, Del Caro A, Sanguinetti AM, Piga A. (2014).** Texture and antioxidant evolution of naturally green table olives as affected by different sodium chloride brine concentrations. *Grasas y Aceites*, 65(1)

- Fernández González, J., Garrido Fernández, A., García, P., Brenes Balbuena, M., y Quintana, D. (1992).** Características del proceso fermentativo durante la conservación de aceitunas de la variedad Hojiblanca, destinadas a la elaboración del tipo negras. *Grasas y Aceites*.
- Ferrant Font, M. D. (2015)** Hidroxitirosol, el mejor antioxidante natural y el más desconocido. Estudio comparativo con otros antioxidantes. Trabajo fin de Máster.
- Fistonić, I., Šitum, M., Bulat, V., Harapin, M., Fistonić, N., y Verbanac, D. (2012).** Biofenoles de aceite de oliva y salud de la mujer. *Medicinski Glasnik* , 9 (1), 1.
- Gibriel, A., El-Rahman, H. and El-Razik, F. (2004).** Effect of Olive Oil leaves Addition and Waste water Recycling on the Productivity and Quality of olive Oil Produced by Centrifugation. *Euro Fed Lipid Inter Congress "Oils, Fats and Lipids in a changing world" Edinburgh, Abstracts* 153.
- Gimeno, E., Castellote, A. I., Lamuela-Raventós, R. M., De la Torre, M. C., López-Sabater, M. C. (2002).** The effects of harvest and extraction methods on the antioxidant content (phenolics,  $\alpha$ -tocopherol, and  $\beta$ -carotene) in virgin olive oil. *Food Chemistry*, 78 (2), 207-211.
- González Santiago, M. P. (2005).** Estudio de los efectos cardiovasculares y la absorción oral del hidroxitirosol en modelos animales y humano.
- González, M., Navarro, T., Gómez, G., Pérez, R. A., y De Lorenzo, C. (2007).** Análisis sensorial de aceituna de mesa: II. Aplicabilidad práctica y correlación con el análisis instrumental. *Grasas y aceites*, 58(3).
- Hagiwara, K., Goto, T., Araki, M., Miyazaki, H., y Hagiwara, H. (2011).** El polifenol hidroxitirosol de oliva previene la pérdida ósea. *Revista europea de farmacología*, 662 (1-3), 78-84.
- Hedegaard, R. K., Granby, K., Fradsen, H., Thygesen, J., and Skibsted, L. H. (2008).** Acrylamide in bread. Effect of prooxidants and antioxidants. *Eur. Food Res. Technol.* 227, 519-525. doi: 10.1007/s00217-007-0750-5.

- Heredia, A., Guillén, R., Jiménez, A., and Fernández-Bolaños, J. (1993).** Activity of glycosidases during development and ripening of olive fruit. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, 196(2), 147-151.
- IOC. (2011).** Method for the sensory analysis of table olives COI/OT/MO/Doc. No 1/Rev. 2. Madrid, Spain: International Olive Oil Council.
- Japón-Luján, R., y Luque de Castro, MD (2008).** Extracción líquido-líquido para el enriquecimiento de aceites comestibles con fenoles de extractos de hojas de olivo. *Revista de química agrícola y alimentaria*, 56 (7), 2505-2511.
- Jayaprakasha, G. K., and Rao, L. J. (2000).** Phenolic constituents from the lichen *Parmotrema stuppeum* (Nyl.) Hale and their antioxidant activity. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 55(11-12), 1018-1022.
- Jin, C., Wu, X., and Zhang, Y. (2013).** Relationship between antioxidants and acrylamide formation: A review. *Food Res. Int.* 51(2), 611-620. doi: 10.1016/j.foodres.2012.12.047
- Khayyal, MT, El-Ghazaly, MA, Abdallah, DM, Nassar, NN, Okpanyi, SN, y Kreuter, MH (2002).** El efecto reductor de la presión arterial de un extracto de hoja de olivo (*Olea europaea*) en la hipertensión inducida por L-NAME en ratas. *Arzneimittelforschung*, 52 (11), 797-802.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., y Fett, R. (2005).** Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Food Science and Technology*, 25(4), 726-732.
- Lalas S, Athanasiadis V, Gortzi O, Bogiatzis F. (2011).** Enrichment of table olives with polyphenols extracted from olive leaves. *Food Chemistry*, 127(4): 1521-1525.
- Lee, OH, y Lee, BY (2010).** Actividades antioxidantes y antimicrobianas de fenólicos individuales y combinados en extracto de hoja de *Olea europaea*. *Tecnología Bioresource*, 101 (10), 3751-3754.
- Lee-Huang, S., Huang, PL, Zhang, D., Lee, JW, Bao, J., Sun, Y., ... y Huang, PL (2007).** Descubrimiento de inhibidores de la fusión y de la integrasa del VIH-1 de

moléculas pequeñas oleuropeína e hidroxitirosol: Parte I. Inhibición de la integrasa. *Comunicaciones de investigación bioquímica y biofísica*, 354(4), 872-878.

**Lodolini, E.M., Cabrera-Bañegil, M., Fernández, A., Delgado-Adámez, J., Ramírez, R., and Martín-Vertedor, D. (2019).** Monitoring of acrylamide and phenolic compounds in table olive after high hydrostatic pressure and cooking treatments. *Food Chem.* 286, 250-259. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.01.191.

**López, G. P. (2012).** Capacidad antioxidante y antimicrobiana de extractos de hojas de *Agave angustifolia* Haw y su efecto sobre la calidad de hamburguesas de res.

**Lorenzo, G. A. (2013).** *Análisis, inhibición e ingesta de nuevos contaminantes químicos de procesado en alimentos.* Universidad Complutense de Madrid.

**Magrone, T., Spagnoletta, A., Salvatore, R., Magrone, M., Dentamaro, F., Russo, M. A., Difonzo, G., Summo, C., Caponio, F., and Jirillo, E. (2018).** Olive leaf extracts act as modulators of the human immune response. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)*, 18(1), 85-93. doi: 10.2174/1871530317666171116110537.

**Manach, C., Scalbert A., Morand C., Rémésy C., Jiménez L., (2004)** Polifenoles: fuentes de alimentos y biodisponibilidad, *The American Journal of Clinical Nutrition*, Volumen 79, Número 5, páginas 727–747, <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>

**Martín-Vertedor, D., Garrido, M., Pariente, J. A., Espino, J., and Delgado-Adámez, J. (2016).** Bioavailability of bioactive molecules from olive leaf extracts and its functional value. *Phytotherapy Research*, 30(7), 1172-1179.

**Micol, V., Caturla, N., Pérez-Fons, L., Más, V., Pérez, L., y Estepa, A. (2005).** El extracto de hoja de olivo exhibe actividad antiviral contra el virus de la septicemia hemorrágica rhabdovirus (VHSV). *Investigación antiviral*, 66(2-3), 129-136.

**Ministerio de agricultura y pesca (2019)** MAPAMA. Aceituna de mesa. Superficie y producción. Obtenido de:

<https://www.mapa.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/aceite-oliva-y-aceituna-mesa/aceituna.aspx>

**Ministerio de la Presidencia. (2001). Real Decreto 1230/2001**, de 8 de noviembre, por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y venta de las aceitunas de mesa. Boletín Oficial del Estado (BOE) núm. 279, de 21 de noviembre de 2001, 42587–42594. Ministerio de la Presidencia, Madrid.

**Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M. and Miniati, E. (1992).** Simple and hydrolysable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 1.571-1.576.

**Moure, A., Cruz, JM, Franco, D., Dominguez, JM, Sineiro, J., Domínguez, H., ... y Parajó, JC (2001).** Antioxidantes naturales a partir de fuentes residuales. *Química de alimentos*, 72 (2), 145-171.

**Mundi, C. (2018)** Perdida de la totalidad del mercado. Okdiario <https://okdiario.com/economia/2018/07/26/odio-trump-aceituna-negra-confirma-eeuu-impondra-arancel-del-3475-sobre-exportaciones-2757271>. Consultado : 25/10/2018.

**Norma del Codex para aceituna de mesa (CODEX 66-1981) (2013).**

**Obied, H.K. Prenzler, P.D., Konczak, I., Rehman, A. and Robards, K. (2009).** Chemistry and bioactivity of olive biophenols in some antioxidant and antiproliferative *in vitro* bioassays. *Chemical Research in Toxicology*. 22(1): 227-234.

**Olmedilla, B., Grabado, F. (2007)** Componentes bioactivos. Alimentos funcionales: aproximación a una nueva alimentación. Instituto de Nutrición y trastornos alimentarios. Dirección general de salud pública.

**Paiva-Martins, F., Correia, R., Félix, S., Ferreira, P., y Gordon, MH (2007).** Efectos del enriquecimiento del aceite de oliva refinado con compuestos fenólicos de las hojas de olivo. *Diario de química agrícola y alimentaria*, 55 (10), 4139-4143.

- Pérez-Nevado, F., Cabrera-Bañegil, M., Repilado, E., Martillanes, S., y Martín-Vertedor, D. (2018).** Efecto de diferentes tratamientos de cocción en la formación de acrilamida y compuestos fenólicos en aceitunas negras de estilo californiano. *Control de alimentos*, 94, 22-29.
- Pokorny, J., Yanishlieva, N., y Gordon, MH (Eds.). (2001).** *Antioxidantes en los alimentos: aplicaciones prácticas*. Prensa CRC.
- Ramírez, E., Gandul-Rojas, B., Romero, C., Brenes, M., and Gallardo-Guerrero, L. (2015).** Composition of pigments and colour changes in green table olives related to processing type. *Food chemistry*, 166, 115-124.
- Reglamento (UE) n.º 432/2012 de la Comisión, de 16 de mayo de 2012,** por el que se establece una lista de declaraciones autorizadas de propiedades saludables de los alimentos distintas de las relativas a la reducción del riesgo de enfermedad y al desarrollo y la salud de los niños. Diario Oficial de la Unión Europea, núm. 136 de 25 de mayo de 2012. p. 1-40.
- Repo de Carrasco, Ritva, y Encina Zelada, Christian René. (2008).** Determinación de la capacidad antioxidante y compuestos bioactivos de frutas nativas peruanas. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 74(2), 108-124. Recuperado en 17 de junio de 2019, de [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1810-634X2008000200004&lng=es&tlng=es](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2008000200004&lng=es&tlng=es).
- Romeo FV, De Luca S, Piscopo A, Perri E, Poiana M. (2009).** Effects of post fermentation processing on the stabilisation of naturally fermented green table olives (cv Nocellara etnea). *Food Chemistry*, 116: 873–878.
- Rubió, L., Valls, RM, Macià, A., Pedret, A., Giralt, M., Romero, MP, ... y Motilva, MJ (2012).** Impacto de la concentración fenólica del aceite de oliva en los metabolitos fenólicos plasmáticos humanos. *Química de los alimentos*, 135 (4), 2922-2929.
- Sanhueza, L., Melo, R., Montero, R., Maisey, K., Mendoza, L., and Wilkens, M. (2017).** Synergistic interactions between phenolic compounds identified in grape pomace

extract with antibiotics of different classes against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *PLoS one*, 12(2), e0172273. doi: 10.1371/journal.pone.0172273.

**Sciancalepore, V. and Longone V. (1984).** Temperature of lye treatment during preparation of sevillean styles olives. *Grasas y Aceites*, 35, 384-386.

**Schaffer, S., Müller, WE, y Eckert, GP (2010).** Efectos citoprotectores del extracto de aguas residuales del molino de oliva y su principal constituyente hidroxitirosol en células PC12. *Investigación farmacológica*, 62 (4), 322-327.

**Schaide, T., Cabrera-Bañegil, M., Pérez-Navado, F., Esperilla, A., y Martín-Vertedor, D. (2019).** Efecto del extracto de hoja de olivo combinado con *Saccharomyces cerevisiae* en el proceso de fermentación de aceitunas de mesa. *Revista de ciencia y tecnología de los alimentos*, 1-13.

**Sexton, R. P. (1997).** Cellulase, fruit softening and abscission in red raspberry *Rubus idaeus* L.cv Glen Clova. *Annals of Botany* Vol 80, nº3, 371-376.

**Shamla, L., and Nisha, P. (2017).** Acrylamide formation in plantain (*Musa paradisiaca*) chips influenced by different ripening stages: A correlation study with respect to reducing sugars, amino acids and phenolic content. *Food Chem.* 222, 53-60. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.12.007

**Silva, S., Sepodes, B., Rocha, J., Direito, R., Fernandes, A., Brites, D., y Figueira, ME (2015).** Efectos protectores del aceite de oliva refinado suplementado con hidroxitirosol en modelos animales de inflamación aguda y artritis reumatoide. *El Diario de bioquímica nutricional*, 26 (4), 360-368.

**Tamer, C. E., İncedayı, B., Yıldız, B., and Çopur, Ö. U. (2013).** The use of vacuum impregnation for debittering green olives. *Food and bioprocess technology*, 6(12), 3604-3612.

**Tang, S., Avena Bustillos, R. J., Lear, M., Sedej, I., Holstege, D. M., McHugh, T. H., and Wang, S. C. (2016).** valuation of thermal processing variables for reducing acrylamide in canned black ripe olives. *Journal of Food Engineering* 191, 124-130.

**Uceda, M., and Frias, L. (1975).** Harvest dates. Evolution of the fruit oil content, oil composition and oil quality. *Proc. Segundo Seminario Oleicola Internacional, Cordoba, Spain, 6*, 125-130.

**Visioli, F., Poli, A., y Gall, C. (2002).** Antioxidante y otras actividades biológicas de los fenoles de las aceitunas y el aceite de oliva. *Revisiones de investigación médica*, 22 (1), 65-75.

**Warleta, F., Quesada, C. S., Campos, M., Allouche, Y., Beltrán, G., and Gaforio, J. J. (2011).** Hydroxytyrosol protects against oxidative DNA damage in human breast cells. *Nutrients*, 3(10), 839-857.