



**Universidad de Jaén**

Escuela de Doctorado

**TESIS DOCTORAL**



**OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y  
APLICACIONES DE NUEVOS  
ALIMENTOS FUNCIONALES BASADOS  
EN ACEITES DE OLIVA ENRIQUECIDOS  
EN COMPUESTOS BIOACTIVOS**

**PRESENTADA POR:  
M<sup>a</sup> CARMEN MURILLO CRUZ**

**DIRIGIDA POR:  
RUPERTO BERMEJO ROMÁN**

**JAÉN, 2022**



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Departamento de Química Física y Analítica

Área de Química Física

TESIS DOCTORAL

**OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y  
APLICACIONES DE NUEVOS ALIMENTOS  
FUNCIONALES BASADOS EN ACEITES DE  
OLIVA ENRIQUECIDOS EN COMPUESTOS  
BIOACTIVOS**

Memoria presentada por M<sup>a</sup> Carmen Murillo Cruz  
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Jaén  
“Mención Doctorado Industrial”  
“Mención Doctorado Internacional”

Fdo. M<sup>a</sup> Carmen Murillo Cruz

Jaén, mayo, 2022



UNIVERSIDAD DE JAÉN

Departamento de Química Física y Analítica

Área de Química Física

TESIS DOCTORAL

**OBTENCIÓN, CARACTERIZACIÓN Y  
APLICACIONES DE NUEVOS ALIMENTOS  
FUNCIONALES BASADOS EN ACEITES DE  
OLIVA ENRIQUECIDOS EN COMPUESTOS  
BIOACTIVOS**

El Doctor Ruperto Bermejo Román Prof. Titular de la Universidad de Jaén en calidad de Tutor y Director de la Tesis Doctoral presentada por M<sup>a</sup> Carmen Murillo Cruz, certifica que reúne las condiciones necesarias para su defensa y por ello autoriza su presentación a trámite.

Director de Tesis

Tutor de Tesis

**Fdo. Dr. Ruperto Bermejo Román**

*Prof. Titular de Química Física*

Universidad de Jaén

**Fdo. Dr. Ruperto Bermejo Román**

*Prof. Titular de Química Física*

Universidad de Jaén



## Agradecimientos

Agradecer a todas aquellas personas que han estado siempre y, también, a aquellas que llegaron y se fueron, todas de un modo u otro habéis estado a mi lado, habéis contribuido y participado en el desarrollo de esta Tesis Doctoral y juntos hemos compartido momentos buenos y malos.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi director de Tesis, Ruperto Bermejo, la oportunidad que me brindaste de participar y desarrollar este trabajo, depositando tu confianza en mí. Gracias por poner a mi disposición todo lo que estaba a tu alcance y lo que he ido necesitando. Gracias por tú bondad, amabilidad, sinceridad y disposición, no solo me has enseñado conocimientos químicos, también a desenvolverme en la vida y a crecer como persona e investigadora.

Agradecer enormemente a la empresa Almazara La Loma S. L., especialmente a Francisco Vañó, y a la Universidad de Jaén por la financiación que ha sustentado el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Agradecer de corazón a Mariela Chova, el apoyo, la ayuda y su paciencia durante estos años. También a Susana, que de una forma u otra también ha sido partícipe de esta Tesis. Agradecer a la empresa DSM de León, por facilitarnos las muestras de antioxidantes utilizadas en esta Tesis Doctoral.

Muchas gracias a mis compañeras y compañeros del edificio de laboratorios del Campus de Linares, Antonio Ortiz, Andrés, Ana, Raquel, Safae, Pilar y Rafa, siempre dispuestos a ayudar, a escucharme y a aconsejarme cuando lo he necesitado. He aprendido mucho de todos vosotros. En especial, quería agradecer a Laura y Ana Belén sus consejos y sus “necesarias regañinas”, gracias por escuchar mis interminables audios y simplemente gracias por estar siempre, incluso en los momentos de indecisión, me llevo dos grandes amigas. Os echaré de menos a todos y mucho más a mi grupo de “marujas”, a partir de ahora las comidas no serán lo mismo sin vosotros.

Gracias a todas las personas que habéis pasado por el laboratorio durante estos años y que habéis sido partícipes de algún modo en esta Tesis.

Gracias Alba, Sara, Pilar, Mada y Juan Ortega, sin duda alguna, el inicio de este camino no hubiera sido igual sin el apoyo que encontré en vosotros para dar mis primeros pasos en esto de la investigación, sois grandes personas dispuestas siempre a ayudar.

Mis agradecimientos a José Alberto Pereira, por brindarme la oportunidad de realizar una estancia doctoral en su grupo de investigación. Además, agradecer al grupo de Agrobiotecnología de Aceites de Oliva del Instituto Politécnico de Bragança: Nuno R., Patrik, Ana, Kevin, Nuno F. y Sandra su apoyo y ayuda durante la estancia, gracias por acogerme como a una más del grupo. No quiero olvidarme de Miguel y Sabela, gracias por ser mi apoyo allí y por ayudarme con mi “portuñol”. Durante esos meses de estancia, una montaña rusa al lado de mis ánimos no era nada, por ello quería agradecer especialmente a mis “galleguiñas”: Rebe, Carol y Ana. Me apoyasteis y me escuchasteis con infinita paciencia y sobre todo me acogisteis en vuestras casas cuando la mía estaba a cientos de kilómetros.

Para ir finalizando, y quizá lo más importante, me gustaría agradecer a mis padres y hermanos. Mamá, Papá, Andrés y Cristina, gracias por vuestro apoyo incondicional, junto a la abuela sois los pilares más importantes de mi vida. Gracias por ser siempre mi apoyo, sin vosotros nada de esto hubiera sido posible. Mis fracasos son vuestros fracasos, pero mis logros también son vuestros logros. Mamá, papá, de vosotros he aprendido que siempre hay que avanzar hacia delante, aunque el paso sea corto, lo importante es progresar. Gracias por inculcarnos desde pequeños los valores de tolerancia y respeto a los demás, así como a progresar con ayuda y compañerismo y nunca a costa del resto. Y como bien dice la abuela: “detrás de un día triste, viene uno feliz”. Gracias Victoria y José, también habéis sido un gran apoyo junto con mis hermanos.



No quiero olvidarme de mis amigas: el grupo que va a la playa y el que no va de cumpleaños, y tampoco de vosotras, Ana y Ghiz. Gracias a todas por ser siempre mi vía de escape, gracias por escucharme, aunque me enrolle mucho dando detalles que no entendéis, gracias por aguantarme durante estos años en los que he tenido muchos altibajos y gracias por estar y formar parte de mi vida.

Es posible que me deje gente sin mencionar, por ello me gustaría dar las gracias a todas y todos los que habéis pasado por mi vida a lo largo de estos 4 años de Tesis Doctoral. Sigáis o no sigáis formando parte de ella, de algún modo las personas estamos hechas de historias y momentos vividos, por tanto, todas habéis formado parte de lo que hoy soy.

¡Gracias a todos!

¡Qué suerte teneros!

*Mamen*



*“El aspecto más triste de la vida actual es que la ciencia gana en conocimiento más rápidamente que la sociedad en sabiduría”*

Isaac Asimov

*“Nada en la vida debe ser temido, solo debe ser comprendido.  
Ahora es el momento de comprender más para temer menos”*

Marie Curie



# Índice

---



|   |      |
|---|------|
| <b>Resumen</b> .....  | xvii |
| <b>Abstract</b> .....   | xxi  |
| <b>1. Introducción</b> .....  | 25   |
| <b>1.1. Aceite de Oliva Virgen</b> .....  | 27   |
| 1.1.1. Composición química del Aceite de Oliva .....  | 27   |
| 1.1.2. Clasificación de los Aceites de Oliva .....  | 33   |
| 1.1.3. Parámetros de Calidad del Aceite de Oliva .....  | 37   |
| 1.1.4. Reglamentación .....   | 41   |
| 1.1.5. Aceite de Oliva en la Dieta Mediterránea .....   | 48   |
| 1.1.6. Aceite de Oliva y Color .....  | 52   |
| 1.1.6.1. Especificación del color .....   | 53   |
| 1.1.6.2. Espacio de color .....   | 57   |
| <b>1.2. Carotenoides</b> .....  | 60   |
| 1.2.1. Estructura química y clasificación.....  | 61   |
| 1.2.2. Carotenoides en la Nutrición Humana.....   | 65   |
| 1.2.3. Importancia de los carotenoides en la salud .....  | 69   |
| 1.2.4. Métodos de extracción y análisis .....   | 74   |
| <b>1.3. Alimentos funcionales</b> .....   | 77   |
| 1.3.1. Definición .....   | 79   |
| 1.3.2. Otros conceptos relacionados .....   | 82   |
| 1.3.3. Legislación .....  | 83   |
| <b>1.4. Referencias</b> .....   | 85   |
| <b>2. Objetivos</b> .....   | 103  |
| <b>3. Efecto en las propiedades físico-químicas de aceites de oliva virgen extra de variedad picual, enriquecidos con <math>\beta</math>-caroteno procedente de hongos.</b> 107   |      |
| <b>4. Mejora de las propiedades físico-químicas del aceite de oliva virgen extra de variedad arbequina enriquecido con <math>\beta</math>-caroteno procedente de hongos</b> ..... | 111  |
| <b>5. Lengua electrónica como herramienta para evaluar el impacto de la fortificación en carotenoides del aceite de oliva de variedad arbequina</b> ..                            | 115  |

|  |     |
|--|-----|
| <b>6. Aceites de oliva monovarietales fortificados en carotenoides: evaluación fisicoquímica y sensorial</b> ..... | 119 |
| <b>7. Discusión General</b> .....  | 123 |
| <b>7.1. Efecto de la adición de <math>\beta</math>-caroteno</b> .....  | 125 |
| <b>7.2. Evaluación de la adición de <math>\beta</math>-caroteno y luteína</b> .....                                | 129 |
| <b>8. Conclusiones</b> .....   | 135 |
| <b>9. Conclusions</b> .....  | 141 |
| <b>10. Producción científica de la investigación</b> .....   | 147 |
| <b>10.1. Artículos derivados de esta investigación</b> .....   | 149 |
| <b>10.2. Congresos derivados de esta investigación</b> .....   | 150 |
| 10.2.1. Congresos Internacionales.....   | 150 |
| 10.2.2. Congresos Nacionales.....  | 151 |
| <b>10.3. Otras aportaciones científicas</b> .....  | 152 |
| 10.3.1. Artículos.....   | 152 |
| 10.3.2. Congresos.....   | 152 |
| 10.3.1. Actividades divulgativas.....  | 153 |



# Resumen

---



## Resumen

Con este proyecto se pretende desarrollar un nuevo alimento funcional basado en aceite de oliva virgen enriquecido en carotenoides. Actualmente, existe un creciente interés por estos compuestos, de carácter natural, debido a la existencia de múltiples estudios que muestran su elevado potencial como antioxidantes. A ello se suma el hecho de que la dosis de carotenoides recomendada para la prevención de ciertas patologías, no se cubre fácilmente a través de la dieta. Es por ello que los niveles adecuados de carotenoides deben ser alcanzados mediante suplementos que incluyan formulaciones de extractos enriquecidos en estos compuestos antioxidantes.

En esta Tesis Doctoral se han utilizado aceites de oliva virgen extra de diferente variedad de aceituna: Arbequina, Picual y Royal. Además, también se han utilizado aceites de diferentes índices de maduración, mediante la recolección y procesado del fruto en diferentes meses. Los carotenoides utilizados para enriquecer estos aceites han sido  $\beta$ -caroteno y luteína, obtenidos de distintas fuentes naturales como la flor de Marigold y el hongo *Blakeslea trispora*, respectivamente.

Se ha llevado a cabo la caracterización de todas las muestras tanto de los aceites sin enriquecer (control), como de los aceites enriquecidos con ambos carotenoides y a diferentes concentraciones de los mismos. Estos ensayos de caracterización fisicoquímica han consistido en la determinación de parámetros característicos como: color, acidez libre, índice de peróxidos, coeficientes de extinción específica, valor de p-anisidina y TOTOX. Adicionalmente, se ha estudiado la estabilidad oxidativa, composición de fenoles totales y se ha llevado a cabo el análisis sensorial de los atributos básicos de las diferentes muestras. Por último, también se determinó la composición de las muestras utilizadas mediante cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.

A esta caracterización se ha sumado el estudio de degradación de los diferentes aceites controles y enriquecidos. Este consistió en analizar la evolución y la estabilidad de las diferentes muestras de aceites frente a las variables de degradación características para este tipo de matrices alimentarias, como son la exposición a la radiación, la temperatura y el tiempo.

El dispositivo de lengua electrónica, fabricado en el laboratorio, también se utilizó, obteniéndose resultados satisfactorios para una discriminación entre muestras enriquecidas y controles, así como entre carotenoides y entre diferentes concentraciones de estos. Además, utilizando este dispositivo, se pudo evaluar el efecto de la fortificación de los carotenoides en la intensidad de los atributos de análisis sensorial y en los fenoles totales.

Los resultados obtenidos respaldan la idea de utilizar el aceite de oliva virgen extra como medio de incorporación en el organismo de las cantidades necesarias de carotenoides, dotando así al aceite de oliva de un valor añadido superior al que ya de por sí tiene y, además, ofreciendo una alternativa diferente a las actuales, respecto a la lucha contra determinadas enfermedades asociadas al déficit de antioxidantes en el organismo humano.

# Abstract

---



## Abstract

This project aims to develop a new functional food based on virgin olive oil enriched with carotenoids. Nowadays, there is a growing interest in these natural compounds, as several studies demonstrate their high potential as antioxidants. Additionally, the recommended dose of carotenoids to prevent certain pathologies is not reached just with the diet. Thus, adequate levels of carotenoids can be reached by using supplements including enriched extracts of these antioxidant.

In this Doctoral Thesis, extra virgin olive oils from different cultivar varieties were used: Arbequina, Picual and Royal. In addition, oils from different harvesting and processing periods, resulting in different ripening indexes have been used. The carotenoids used to enrich these oils were lutein and  $\beta$ -carotene, obtained from different natural sources such as Marigold flower and *Blakeslea trispora*, fungus, respectively.

The samples' characterization, with and without both carotenoids and also at different concentration levels, was carried out. This physicochemical characterization was developed based on the determination of parameters such as: color, free acidity, peroxide value, specific extinction coefficients, p-anisidine value and TOTOX. Additionally, oxidative stability, total phenols content, and basic attributes of the different oil samples, were also performed. Finally, samples' compositions were determined using high-performance liquid chromatography coupled to mass-spectrometry.

In addition, a degradation study of the different control and enriched oils was carried out, monitoring the evolution and stability of the different oil samples against its characteristic degradation variables for this type of food matrices, such as radiation exposure, temperature and time.

A lab-made Electronic tongue was also used in this thesis. The results, were satisfactory, obtaining a good discrimination between enriched and controls

samples, as well as different carotenoids and variable concentrations. Furthermore, the effect of carotenoid fortification on the intensity of sensory attributes and total phenols content could be evaluated with the E-tongue device.

The results obtained support the idea of using extra virgin olive oil as an effective way of incorporating the necessary quantities of carotenoids into the organism, providing olive oil with a higher added value than it already has and also offering a different alternative to the current one, with regard to the fight against certain diseases associated with antioxidant deficiency in the human organism.



# 1. Introducción

---



## 1.1. Aceite de Oliva Virgen

Es ampliamente conocido que el aceite de oliva virgen es el aceite obtenido directamente del fruto del olivo (*Olea Europaea L.*) mediante procedimientos mecánicos o físicos, sin la adición de ningún disolvente químico, sin sufrir tratamientos distintos a los de lavado, decantación, centrifugado y filtración y, además, bajo condiciones de temperaturas controladas. Se podrá hablar de “extracción en frío” cuando se obtengan aceites de oliva virgen y virgen extra a menos de 27 °C. (Reglamento (UE) 29/2012).

De entre los diferentes aceites de origen vegetal, el aceite de oliva es de los únicos que se puede consumir en crudo. El proceso de extracción permite que el zumo de aceituna preserve el valor nutricional del fruto de origen, conservando así su composición en ácidos grasos y otros compuestos de menor concentración como son pigmentos clorofílicos y carotenoides, tocoferoles, vitaminas, fenoles, esteroides, etc. (Garcia-Oliveira et al., 2021; Miho et al., 2020).

### 1.1.1. Composición química del Aceite de Oliva

Los componentes químicos del aceite se pueden clasificar en dos grupos: componentes mayoritarios y componentes minoritarios. El primer grupo hace referencia a la fracción saponificable, es la que representa el 97-99 % de su peso total y está formada principalmente por triglicéridos y en menor proporción por diglicéridos, monoglicéridos y ácidos grasos libres. El alto valor nutricional del aceite de oliva viene dado por su elevado contenido en ácidos grasos monoinsaturados de los que destaca el ácido oleico (C18:1), que representa entre el 56 y el 84% de la fracción total de ácidos grasos; el segundo mayoritario es el ácido linoleico (C18:2), ácido graso poliinsaturado que representa entre el 3 y el 21% del total de ácidos grasos. Entre otros también destacan el ácido palmítico (C16:0) (7.5-20%), el ácido esteárico (C18:0) (0.5-5%) y el ácido linolénico (C18:3) ( $\leq 1\%$ ). La fracción presente en el aceite de oliva, de cada uno de ellos

va a depender, de la zona de producción (latitud y clima), del índice de madurez, así como de la variedad del fruto (Boskou, 2006; Servili et al., 2014).

El segundo grupo de componentes, es el conocido como fracción insaponificable, supone el resto del peso total del aceite (1-3 %) y es el grupo responsable de la calidad y las características sensoriales del aceite de oliva. A estos componentes minoritarios presentes en el aceite de oliva se asocian múltiples beneficios sobre la salud humana. En esta misma línea, son numerosos los trabajos de investigación existentes hoy día que muestran los beneficios, en términos de salud, de compuestos fenólicos y carotenoides del aceite de oliva. Estos beneficios están asociados principalmente a su actividad antioxidante y antiinflamatoria, reduciendo así, el riesgo de padecer enfermedades coronarias y degenerativas por la ingesta regular de aceite a través de la dieta (Boussahel et al., 2020; Huang et al., 2019; Mentella et al., 2019).

Los compuestos minoritarios que conforman la fracción no saponificable del aceite de oliva que se recogen en la base de datos de *OliveNet* son: Fenoles, Esteroles, Fosfolípidos, Compuestos Volátiles, Hidrocarburos, Pigmentos, Tocoferoles, Alcoholes alifáticos y triterpénicos y Ceras; quedan recogidos en la Tabla 1.1. (Bonvino et al., 2018).

**Tabla 1.1.** Composición química del aceite de oliva.

| <b>Fracción Insaponificable</b> |  |   |
|---------------------------------|--|---|
| <b>Componente</b>               | <b>Concentración<br/>(mg/kg aceite de<br/>oliva)</b> | <b>Referencia</b>   |
| <b>Tocoferoles:</b>             |  |   |
| $\alpha$ -tocoferol             | 10,2-208   | (Ambra et al., 2017;  |
| $\beta$ -tocoferol              | 0,75-1,05  | Mapelli-Brahm et al.,   |
| $\gamma$ -tocoferol             | 0,70-2,10  | 2018)   |
| <b>Hidrocarburos:</b>           |  |   |
| Escualeno                       | 200-7.500  | (Boskou, 2015; Jimenez-<br>Lopez et al., 2020)                |
| <b>Pigmentos:</b>               |  |   |
| Clorofilas                      | 0,15-61,96   | (Mapelli-Brahm et al.,<br>2018; M. J. Moyano et al.,<br>2008) |
| Carotenoides totales            | 0,53-31,51   |   |
| Luteína                         | 0,65-3,6   |   |
| $\beta$ -Caroteno               | 0,15-0,67  |   |
| <b>Compuestos<br/>Fenólicos</b> | 213-450  | (Ambra et al., 2017)  |
| <b>Compuestos<br/>Volátiles</b> | 8,06-34,24   | (Cherfaoui et al., 2018)                                      |

La concentración de compuestos fenólicos presente en el aceite de oliva va a depender principalmente de factores medioambientales, genéticos y climatológicos, y, además, de la metodología de extracción, almacenaje y envasado. Esta concentración tiene su origen en el propio proceso enzimático sobre la pulpa de la aceituna, durante el procesado de esta misma. Los fenoles hidrofílicos presentes en los alimentos pertenecen a un importante grupo de metabolitos secundarios de las plantas e incluyen desde moléculas fenólicas simples hasta compuestos de alto peso molecular. Este grupo, aunque minoritario, es uno de los más importantes del aceite de oliva ya que es responsable de las características sensoriales (amargor y picor), organolépticas (aroma y sabor) y del poder antioxidante del aceite de oliva (Jimenez-Lopez et al., 2020; Shahidi & Ambigaipalan, 2015).

Entre los compuestos fenólicos encontramos 6 grupos de componentes (Pérez et al., 2014):

- Ácidos fenólicos: de los que destacan los derivados del ácido benzoico y ácido cinámico.
- Flavonoides: luteolina y apigenina.
- Lignanós: (+)-pinorresinol y (+)-1-hidroxi-pinorresinol.
- Alcoholes fenólicos: tirosol e hidroxitirosol.
- Secoirridoides: oleuropeína, demetiloleuropeína, ligustrósido y sus angliconas.
- Hidroxi-isocromanos.

Los tocoferoles del aceite de oliva se encuentran mayoritariamente en tres formas:  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol y  $\gamma$ -tocoferol. Estos compuestos se conocen como vitamina E, son liposolubles y previene la oxidación de las membranas lipídicas. El compuesto mayoritario que constituye hasta el 90 % del total de tocoferoles es el  $\alpha$ -tocoferol, encontrándose el resto de compuestos en cantidades menores (Kalogeropoulos & Tsimidou, 2014; Mapelli-Brahm et al., 2018).

De los hidrocarburos, destacar el escualeno, por ser el componente más abundante de este grupo, también es el mayoritario de la fracción insaponificable con una concentración que varía entre 200 y 7.500 mg/kg de aceite. Este amplio rango de concentración en el aceite de oliva virgen y virgen extra se debe principalmente a la variedad de fruto, a las técnicas de extracción y sobre todo a que su concentración va disminuyendo durante el proceso de refinado. Entre el resto de hidrocarburos presentes en el aceite de oliva, encontramos triterpenos y diterpenos (Boskou, 2015; Jimenez-Lopez et al., 2020).

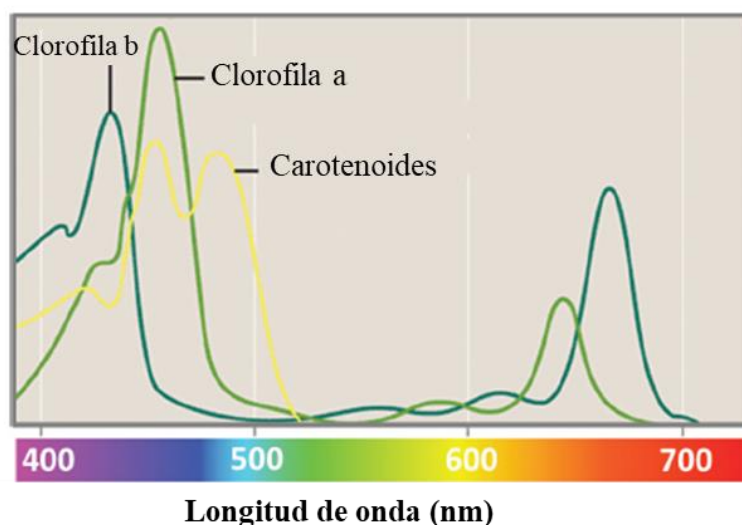
Respecto a los compuestos volátiles, resaltar que son los que proporcionan al aceite su olor y sabor característicos, convirtiéndose así en el grupo de compuestos que directamente define los atributos sensoriales, organolépticos y de calidad de los aceites de oliva que hacen que se diferencien del resto de aceites vegetales. La mayoría de los compuestos volátiles presentes en el aceite de oliva, a diferencia del resto de compuestos químicos que lo componen, se generan durante el procesado del fruto, por acción de la enzima, Lipoxigenasa (LOX). Este grupo está formado por más de 100 compuestos que han llegado a identificarse, siendo principalmente: alcoholes, aldehídos, ésteres y cetonas (Cherfaoui et al., 2018; Morales et al., 2013; Sánchez-Ortiz et al., 2018).

Finalmente, encontramos los pigmentos fotosintéticos, que comunican al aceite su color característico. Este color verde-amarillo depende principalmente de la madurez y variedad del fruto. Sin embargo, la cantidad de pigmentos presentes en el zumo final, dependerá también de otros factores como el clima, su origen geográfico y las condiciones de almacenaje y por tanto su concentración puede llegar a ser muy variable tal y como se muestra en la Tabla 1.1. Asimismo, la composición de pigmentos de la aceituna juega un papel fundamental en la apariencia del aceite de oliva, determinando el color, que será un atributo fundamental a tener en cuenta por parte de los consumidores (Gandul-Rojas et al., 2000; Montealegre et al., 2010). Los pigmentos presentes en el aceite de oliva pueden clasificarse en dos grupos: clorofilas y carotenoides.

Las clorofilas junto con algunos de sus derivados como las feofitinas son los pigmentos que confieren el color verde al aceite de oliva virgen. La fórmula molecular de las clorofilas es  $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$  y pueden ser a o b. La primera de ellas tiene un grupo metilo ( $-CH_3$ ) y es la más abundante, representando entre 70-80 % del total de los pigmentos, y la segunda tiene un grupo formilo ( $-CHO$ ). Durante el proceso de elaboración del aceite, específicamente durante la

extracción y con el aumento del tiempo de almacenamiento, la degradación de las clorofilas se intensifica. Esta se produce como consecuencia de una reacción irreversible donde se forman lentamente feofitinas a partir de clorofilas. El ion central  $Mg^{+2}$  del anillo de porfirina se intercambia con dos átomos de hidrógeno provocando que las moléculas sean más estables. Finalmente, tras la eliminación de los carboximetilos, se forman los productos finales de degradación de las clorofilas que son las pirofeofitinas (Aparicio-Ruiz & Gandul-Rojas, 2014; Giuliani et al., 2011).

Las clorofilas absorben luz en el espectro que va desde los 320 a los 700 nm (Figura 1.1.), esto hace que en presencia de luz las clorofilas y sus derivados tengan un efecto prooxidante sobre los lípidos y, sin embargo, en oscuridad actúan como antioxidantes. En base a este comportamiento el aceite de oliva, rico en pigmentos verdes, debe de almacenarse protegido de la luz. Así se evita que se forme oxígeno singlete y que este reaccione con ácidos grasos y de lugar a la formación de hidroperóxidos y con ello a la autooxidación (Limón, 2017).



**Figura 1.1.** Espectro de absorción de la clorofila a, b y de los carotenoides. Imagen obtenida y modificada de Guidi et al. (2017).



Tras la feofitina a, los pigmentos más abundantes en el aceite de oliva son el  $\beta$ -caroteno y la luteína. Ambos pertenecen al grupo de carotenoides que conforman el segundo grupo de pigmentos fotosintéticos del aceite de oliva. Los carotenoides se clasifican principalmente en dos grupos, los carotenos y las xantofilas. Los primeros están formados por carbonos e hidrógenos, mientras que, las segundas se caracterizan por la presencia de grupos de oxígeno. Además del  $\beta$ -caroteno y la luteína destacan otros carotenoides en concentraciones menores como la violaxantina y la neoxantina.

Los carotenoides no solo son los responsables del color amarillento del aceite de oliva, sino que también poseen diferentes tipos de bioactividad:

- Provitamina A: asociada a beneficios inmunológicos, endocrinos y metabólicos.
- Actividad antioxidante: inhibiendo el oxígeno singlete y con ello la oxidación de los lípidos.
- Actividad anticáncer, así como, prevenir la degeneración macular asociada a la edad y la formación de cataratas.

Existe una relación directa entre la calidad y la frescura, las propiedades nutricionales y las propiedades antioxidantes del aceite de oliva, convirtiendo así, la determinación de compuestos fotosintéticos en una herramienta fundamental para evaluar la calidad y las posibles adulteraciones del aceite de oliva (Lazzerini et al., 2017; Uncu & Ozen, 2020).

### 1.1.2. Clasificación de los Aceites de Oliva

La descripción de los diferentes aceites de oliva que se encuentran en el mercado y, que se recogen en este apartado, viene reflejada en el Reglamento (UE) n.º 29/2012 sobre las normas de comercialización del aceite de oliva y en el que se incluyen las últimas modificaciones de 2019 (Reglamento (UE) 29/2012).

- Aceite de oliva virgen extra: “aceite de oliva de categoría superior obtenido directamente de aceitunas y solo mediante procedimientos mecánicos”.
- Aceite de oliva virgen: “aceite de oliva obtenido directamente de aceitunas y solo mediante procedimientos mecánicos”.
- Aceite de oliva: “contiene exclusivamente aceites de oliva refinados y aceites de oliva vírgenes: aceite que contiene exclusivamente aceites de oliva que se hayan sometido a un tratamiento de refinado y de aceites obtenidos directamente de aceitunas”.
- Aceite de orujo de oliva: “aceite que contiene exclusivamente aceites procedentes del tratamiento del producto obtenido tras la extracción del aceite de oliva y de aceites obtenidos directamente de aceitunas o aceite que contiene exclusivamente aceites procedentes del tratamiento del orujo de oliva y de aceites obtenidos directamente de aceitunas”.

En la Tabla 1.2, vienen recogidas las características que definen cada tipo de aceite y que vienen reguladas en el Reglamento (UE) 2019/1604. En este se incluyen las últimas modificaciones del Reglamento (CEE) N° 2568/91 y que tiene como título: “relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis” (Reglamento (UE) 2019/1604).

Las características de calidad de cada aceite, incluidas sus características organolépticas, van a depender además del fruto de la aceituna, del proceso de obtención del aceite. Es decir, de la recolección, el lavado, la molturación y el almacenamiento del fruto, como también del almacenaje del propio zumo. Variaciones en estos procesos pueden dar lugar a que estas características difieran

entre unos aceites y otros. De este modo, la clasificación de los aceites va a depender de los parámetros de calidad que se establecen para cada una de las categorías (Tabla 1.2.), y se considerarán de un grupo u otro si cumplen o no con los límites establecidos.

De entre los diferentes grupos de aceites que encontramos, cabe destacar el aceite de oliva virgen por sus propiedades beneficiosas para la salud y sus características organolépticas. El reglamento establece que este puede ser virgen extra, virgen o aceite de oliva lampante. Los dos primeros están destinados al consumo humano directamente tal cual se producen. Los aceites de oliva que contienen solo aceite de oliva refinado y aceite de oliva virgen, junto con el aceite de orujo de oliva, también se pueden consumir. El resto de aceites que encontramos necesitan someterse a procesos de refinado. La acidez como parámetro de calidad (Tabla 1.2.) tiene especial importancia en la clasificación de los aceites. Este parámetro denota el contenido de ácidos grasos libres en función del porcentaje de ácido oleico. Por tanto, cuanto menor sean los valores de este parámetro, los aceites tienen mayor calidad.

La calidad de un aceite viene dada por los parámetros químicos directamente relacionados con ella y además por los atributos sensoriales, influenciados directamente por la pureza y composición de este. Algunos de los parámetros analizados para determinar la categoría a la que pertenece el aceite son: los ácidos grasos, suma de los isómeros transoleicos, suma de los isómeros translinoleicos y translinolénicos, estigmastadienos, diferencia entre ECN 42 (HPLC) y ECN 42 (cálculo teórico), monopalmitato de 2-glicerilo, composición de esteroides y esteroides totales, eritrodil, uvaol y ceras. Respecto a la composición del aceite ocurre igual que para las características de calidad, existen límites descritos por la normativa (Reglamento (UE) 2019/1604) que determinan en que grupo o categoría se encuadra cada aceite.

**Tabla 1.2.** Categorías de los aceites de oliva según sus características de calidad.

| Categoría  | Acidez (%) | Índice de peróxidos (mEq. O <sub>2</sub> /kg) | K <sub>232</sub> | K <sub>268.0</sub><br>K <sub>270</sub> | ΔK     | Evaluación organoléptica |                          |  | Ésteres efílicos de los ácidos grasos (mg/kg) |
|--|------------|---|------------------|--|--------|--------------------------|--------------------------|--|---|
|  |            |   |                  |  |        | Mediana del defecto (Md) | Mediana del frutado (Mf) |  |   |
| Aceite de oliva virgen extra   | ≤ 0.80     | ≤ 20.0  | ≤ 2.50           | ≤ 0.22                                 | ≤ 0.01 | Md ≤ 0.0                 | Mf > 0.0                 |  | ≤ 35  |
| Aceite de oliva virgen   | ≤ 2.0      | ≤ 20.0  | ≤ 2.60           | ≤ 0.25                                 | ≤ 0.01 | Md ≤ 3.5                 | Mf > 0.0                 |  | -   |
| Aceite de oliva lampante   | > 2.0      | -   | -                | -                                      | -      | Md > 3.5                 | -                        |  | -   |
| Aceite de oliva refinado   | ≤ 0.30     | ≤ 20.0  | -                | ≤ 1.25                                 | ≤ 0.16 | -                        | -                        |  | -   |
| Aceite de oliva-contiene exclusivamente aceites de oliva refinados y aceites de oliva vírgenes | ≤ 1.00     | ≤ 15.0  | -                | ≤ 1.15                                 | ≤ 0.15 | -                        | -                        |  | -   |
| Aceite de orujo de oliva crudo   | -          | -   | -                | -                                      | -      | -                        | -                        |  | -   |
| Aceite de oliva refinado   | ≤ 0.30     | ≤ 5.0   | -                | ≤ 2.0                                  | ≤ 0.20 | -                        | -                        |  | -   |
| Aceite de orujo de oliva   | ≤ 1.00     | ≤ 15.0  | -                | ≤ 1.70                                 | ≤ 0.18 | -                        | -                        |  | -   |

### 1.1.3. Parámetros de Calidad del Aceite de Oliva

Según el Reglamento (CEE) N° 2568/91 y sus posteriores modificaciones, los parámetros a tener en cuenta en el estudio de la calidad del aceite son: Acidez (%), Índice de peróxidos (mEq. O<sub>2</sub> /kg), Coeficientes de extinción específica (K<sub>232</sub>, K<sub>268</sub> o K<sub>270</sub> y ΔK), Evaluación organoléptica y Ésteres etílicos de los ácidos grasos (Tabla 1.2.).

- Acidez (%). Acidez libre o grado de acidez (FA), mide la cantidad de ácidos grasos libres en la muestra de aceite, para ello, se determinan los gramos de ácido oleico en 100 g de muestra y se expresa como el porcentaje de ácido oleico en peso. Los ácidos grasos se liberan cuando se produce la ruptura de las moléculas de los triglicéridos, por consiguiente, un aumento de este parámetro significa un aumento de ácidos grasos libres. Este puede tener su origen en diferentes causas como un mal estado del fruto, un índice de madurez demasiado tardío, una mala conservación, presencia de actividad microbiológica o tratamientos inadecuados en el proceso de elaboración. Un valor bajo de hasta 0.8 % de acidez en un aceite, se considera positivo, ya que significa que es de buena calidad y que el fruto se encontraba en óptimas condiciones. No obstante, para el consumo humano está permitido hasta 2 g de ácido oleico por cada 100 g de aceite, es decir hasta un 2 %.
- Índice de peróxidos (IP) (mEq. O<sub>2</sub> /kg). Este parámetro hace referencia a la cantidad de hidroperóxidos presentes en la muestra de aceite que se analiza. Cuando un aceite, compuesto mayoritariamente por ácidos grasos, entra en contacto con oxígeno, se forman peróxidos, lo cuales constituyen un indicador de la oxidación primaria de un aceite de oliva. Se expresa en

miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de aceite. Un índice de peróxidos elevado significa que existe una alta oxidación del aceite, pudiendo ser debida a una mala conservación de este o a la influencia de factores de degradación como temperatura o luz.

- Coeficientes de extinción específica. Estos parámetros se basan en la medida por espectrofotometría de la absorbancia en el rango de longitudes de onda del ultravioleta (UV). Las medidas se realizan a las longitudes de onda indicadas por el método: 232, 268 o 270 nm, obteniéndose los valores correspondientes a los parámetros  $K_{232}$ ,  $K_{268}$  y  $K_{270}$ , respectivamente. Esta evaluación por espectrofotometría da información sobre si hay sistemas diénicos y triénicos conjugados, que se forman cuando existe una oxidación durante el proceso tecnológico de obtención del aceite. De este modo, se obtiene información sobre la calidad de la materia grasa a estudiar, su conservación y de los posibles defectos provocados durante el proceso para su obtención. La oxidación primaria del aceite a estudiar se determina con el coeficiente  $K_{232}$ . Un valor alto de este parámetro indica la presencia de ácidos grasos poliinsaturados conjugados, estos reaccionan con el oxígeno dando hidroperóxidos.

El coeficiente  $K_{270}$  o  $K_{268}$  aporta información sobre una oxidación secundaria. A estas longitudes de onda (270 y 268 nm) absorben radiación los aldehídos y cetonas, que se forman con la rotura de los hidroperóxidos que tienen origen en la oxidación primaria. Valores elevados de estos coeficientes de extinción coinciden con un grado alto de oxidación y una posible refinación de los aceites estudiados.

Por último, también se determina el valor de  $\Delta K$  que expresa una variación del coeficiente de extinción a 270 nm. Es común utilizarlo cuando se sospecha que existen mezclas de aceites con otros que han sido refinados. Por ello cuando se trata de aceites de oliva virgen o virgen extra el valor de  $\Delta K$  es mínimo, cero o próximo a él.

- Evaluación sensorial. Para llevar a cabo el análisis sensorial del aceite de oliva existe un único método oficial que viene recogido por la normativa de la Unión Europea (UE) y el Consejo Oleícola Internacional (COI) (COI, 2007; Reglamento (UE) 1348/2013). Este método solo se aplica a aceites de oliva vírgenes y se lleva a cabo por un panel formado por un grupo de catadores (de 8 a 12), entrenados y examinados. La clasificación de los aceites o su etiquetado va en función de la intensidad de los defectos y del atributo frutado detectado. En el caso de un virgen extra, deberá cumplir con una mediana positiva del atributo frutado y una mediana igual a cero o nula de los defectos. Para el aceite de oliva virgen, se debe cumplir también una mediana del atributo frutado positiva y, sin embargo, la mediana de los defectos puede ser menor o igual a 3.5 puntos. Igualmente, en ambos reglamentos se encuentran las descripciones y detalles de todo lo relacionado a un correcto análisis sensorial, desde la descripción del vocabulario apropiado hasta los detalles de unas instalaciones convenientes.

Destacar los principales atributos negativos que se recogen en el reglamento: atrojado/borras, moho-humedad, avinado-avinagrado/ácido-agrio, rancio, aceitunas congeladas, cocinado o quemado, heno-madera, basto, lubricante, alpechín, salmuera,

metálico, esparto, gusano y pepino. Y entre los atributos positivos se encuentran: frutado, amargo y picante. Los catadores se ayudan de una hoja de cata con los diferentes defectos y atributos definidos en una lista junto a una línea. La escala utilizada de esta línea es de 10 cm de longitud, en ella se representa la intensidad del análisis sensorial realizado. Los datos, que se expresan en centímetros, se tratan estadísticamente.

Finalmente, la presencia de atributos positivos está directamente relacionada con un fruto sano y en su momento de madurez óptimo, junto a un proceso de extracción desarrollado con las prácticas adecuadas. Por el contrario, el mal estado del fruto, la presencia de microorganismos o la oxidación de los ácidos grasos libres y un proceso de extracción inadecuado, son la principal causa de que aparezcan compuestos fenólicos y volátiles y con ello los diferentes atributos negativos anteriormente mencionados.

- Ésteres etílicos de ácidos grasos. La fermentación de materia orgánica produce alcoholes como etanol y metanol. Cuando estos alcoholes entran en contacto con el aceite y los ácidos grasos libres de este, se forman los ésteres etílicos y metílicos. La fermentación se da mayoritariamente durante la molturación de la aceituna, pero tiene su inicio desde la recogida de la aceituna y la rotura de la piel de la misma. La mala calidad del fruto de origen y unas prácticas inadecuadas a lo largo de todo el proceso de extracción del aceite de oliva, favorecen la formación de estos ésteres etílicos. Prácticas inadecuadas durante el procesado en los equipos de extracción, en los decantadores e incluso en el almacenaje, junto al mal estado del fruto y condiciones de temperatura, oxígeno, agua y luz inadecuadas, van a determinar



que los índices de ésteres etílicos sean altos. Para los aceites de oliva virgen extra el valor de este parámetro debe ser menor o igual a 35 g/kg.

#### 1.1.4. Reglamentación

La tecnología relacionada con la producción de aceite, la propuesta de nuevos métodos y el constante y rápido progreso ante las exigencias y la competitividad del mercado, hacen que la legislación y normativa vigente se encuentren siempre bajo proceso de revisión y mejora continua.

En consecuencia, es muy importante estar al corriente de los aspectos legales que se refieren al aceite de oliva en cuanto a su composición, pureza y calidad. En este sentido y dependiendo de donde se comercialice el aceite de oliva, este debe cumplir con diferentes normativas, siendo las más importantes actualmente las especificadas por la UE, por el COI y por el *Codex Alimentarius*.

Dentro de la UE, la legislación del aceite de oliva se compone de reglamentos, solo válidos dentro de esta área y de obligatorio cumplimiento. En otros ámbitos fuera del área de la UE, se aplican las normativas del COI. En este caso los países miembros están obligados a cumplirlas en el marco del comercio internacional y, a su vez, se les animan a que su legislación estándar comercial vaya en paralelo y se aproxime al máximo con la del COI. A nivel mundial, el aceite de oliva como el resto de alimentos se rigen por la normativa del *Codex Alimentarius*, el cual posee una estructura única con respeto a algunas características de pureza y calidad, aunque cada miembro puede voluntariamente adoptar otras características adicionales.

En esta misma línea, las normativas del COI y *Codex Alimentarius*, se implantan en base a un consenso de sus miembros, por lo que se espera que los países miembros las respeten sin aplicar sanciones a quien no lo haga. Por el

contrario, los reglamentos de la UE deben ser aplicados por parte de los países miembros obligatoriamente, existiendo sanciones ante su incumplimiento (Conte et al., 2020).

La legislación más importante a nivel estatal acerca del aceite de oliva puede reflejarse a través de los siguientes decretos:

- ✓ Real Decreto 176/2010, de 17 de diciembre, por el que se modifica el Real Decreto 308/1983, de 25 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles.
- ✓ Real Decreto 227/2008, de 15 de febrero, por el que se establece la normativa básica referente a los paneles de catadores de aceite de oliva virgen.
- ✓ Real Decreto 1466/2009, de 18 de septiembre, por el que se establecen las normas de identidad y pureza de los aditivos alimentarios distintos de los colorantes y edulcorantes utilizados en los productos alimenticios.
- ✓ Real Decreto 640/2015, de 10 de julio, por el que se aprueba la lista de coadyuvantes tecnológicos autorizados para la elaboración de aceites vegetales comestibles y sus criterios de identidad y pureza, y por el que se modifica el Real Decreto 308/1983, de 25 de enero, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de Aceites Vegetales Comestibles.
- ✓ Real Decreto 267/2017, de 17 de marzo, por el que se desarrolla la Ley 6/2015, de 12 de mayo, de Denominaciones de Origen e Indicaciones Geográficas Protegidas de ámbito territorial

supraautonómico, y por el que se desarrolla la Ley 12/2013, de 2 de agosto, de medidas para mejorar el funcionamiento de la cadena alimentaria.

- ✓ Real Decreto 895/2013, de 15 de noviembre, por el que se modifica el Real Decreto 1431/2003, de 21 de noviembre, por el que se establecen determinadas medidas de comercialización en el sector de los aceites de oliva y del aceite de orujo de oliva.
- ✓ Orden AAA/1749/2014, de 18 de septiembre, por la que se extiende el acuerdo de la Organización Interprofesional del Aceite de Oliva Español al conjunto del sector y se fija la aportación económica obligatoria para realizar actividades de promoción del aceite de oliva, mejorar la información y conocimiento sobre las producciones y los mercados y realizar programas de investigación y desarrollo, innovación tecnológica y estudios, durante las campañas 2014/2015 a 2018/2019.
- ✓ Real Decreto 861/2018, de 13 de julio, por el que se establece la normativa básica en materia de declaraciones obligatorias de los sectores del aceite de oliva y las aceitunas de mesa y por el que se modifica el Real Decreto 772/2017, de 28 de julio, por el que se regula el potencial de producción vitícola.
- ✓ Real Decreto 1801/2018, de 3 de noviembre, por el que se establecen normas relativas a las cantidades nominales para productos envasados y al control de su contenido efectivo.

Por otro lado, de entre los reglamentos a nivel europeo para este producto alimentario, el más importante y destacado para el aceite de oliva es:

- ✓ Reglamento (CEE) n.º 2568/1991 de la Comisión, de 11 de julio de 1991, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

Es importante resaltar que este reglamento se ha ido modificando a lo largo de los años, adaptándose con ello a las nuevas metodologías existentes, corrigiéndose y actualizándose ante la aparición de posibles fraudes. De tal modo, la última modificación queda recogida en:

- ✓ Reglamento (CEE) n.º 2095/2016 de la Comisión, de 16 de septiembre de 2016, que modifica el Reglamento (CEE) n.º 2095/2016, relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis.

El resto de reglamentos europeos destacables son:

- ✓ Reglamento (UE) n.º 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios.
- ✓ Reglamento (UE) n.º 1129/2011 de la Comisión de 11 de noviembre de 2011 por el que se modifica el anexo II del Reglamento (CE) n.º 1333/2008 del Parlamento.
- ✓ Reglamento (UE) n.º 1308/2013, del Parlamento Europeo del Consejo, de 17 de diciembre de 2013, por el que se crea la organización común de mercados de los productos agrarios y por el que se derogan los Reglamentos (CEE) n.º 922/72, (CEE) n.º 234/79, (CE) n.º 1037/2001 y (CE) n.º 1234/2007.

- ✓ Reglamento Delegado (UE) n.º 2016/1226 de la Comisión de 4 de mayo de 2016 que modifica el anexo IX del Reglamento (UE) n.º 1308/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo que atañe a las menciones reservadas facultativas para el aceite de oliva.
- ✓ Reglamento (UE) n.º 432/2012 del Parlamento Europeo y del Consejo 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 enfermedades y al desarrollo y la salud de los niños.
- ✓ Reglamento de Ejecución (UE) n.º 29/2012 de la Comisión de 13 de enero de 2012 sobre las normas de comercialización del aceite de oliva.
- ✓ Reglamento (UE) n.º 1096/2018 de la Comisión, de 22 de mayo de 2018, que modifica el Reglamento de Ejecución (UE) n.º 29/2012 sobre las normas de comercialización del aceite de oliva.
- ✓ Reglamento (UE) n.º 696/2014 de la Comisión de 24 de junio de 2014 por el que se modifica el Reglamento (CE) n.º 1881/2006 en lo que respecta al contenido máximo de ácido erúrico en aceites y grasas vegetales y en alimentos que contienen aceites y grasas vegetales.
- ✓ Reglamento (CE) n.º 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios.

A nivel internacional se encuentran la normativa del COI y la referente al *Codex Alimentarius*. Comenzando por este último, como ya se adelantó anteriormente, tiene una única norma con una estructura fija y viene recogida en:

- ✓ CODEX STAN 33–1981, revisada en 2017. “Norma para los aceites de oliva y aceite de orujo de oliva”.

La normativa del COI más importante a tener en cuenta respecto al aceite de oliva es:

- ✓ COI/T.15/NC n.º 3/Rev. 17. November 2021. “Trade standard applying to olive oils and olive pomace oils”.

Además de esta normativa principal y general para el aceite de oliva, el COI recoge otras normativas relacionadas con las diferentes técnicas de análisis y con un correcto análisis sensorial:

- ✓ COI/T.20/Doc. n.º 8/Corr. 1. December 1990. “Determination of tetrachloroethylene in olive oils by gas-liquid chromatography”.
- ✓ COI/T.20/Doc. n.º 11/Rev.4. June 2021. "Determination of stigmastadienes in vegetable oils".
- ✓ COI/T.20/Doc. n.º 19/Rev. 5. 2019. “Spectrophotometric investigation in the ultraviolet”.
- ✓ COI/T.20/Doc. n.º 20/Rev.4. 2017. “Determination of the difference between actual and theoretical content of triacylglycerols with ECN 42”.
- ✓ COI/T.20/Doc. n.º 23/Rev.1. 2017. “Determination of the percentage of 2-glyceryl monopalmitate”.

- ✓ COI/T.20/Doc. n.º 25/Rev.2. 2018. “Method of analysis. Evaluation of the coherence of TAG composition with the fatty acid composition”.
- ✓ COI/T.20/Doc. n.º 26/Rev. 5. June 2020. “Determination of the composition and content of sterol, triterpenic dialcohols and aliphatic alcohol by capillary column gas chromatography”.
- ✓ COI/T.20/Doc. n.º 28/Rev.2. 2017. “Determination of the content of waxes, fatty acid methyl esters and fatty acid ethyl esters by capillary gas chromatography”.
- ✓ COI/T.20/Doc. n.º 29/Rev.1. 2017. “Determination of biophenols in olive oils by HPLC”.
- ✓ COI/T.20/Doc. n.º 33/Rev.1. 2017. “Determination of fatty acid methyl esters by gas chromatography”.
- ✓ COI/T.20/Doc. n.º 34/Rev.1. 2017. “Determination of free fatty acids, cold method”.
- ✓ COI/T.20/Doc. n.º 35/Rev.1. 2017. “Determination of the peroxide value”.
- ✓ COI/T.20/Doc. n.º 36. November 2017. “Determination of the methanol and ethanol content in virgin olive oil”.
- ✓ COI/T.20/Doc. n.º 4/Rev. 1. Septiembre 2007. “Análisis sensorial: vocabulario general básico”.
- ✓ COI/T.20/Doc. n.º 6/Rev. 1. Septiembre 2007. “Guía para la instalación de una sala de cata”.

- ✓ COI/T.20/Doc. n.º 14/Rev. 1. June 2021. “Guide for the selection, training and quality control of virgin olive oil tasters-qualifications of tasters, panel leaders and trainers”.
- ✓ COI/T.20/Doc. n.º 15/Rev. 10. 2018. “Method for the organoleptic assessment of virgin olive oil”.

### 1.1.5. Aceite de Oliva en la Dieta Mediterránea

El interés por lo que conocemos hoy día por “Dieta Mediterránea” (DM) se remonta a la década de 1950. Es en este momento cuando se comenzó a estudiar y comparar la dieta, la alimentación y el estilo de vida que se seguía en los países de la cuenca del Mediterráneo con otros países como por ejemplo EE. UU. Algunos de los resultados de estos estudios mostraron como la incidencia de enfermedades cardíacas, sobre todo enfermedades coronarias, era menor en las zonas rurales del Mediterráneo que en el resto de países estudiados.

La DM es una forma de alimentación que se ha heredado a lo largo de los años y que está constituida por múltiples aportaciones, entre las que destacan las procedentes de los íberos, fenicios, romanos, etc. Está basada en la cocina tradicional y es característica no solo de España sino también del resto de países del mar Mediterráneo. Uno de sus alimentos destacados es el pescado, además de productos vegetales como: frutas, verduras, legumbres, frutos secos, pan, vinagre y vino. También se caracteriza por el bajo consumo de carne roja y el consumo de aceite de oliva como principal fuente de grasas, específicamente de las de tipo monoinsaturado.

Es importante resaltar que solo en los últimos años es cuando realmente se ha entendido la DM como una de las únicas dietas completas y totalmente saludable, con suficientes evidencias científicas sobre sus beneficios para la salud humana. Además de los efectos beneficiosos ante diferentes enfermedades, el



aporte de grasas en la dieta es indispensable para la vida, tiene función energética principalmente, pero también destaca por su función plástica o estructural y por ser imprescindibles para la correcta absorción de algunas vitaminas. Por último, la carencia de estas grasas, puede hacer que aparezcan trastornos de crecimiento en la piel, en el metabolismo o en ciertos órganos potencialmente sensibles.

Existen multitud de regiones en toda la cuenca del Mediterráneo, dando lugar a diferentes formas de preparación de los alimentos y a la utilización de ingredientes y especies de diferente origen, pero siempre teniendo en común el aceite de oliva como principal grasa, habiéndose convertido así en el pilar fundamental de la DM.

Los beneficios únicos que se generan con la DM, tales como la prevención de enfermedades degenerativas y una mayor longevidad, se entienden mejor con ejemplos de estudios científicos recientes. Así Gaforio et al. (2019) recogen las investigaciones más recientes sobre los beneficios del aceite de oliva como grasa casi exclusiva en la dieta, que es lo que caracteriza al área del Mediterráneo, y muestran pruebas sustanciales que indican que el aceite de oliva debería ser la grasa preferida para la salud humana.

Diferentes ensayos clínicos han mostrado como el consumo de aceites de oliva vírgenes está relacionado con un menor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y de minimizar la posibilidad de padecer algunos tipos de cardiopatías. Además, el aceite de oliva permite regular los niveles de lipoproteínas de alta densidad en sangre (HDL) o comúnmente conocido como “colesterol bueno” disminuyendo los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o comúnmente conocido como “colesterol malo” (Guasch-Ferré et al., 2014; Hohmann et al., 2015).

En el marco de un estudio de Prevención con Dieta Mediterránea (PREDIMED), que es un ensayo aleatorio y controlado por grupos con el objetivo

de evaluar el efecto de la DM en la prevención primaria de enfermedades cardiovasculares en España, García-Gavilán et al. (2018), realizaron un estudio complementario donde destacó la relación existente entre el consumo de aceite de oliva virgen y la osteoporosis. Así, se demostró un menor riesgo de fracturas óseas en la población que aportaba aceite de oliva en su dieta diaria.

Por otro lado, algunos polifenoles como el oleocantal, que se encuentra en concentraciones variables en el aceite de oliva virgen extra, tiene actividad antiinflamatoria y neuro-protectora. En diversos estudios se observó como el consumo de aceite de oliva virgen extra provoca una pérdida rápida de la viabilidad de las células cancerosas, induciendo daños en los lisosomas de estas células que provocan toxicidad celular *in vitro* e *in vivo*. (Goren et al., 2019; Siddique et al., 2019). Asimismo, el hidroxitirosol actúa previniendo artritis, enfermedades cardiovasculares y cáncer, también tiene propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias. Los polifenoles como el hidroxitirosol y la oleuropeína son un potente agente antioxidante debido a su actividad de radicales libres junto con la oleuropeína (Calahorra et al., 2020; Zorić et al., 2021). Gallardo-Fernández et al. (2020) mostraron en un estudio la relación entre el consumo de aceite de oliva con la reducción del deterioro cognitivo en las enfermedades neurodegenerativas como en el caso del Parkinson.

Respecto al metabolismo y al microbiota intestinal, seguir la DM basada en el aceite de oliva como principal grasa, en lugar de otras basadas en mantequillas, conlleva mejoras del microbiota, mejorando además el perfil lipídico en sangre y disminuyendo la probabilidad de padecer problemas metabólicos. Otro beneficio reportado por la DM es la reducción del riesgo de padecer diabetes tipo II y Alzheimer (Tzekaki et al., 2021; Visioli et al., 2018).

Otro punto importante a destacar en la DM es el cocinado de alimentos. La tradición culinaria del Mediterráneo es acompañar los alimentos tras su cocción con aceite de oliva virgen extra crudo. Sin embargo, con el objetivo de

hacer más agradables los alimentos, cada vez es mayor el uso del aceite de oliva virgen en la preparación de estos, ya sea asado, ahumado o en fritura. Así mismo es primordial que tras el cocinado, el aceite siga manteniendo su calidad, es decir, su alto contenido en antioxidantes y polifenoles, que además tienen efecto protector para el propio.

Una ventaja más del aceite de oliva frente a otros aceites de semillas o aceites de origen animal es su estabilidad ante temperaturas elevadas durante la fritura o el cocinado. Las grasas sufren autooxidación en presencia de oxígeno atmosférico, que se acentúa cuando se someten a temperaturas elevadas. Este hecho es proporcional al grado de saturación de cada grasa y también a la casual coexistencia de sustancias prooxidantes. En el caso de las grasas animales o de semillas, el proceso de autooxidación que experimentan es rápido. La explicación de este suceso para las grasas animales está en su bajo nivel de insaturación y en su escasez de agentes antioxidantes, mientras que, en el caso de las grasas de semillas, a pesar de tener un importante valor de agentes oxidantes, presenta un elevado grado de insaturación. Todo lo contrario ocurre con el aceite de oliva, que presenta un grado intermedio de insaturación y contiene múltiples sustancias con actividad antioxidante convirtiéndose así, en la mejor opción de grasa estable ante temperaturas elevadas (García Sánchez, 2017).

Finalmente, enfatizar que un aspecto de tendencia moderna de la alimentación es la composición nutracéutica de nuestra dieta, que ha hecho que se mejore de forma general la salud humana. Los nutracéuticos intervienen en los procesos biológicos a través de mecanismos de nutrigenómica e inmunomoduladores, aportando así multitud de beneficios para la salud. En esta misma línea podría concluirse que el aceite de oliva tiene importantes propiedades nutracéuticas gracias a sus ácidos grasos y a sus compuestos fenólicos (Wani et al., 2018).

### 1.1.6. Aceite de Oliva y Color

El aceite de oliva, posee entre otras propiedades fisicoquímicas un color característico propio, pudiendo variar desde el verde intenso al dorado. El color es un atributo que va a depender de la variedad y la madurez de la aceituna. Esta a su vez, como fruto del olivo, va a ir cambiando su color dependiendo del grado de madurez, desde un verde intenso, inicial, a amarillo-verde para finalmente tornarse púrpura y negro. Así, los pigmentos clorofílicos y los carotenoides son los responsables del color verde del fruto y su concentración irá disminuyendo progresivamente durante la maduración. A lo largo de esta aparecerán pequeñas manchas rojizas en la piel, fruto de la síntesis de compuestos tales como las antocianinas, que terminarán pigmentando la pulpa global del fruto cuando invadan el interior. El color natural del aceite viene dado por los niveles de clorofilas y carotenoides, compuestos que se transfieren al aceite de oliva al ser compuestos de naturaleza liposoluble (Gandul-Rojas et al., 2013).

Los pigmentos totales del aceite de oliva se ven afectados durante el proceso de extracción, donde se pierden en mayor cantidad los pigmentos clorofílicos y en menor cantidad los carotenoides. Además, factores agronómicos, tecnológicos o un mal almacenamiento, pueden afectar al perfil final de estos pigmentos por deterioro de los mismos (Gandul-Rojas & Mínguez-Mosquera, 1996).

Es importante resaltar que las clorofilas y los carotenoides en los alimentos se valoran fundamentalmente por su función cromática. Sin embargo, el color, no solo del aceite sino de los alimentos en general, puede influir en la elección de los consumidores a la hora de realizar la cesta de la compra, e incluso puede llegar a relacionarse con los diferentes tratamientos de transformación a los que se han sometido. En esta misma línea, estos compuestos representan algo más que color en la tecnología alimentaria, pudiéndose convertir en indicadores de calidad del producto final. Si, además, se tiene en cuenta su relación con

posibles beneficios para la salud, se entiende el creciente interés por estos compuestos por parte de la comunidad científica.

El color se ha convertido en un atributo con gran protagonismo entre las propiedades más importantes de los alimentos, no solo por su relación con composición química y nutricional, sino también por su gran influencia en las preferencias por parte del consumidor. Así, se han propuesto varias escalas para especificar el color de los aceites de oliva vírgenes en relación con el sistema colorimétrico estándar de la Comisión Internacional de Iluminación (CIE) (Melgosa et al., 2004; M. J. Moyano et al., 1999; Salmerón et al., 2012). Además, en los últimos años se ha impulsado el desarrollo de nuevas técnicas e instrumentación de fácil manejo, al igual que nuevas investigaciones en las que se relaciona las coordenadas colorimétricas y el contenido de pigmentos presentes en el aceite de oliva (Moyano et al., 2008; Moyano et al., 2010).

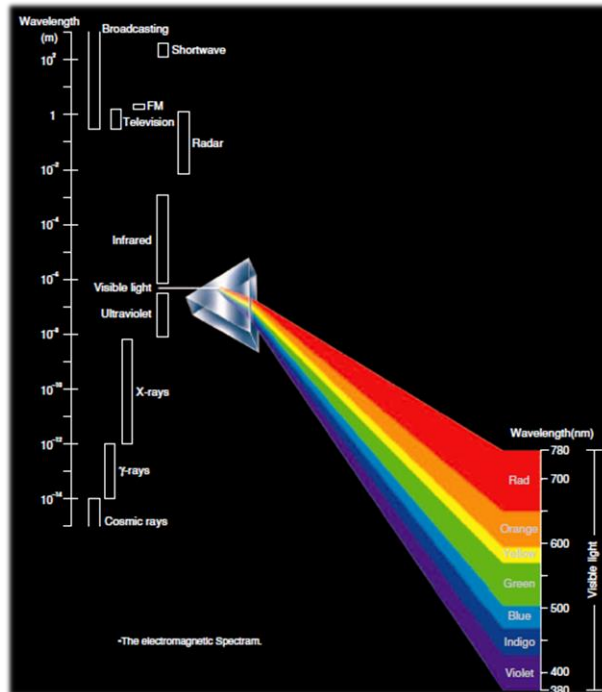
#### *1.1.6.1. Especificación del color*

El color es un atributo de percepción y se debe a una interpretación subjetiva. Las imágenes y el color de las mismas se generan cuando el cerebro interpreta las señales nerviosas de los fotorreceptores de la retina del ojo; a su vez estas son sensibles a las longitudes de onda del espectro electromagnético de la luz. Por tanto, si varias personas observan el mismo objeto, basándose en diferentes referencias y experiencias, pueden percibir el color de forma diferente y, además, van a utilizar palabras muy diferentes para expresarlo.

El color depende de la luz y como consecuencia, de la fuente de la que procede. La radiación electromagnética, comúnmente conocida por luz, está compuesta por distintas longitudes de onda que abarcan desde las ondas de radio y televisión hasta los rayos X. Respecto a la apreciación de color, juega un papel primordial el conjunto de radiaciones que compone el espectro visible (380-780

nm), que además es susceptible de ser captado por el ojo humano generando los diferentes colores (Figura 1.2):

- Azul-Violeta: 380-480 nm
- Verde: 480-560 nm
- Amarillo: 560-590 nm
- Naranja: 590-630 nm
- Rojo: 630-780 nm



**Figura 1.2.** Izquierda: Espectro electromagnético. Derecha: Zona visible del espectro. (Konica Minolta, 2007).

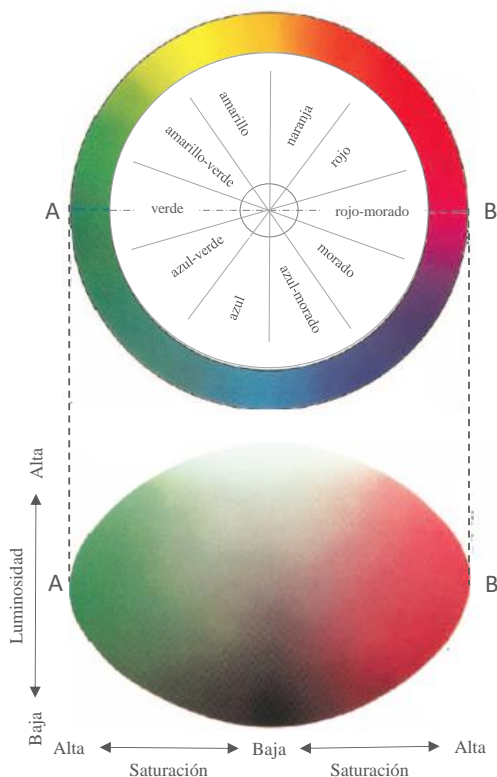
Describir un color de forma precisa es complicado y se convierte en una valoración personal difícil de estandarizar. Sin embargo, si existiera un método estándar para expresar los colores con precisión podrían ser entendidos de forma fluida, exacta y sencilla. Por este mismo motivo se hace esencial utilizar estándares comunes y uniformes, como los observadores patrón propuestos por

la CIE, con el objetivo de tener una especificación universal y rigurosa del color (Limón, 2017).

El punto de partida que la CIE ha tomado para la especificación numérica del color son los llamados valores triestímulo: X, Y, Z. En la definición de estos, participan los tres elementos básicos de la percepción del color, que son: fuente de luz, objeto y sistema visual humano. La determinación del color requiere la distinción de los tres atributos de percepción cromática: tono, luminosidad y saturación.

### Tono

Es el atributo de una percepción visual, según el cual una zona puede parecer similar a un color, rojo, amarillo, verde o azul o a una combinación de estos por pares adyacentes, teniendo en cuenta su posición en un anillo cerrado (Figura 1.3.). En este anillo al que se suele llamar círculo de tonos o rueda de color, aparecen los tonos en el orden en el que vemos estos en el arco iris, en un extremo el azul en el otro el rojo y conectados con colores púrpuras. Un color acromático, es el color percibido que carece de tonalidad o que son neutros, como lo son el negro, el blanco o el gris, colores sin cromaticidad, y un color cromático es la percepción de un color que posee tono.



**Figura 1.3.** Arriba: Círculo de color. Abajo: Cambios de luminosidad y saturación para el rojo-morado y verde (Konica Minolta, 2007).

### Luminosidad

Es el atributo de una percepción visual según el cual una zona parece emitir o reflejar más o menos luz. Los colores pueden separarse en brillantes y oscuros cuando comparamos su claridad o lo brillantes que son. Independientemente del tono la luminosidad se puede medir. En la Figura 1.3., que es una sección transversal de la rueda del color cortada a lo largo de una línea recta entre el punto A y el punto B, la luminosidad aumenta hacia arriba y disminuye hacia abajo.



### Saturación

Es una experiencia perceptiva única e independiente. Este tercer atributo es independiente del tono y de la luminosidad, y, además, es fundamental para la descripción de color. En la Figura 1.3., se observa como la saturación cambia para el rojo-morado y el verde, los colores en el centro son apagados o poco saturados y se vuelven más vivos a medida que nos alejamos de este. Existe bibliografía específica que define aquí tres atributos: “colorido, croma y saturación”, en nuestro caso no vamos a discutir su distinción ya que unos derivan de los otros, y todos son necesarios para la medición y especificación de las diferencias de color (Fairchild, 2013).

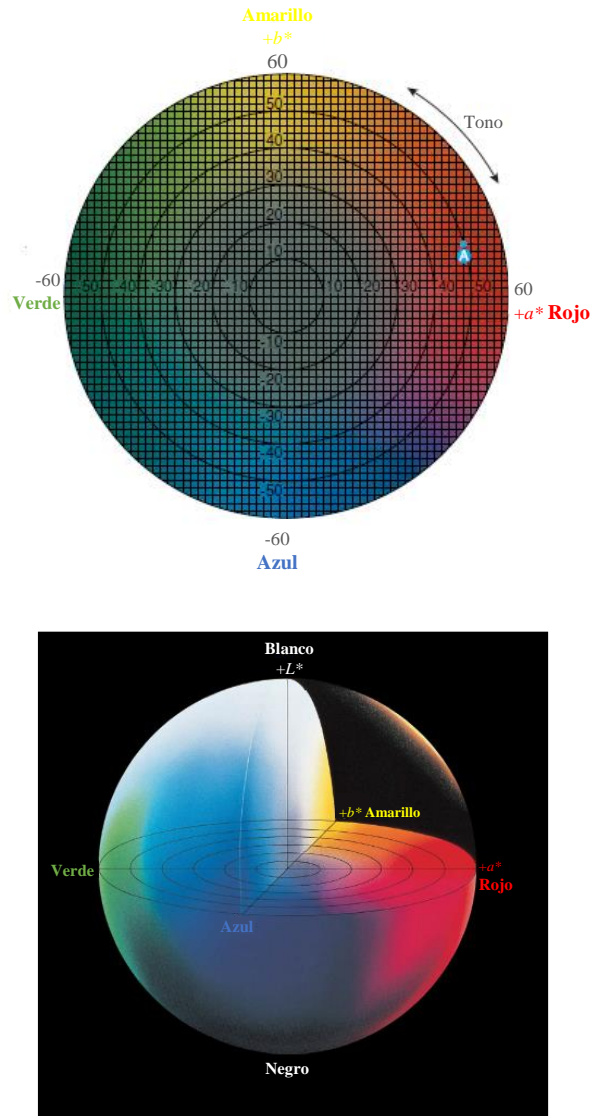
#### *1.1.6.2. Espacio de color*

Un espacio de color consiste en un sistema de especificación numérica del color utilizando 3 números que varían en escalas continuas. Existen dos sistemas CIE creados para estandarizar la expresión del color de forma numérica y además objetiva. Uno de ellos es el sistema Yxy, se creó en 1.931 y está basado en los valores triestímulo XYZ. El otro es el sistema  $L^*a^*b^*$  o también conocido como sistema CIELAB, este se creó en 1.976 para proporcionar diferencias de color más uniformes respecto a las diferencias visuales (Fairchild, 2013). En esta tesis solo se va a comentar el espacio de color CIELAB, que es el que se ha utilizado para hacer las diferentes medidas de color de todas las muestras de aceite de oliva virgen estudiadas, pero destacar, que además de este también podemos encontrar el espacio de color  $L^*C^*h$ , Hunter Lab y CIELUV.

#### Espacio de color $L^*a^*b^*$

El espacio de color  $L^*a^*b^*$  o también conocido como espacio CIELAB, actualmente, es el más utilizado para medir el color de los objetos y, además, se utiliza en prácticamente todos los campos. Este espacio de color surge principalmente para corregir los problemas del espacio de color original Yxy, en

el que no se correspondían las diferencias de color percibidas con las distancias en el diagrama de cromaticidad  $x$ . En este nuevo espacio CIELAB (Figura 1.4.), el parámetro  $L^*$ , es la luminosidad y los parámetros  $a^*$  y  $b^*$ , son las coordenadas de cromaticidad. En la Figura 1.4. se muestra el diagrama de cromaticidad  $a^*b^*$  con un  $L^*$  constante, donde las direcciones del color vienen indicadas por  $a^*$  y  $b^*$ . Las direcciones  $+a^*$  y  $+b^*$  indican las direcciones del rojo y amarillo respectivamente; mientras que las direcciones  $-a^*$  y  $-b^*$ , indican la dirección de verde y azul, respectivamente. El centro del plano que se muestra es acromático y a medida que los valores de  $a^*$  y  $b^*$  van aumentando y nos alejamos del centro, la saturación de color aumenta. Las ecuaciones para determinar los valores de las coordenadas  $a^*$ ,  $b^*$  y  $L^*$ , vienen recogidas en el reglamento del CIE (CIE, 2018), y se obtienen a partir de los valores de  $X$ ,  $Y$ ,  $Z$ .



**Figura 1.4.** Arriba: diagrama de cromaticidad  $a^*b^*$  ( $L^*$  constante). Abajo: Sólido de color para el espacio de color CIELAB (Konica Minolta, 2007).

### Diferencia de color

Una de las ventajas del espacio CIELAB es la simplicidad de cálculo de la diferencia entre dos colores. Esta diferencia entre dos colores cualesquiera del espacio de color es la distancia Euclídea entre sus ubicaciones. La diferencia total

de la que se viene hablando viene dada en términos de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$  y se obtiene mediante la siguiente fórmula (Ecuación 1.1):

$$\Delta E_{ab^*} = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2} \quad \text{Ecuación 1.1}$$

donde,  $\Delta L^*$ ,  $\Delta b^*$  y  $\Delta a^*$ , corresponden a las diferencias en los parámetros de color  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ , respectivamente, entre dos colores. La unidad de diferencia de color ( $\Delta E_{ab^*}$ ), representa una escala uniforme de la diferencia de color. Todos los valores son positivos y un valor mayor representa grandes diferencias de color (Xiao et al., 2013).

## 1.2. Carotenoides

Los carotenoides son una familia de más de 600 pigmentos vegetales liposolubles que generan gran parte del color que podemos ver en la naturaleza. Este conjunto de compuestos, va aumentando progresivamente al identificarse cada año nuevas estructuras. Los carotenoides, no son un grupo más de pigmentos naturales, son compuestos que tienen propiedades muy especiales y notables que prácticamente ningún otro grupo posee. Estos pigmentos liposolubles son biosintetizados por organismos fotosintéticos, por algunos procariontes no fotosintéticos y también por hongos. La mayoría de los animales no pueden biosintetizarlos por lo que son incorporados a través de la dieta.

La principal función de los carotenoides en los alimentos es estética, pero además de esta, los alimentos ricos en estos pigmentos, que son precursores de vitamina A, son considerados beneficiosos en la prevención de una gran variedad de enfermedades humanas, incluyendo cánceres y enfermedades oculares. Estos efectos beneficiosos para la salud, solo se atribuyen a una pequeña parte de los cientos de pigmentos que se encuentran en la naturaleza y que se han aislado y caracterizado. Así, solo algunos de ellos se encuentran en la sangre y tejidos

humanos y solo dos de estos pigmentos se encuentran en la retina y el cristalino del ojo (Krinsky & Johnson, 2005).

Es importante resaltar, que la concentración de los carotenoides en los alimentos va a depender de varios factores como son el genotipo, la precosecha, el estado de madurez del alimento, el procesado y conservación de este, así como los procedimientos de empaquetado y esterilización.

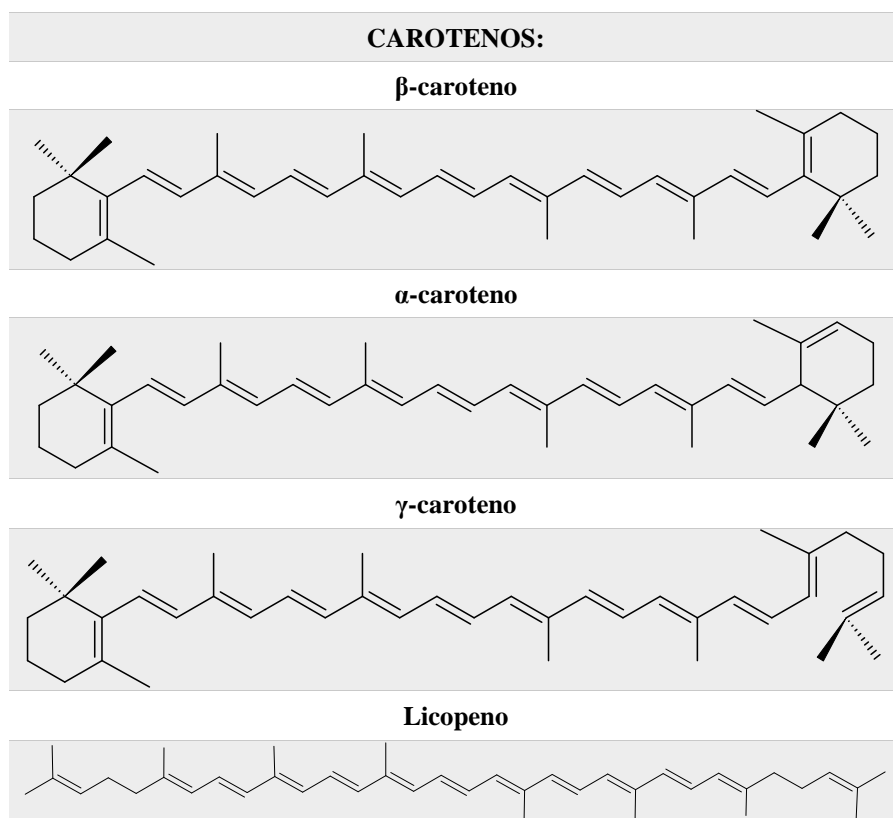
### 1.2.1. Estructura química y clasificación

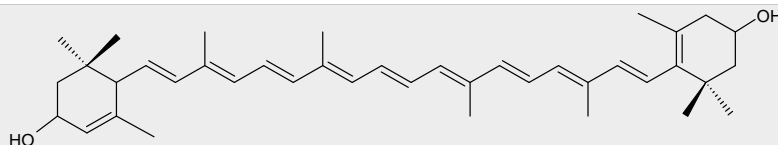
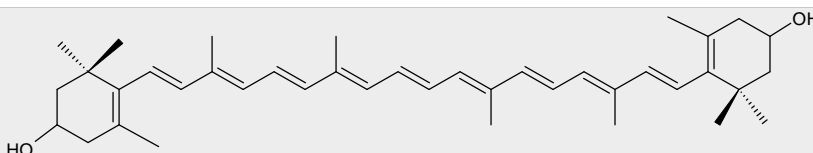
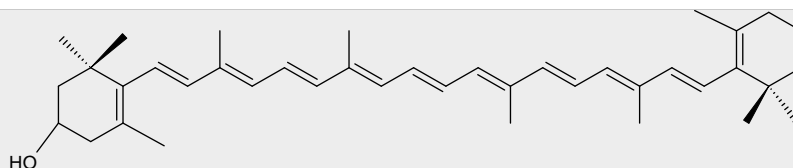
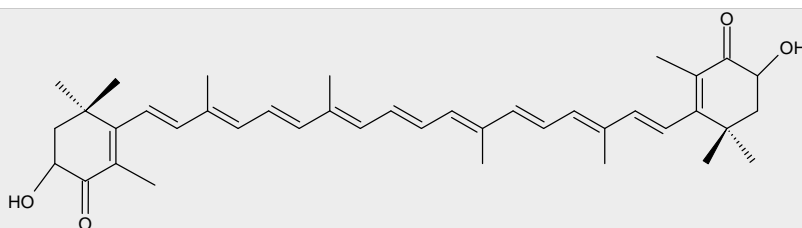
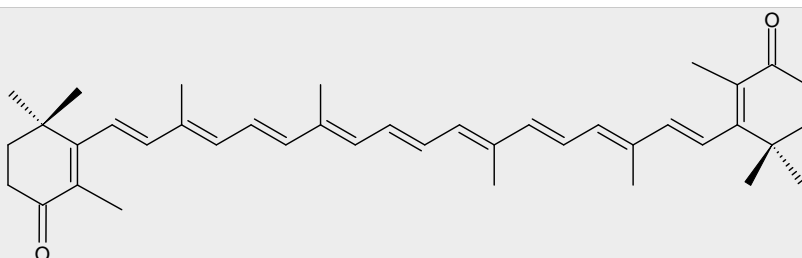
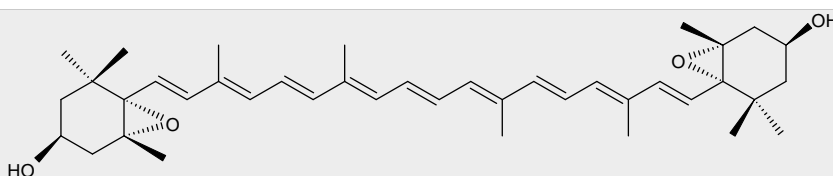
Los carotenoides son tetraterpenos formados por unidades múltiples de isopreno, que poseen en cada extremo un anillo de ciclohexano sustituido e insaturado. La biosíntesis de estos compuestos, parte del isopentenil pirofosfato, que a su vez proviene del ácido mevalónico. Esta cadena de isoprenos tiene su origen en la unión de cuatro unidades de isopentenil pirofosfato, seguido de dos unidades de geranyl-geranyl pirofosfato, obteniéndose así el primer producto de cuarenta átomos de carbono denominado fitoeno. Cuando este producto sufre reacciones de deshidrogenación, da lugar a la formación del licopeno, del cual, se derivan el resto ya sea por reacciones de hidrogenación, ciclación, inserción de oxígeno o migración de dobles enlaces. Respecto a la estabilidad, es importante resaltar que estos isoprenoides son especialmente sensibles al oxígeno, a los metales, a los ácidos y a los peróxidos, así como al calor y a la luz (Carranco Jáuregui et al., 2011).

Todos los carotenoides están formados por variaciones de un esqueleto central, C<sub>40</sub>. Estas cadenas carbonadas largas y con dobles enlaces conjugados pueden estar formadas únicamente por carbonos e hidrógenos, lo que son carotenoides hidrocarbonados y que son denominados carotenos y, por otro lado, estas cadenas carbonadas pueden presentar grupos de oxígeno formando carotenoides oxidados, denominados xantofilas. Los grupos oxigenados en forma de grupos sustituyentes que más se dan en estas últimas son los grupos hidroxí

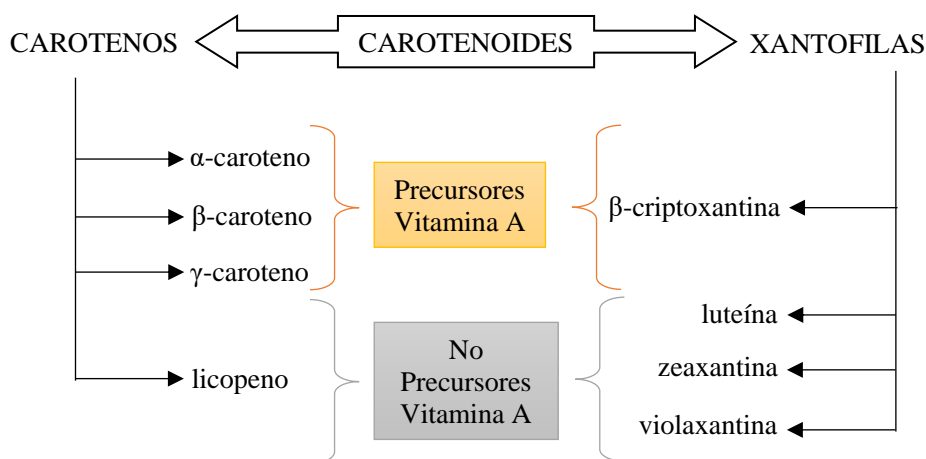
(OH) y epoxi, aunque también podemos encontrar grupos aldehídos (CHO), ceto (C=O), carboxi (CO<sub>2</sub>H), carbometoxi (CO<sub>2</sub>Me) y metoxi (Ome). Así pues, los carotenoides quedan clasificados en dos grupos: carotenos y xantofilas, tal y como se muestra en el esquema representado en la Figura 1.5. Los principales carotenoides que podemos encontrar en los alimentos que constituyen la dieta son:  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno y licopeno, de la familia de los carotenos. Respecto a la familia de las xantofilas: luteína, zeaxantina,  $\beta$ -criptoxantina, astaxantina, cantaxantina y violaxantina. La estructura de los carotenos y las xantofilas principales se muestran en las Tablas 1.3. y 1.4. respectivamente.

**Tabla 1.3.** Estructura química de los principales carotenos.



**Tabla 1.4.** Estructura química de las principales xantofilas.**XANTOFILAS****Luteína****Zeaxantina** **$\beta$ -criptoxantina****Astaxantina****Cantaxantina****Violaxantina**

Teniendo en cuenta las diferentes estructuras de los carotenoides, medio centenar de los que se conocen hasta el momento podrían ser precursores de vitamina A. Los alimentos procedentes de plantas contienen como componente principal  $\beta$ -caroteno. Este caroteno está formado por dos anillos de  $\beta$ -ionona y se le asigna una actividad de provitamina A del 100 %, convirtiéndose así en un carotenoide de especial importancia. Además de este, también se encuentran  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -zeacaroteno,  $\gamma$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina y  $\beta$ -apo-8'-carotenal con aproximadamente una actividad de provitamina A de: 50-54 %, 20-40 %, 50-52 %, 50-60 % y 72 %, respectivamente. Por el contrario, existen otros carotenoides que no son precursores de la vitamina A como las xantofilas, entre las que destacan, la luteína, el licopeno, la astaxantina y la violaxantina (Carranco Jáuregui et al., 2011). Así, la clasificación de los carotenoides basada en su actividad y estructura es la mostrada en la Figura 1.5.



**Figura 1.5.** Clasificación de los carotenoides.

El color de las moléculas de carotenoides viene dado por su característico sistema de dobles enlaces conjugados conocido como cadena poliénica. Esta estructura específica de la molécula que conocemos como cromóforo, es la que le concede la capacidad de absorber luz en la región del visible. Así, esta



estructura capta energía, promocionando electrones a niveles superiores y el resto de energía que no se ha absorbido se refleja y/o se refracta. Esta última es captada por el ojo humano y da lugar al proceso de excitación y transmisión neuronal por el que se interpreta el color.

### 1.2.2. Carotenoides en la Nutrición Humana

Las grandes diferencias que existen respecto a la utilización y metabolismo de los carotenoides presentes entre las distintas especies de animales y humanos, hacen complicada su investigación con animales de laboratorio y mucho más el trasladar estos datos a recomendaciones dietéticas y respuestas fisiológicas.

Los carotenoides como el  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\gamma$ -caroteno y  $\beta$ -criptoxantina, que contienen  $\beta$ -iononina no sustituida, se convierten parcialmente en vitamina A en la mucosa intestinal y otros tejidos. Algunos animales como las vacas pueden absorber solo carotenos, en el caso de los carnívoros son prácticamente incapaces de absorber ningún carotenoide, excepto que se alimenten con grandes dosis farmacológicas. Algo peculiar ocurre con las ratas y ratones, los cuales absorben los carotenoides provitamina A, haciendo difícil encontrarla en su sangre o tejidos. Por último, encontramos a las aves, que utilizan los carotenoides provitamina A, los hidroxicarotenoides polares y los cetocarotenoides para crear los característicos pigmentos que dan color a sus plumas y piel (Phyllis et al., 2015).

Para el ser humano la principal fuente de carotenoides son las frutas y las verduras, aunque hay otros productos vegetales como las legumbres, los cereales o incluso el aceite; algas o alimentos de origen animal que también los contienen (Dias et al., 2018). Respecto a este último grupo de alimentos, los carotenoides se encuentran principalmente en las yemas del huevo, los tejidos de las aves de corral, la leche, el hígado y los tejidos adiposos de los mamíferos domésticos

(ganado vacuno, caballos, ovejas y cabras), además de en la carne de algunos pescados, como el salmón. Es importante resaltar también, que la dieta puede ser complementada con suplementos nutricionales y alimentos funcionales (Abe-Matsumoto et al., 2018).

El ser humano solo tiene acceso a alrededor de unos 50 carotenoides atendiendo a los productos alimenticios habituales que están presentes en la dieta. A pesar de ello, en el plasma sanguíneo humano los carotenoides se reducen a solo unos pocos:  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, licopeno, zeaxantina y luteína; así como también fitoeno y fitoflueno, carotenoides olvidados por su falta de color (Meléndez-Martínez et al., 2020).

Existe multitud de bases de datos y revisiones científicas donde se determinan la cantidad de carotenoides en los alimentos que componen nuestra dieta. Es difícil obtener concentraciones exactas de estos compuestos en nuestros alimentos diarios debido a la influencia de varios factores. En Tabla 1.5 se han recogido las principales fuentes de los carotenoides nutricionalmente importantes; solo se han presentado los alimentos que contienen más de 0,5 mg de carotenoide/100 g de alimento (Britton & Khachik, 2009; Phyllis et al., 2015).

**Tabla 1.5.** Principales alimentos ricos en carotenoides.

| <b>Fuente de alimentos ricos en carotenoides</b> |                  |                         |
|--|------------------|-------------------------|
| <b><math>\beta</math>-Caroteno</b>               |                  |                         |
| Albaricoque                                      | Zanahoria        | Mango                   |
| Brócoli  | Burití           | Melocotón               |
| Col de Bruselas                                  | Espinacas        | Batatas                 |
| Aceite de palma                                  | Pimiento verde   |                         |
| Pimiento rojo                                    | Pimiento naranja |                         |
| <b><math>\beta</math>-Criptoxantina</b>          |                  |                         |
| Caqui  | Mandarina        | Tomate                  |
| Calabaza   | Naranja          | Papaya                  |
| <b>Luteína</b>                                   |                  |                         |
| Brócoli  | Yema de huevo    | Vegetales de hoja verde |
| Pimiento amarillo                                | Calabaza         | Pimiento verde          |
| <b>Licopeno</b>                                  |                  |                         |
| Zanahoria  | Pomelo           | Guayaba                 |
| Papaya roja                                      | Caqui            | Tomate                  |
| Sandía   |                  |                         |
| <b>Zeaxantina</b>                                |                  |                         |
| Pimiento naranja                                 | Caqui            | Maíz dulce              |
| Pimiento rojo                                    | Calabaza         |                         |

Por tanto, es importante conocer la cantidad de carotenoides de los alimentos que ingerimos, o en su caso conocer que alimento es rico en estos. Sin embargo, también, hay que tener en cuenta el balance entre el contenido y la biodisponibilidad. Es decir, es importante no solo el estudio de la eficacia de digestión del alimento, sino también cómo los carotenoides se liberan, solubilizan, absorben, se transportan y se metabolizan.

Si se comparan las frutas y verduras frescas con las que encontramos enlatadas, cocidas o secas, estas últimas contienen más carotenoides por unidad de peso que las primeras. Este hecho se debe principalmente a la deshidratación que sufren durante ese tipo de tratamientos, aunque es cierto que el procesado de

estos alimentos a altas temperaturas puede conllevar también ciertas pérdidas en carotenoides.

La biodisponibilidad de los carotenoides puede verse afectada por varios factores, principalmente por la matriz del alimento, la localización de estos compuestos en la fuente individual de alimento, el efecto del procesado, así como, factores humanos como por ejemplo la edad o el estado de salud (Haskell, 2012).

El procesado de los alimentos juega un papel importante en la biodisponibilidad de los carotenoides. El picado, la cocción, el enlatado o la preparación de purés, libera estos compuestos de la matriz alimentaria, facilitando así su ingesta en el intestino. Igualmente, al ser pigmentos liposolubles, la presencia de grasa en la propia comida ayuda a su absorción (Brown et al., 2004). En este mismo contexto, los aderezos en las ensaladas, las salsas, los platos mixtos como sopas, guisos o estofados son excelentes vehículos de los carotenoides, incluso mejores que los propios productos crudos. En resumen, fuentes animales de carotenoides, como leche, mantequilla, queso e hígado de vacuno son excelentes suministradores de  $\beta$ -caroteno biodisponible, o huevos, grasa de pollo, hígado y piel, de luteína y zeaxantina.

Por otro lado, tratamientos tales como cortar, desmenuzar o trocear las frutas y verduras provocan la desaparición de las “barreras físicas” que normalmente mantienen separados a los carotenoides y a las enzimas oxidantes, aumentando la exposición al oxígeno. Del mismo modo, cuando los alimentos son almacenados, procesados o cocinados, se producen grandes pérdidas de carotenoides causadas por una exposición prolongada al aire, la luz fuerte, temperaturas altas o por el ácido. Existen formas de cocinado que influyen de forma diferente. Así, una ebullición prolongada del alimento o la fritura del mismo provocan grandes cambios en los carotenoides. También son muy perjudiciales el horneado o el encurtido. Sin embargo, hay otros métodos como hervir durante poco tiempo, el salteado o el uso de microondas, que no conllevan

cambios tan radicales en el contenido de estos compuestos. En cualquier caso, un tratamiento térmico de forma prolongada puede provocar la isomerización y la oxidación de los carotenoides.

Estas pérdidas o cambios en los carotenoides deben compensarse a través de la mejora en la biodisponibilidad de los mismos, tras la alteración estructural producida al procesar el alimento (Canene-Adams & Erdman Jr., 2009).

### 1.2.3. Importancia de los carotenoides en la salud

La ingesta elevada de carotenoides está asociada con diversos beneficios para la salud, entre los que encontramos, mejoras en las funciones del sistema inmunitario y un menor riesgo de desarrollar enfermedades crónicas degenerativas, como lo son la degeneración macular asociada a la edad (DMAE), la diabetes de tipo II, la obesidad, algunos cánceres como el de mama, de cuello de útero, de ovarios y colorrectal y enfermedades cardiovasculares, entre otras. Además, los carotenoides van ganando interés como promotores en la mejora de funciones cognitivas, así como fotoprotectores de la piel.

Uno de los principales focos en los que se centra el interés por los carotenoides desde un punto de vista nutricional y fisiológico, es en la actividad provitamina A. Los carotenoides provitamina A que se absorben pasan a formar retinal que se reduce rápidamente a retinol. Una oxidación irreversible del retinol da lugar a ácido retinoico, que promueve las funciones de la vitamina A, fundamental en el crecimiento y desarrollo (Von Lintig, 2012). La deficiencia de esta vitamina de forma persistente, puede provocar xeroftalmia que supone ceguera prevenible pero irreversible en niños pequeños. La xeroftalmia facilita la aparición de enfermedades infecciosas como el sarampión, diarrea y parásitos intestinales, provocando un aumento del riesgo de mortalidad infantil en países donde hay especial deficiencia de vitamina A (Sommer, 2008).

Algunos de los inhibidores del oxígeno singlete en la naturaleza son los carotenos y las xantofilas. La presencia de oxígeno singlete puede desencadenar daños en el ADN, en las proteínas y en los lípidos. El exceso de energía de este oxígeno singlete, es absorbido por los carotenoides y disipado en forma de calor. Algunos carotenos como el  $\beta$ -caroteno y el licopeno, están orientados entre las bicapas lipídicas y alteran en menor medida la estructura de los fosfolípidos, permitiendo una mayor penetración de pequeñas moléculas. La luteína y la zeaxantina, son las xantofilas que se orientan a través de las membranas debido a la presencia de grupos hidroxilos hidrófilos en su estructura. La ubicación y la orientación de estos carotenoides pueden influir en su capacidad como antioxidantes (Gruszecki, 2010). Los procesos de estrés oxidativo e inflamatorio se producen de forma conjunta. Diversos estudios en humanos han relacionado niveles bajos de carotenoides en dieta y/o en sangre con el aumento de los marcadores de estrés oxidativo e inflamación (D'Adamo et al., 2012; Holt et al., 2009). El estrés oxidativo es un desequilibrio que resulta de una producción excesiva de especies oxidativas reactivas, que supera la capacidad de defenderse de los antioxidantes celulares. Este estrés puede desencadenar otras respuestas fisiológicas a nivel celular o tisular que pueden llegar a ser perjudiciales y provocar pérdidas funcionales o incluso la muerte de las células o determinados tejidos. Así mismo, este estrés oxidativo puede activar ciertos factores de transcripción y afectar a la expresión de más de 500 genes, entre los que se incluyen, los genes de los factores de crecimiento, las moléculas que regulan el ciclo celular o las citoquinas inflamatorias que pueden provocar una inflamación crónica (Wen et al., 2013).

Las propiedades antioxidantes de los carotenoides, ayudan a prevenir el avance rápido de enfermedades crónicas como la obesidad y el síndrome metabólico, que incluye hipertensión arterial, hiperglucemia y niveles bajos de colesterol HDL, entre otras. De este modo, pueden reducir las altas tasas de morbilidad y mortalidad, que tienen relación directa con todas estas afecciones.

Estudios epidemiológicos en los que se ha controlado la ingesta dietética, el suero y los niveles de tejido adiposo, han permitido relacionar los carotenoides con enfermedades cardiovasculares. Algunos de estos estudios mostraron como altos niveles de  $\beta$ -caroteno se relacionaban con un menor riesgo de sufrir infarto de miocardio o incluso una leve disminución de riesgo de ictus (Voutilainen et al., 2006).

En el ensayo Alfa-Tocoferol Beta-Caroteno (ATBC) en el que se incluyó a 29.000 participantes, se estudió el efecto del  $\beta$ -caroteno con respecto al riesgo de padecer cáncer (ATBC prevention study group, 1994). Estos participantes recibieron un suplemento diario combinado con otros micronutrientes durante 5-8 años. Igualmente, otro ensayo similar, Eficacia de Caroteno y Retinol (CARET), incluyó a 18.000 participantes y recibieron un suplemento diario durante 4 años (Omenn et al., 1996). Ambas investigaciones concluyeron afirmaciones contrarias a un estudio médico basado en 22.000 varones, no fumadores (Hennekens et al., 1996). Este último coincide con las conclusiones obtenidas del ensayo chino Lixian con 30.000 mujeres y hombres, mayoritariamente no fumadores (Blot et al., 1995), en el que se afirmaban los efectos preventivos para cáncer de estómago. Otro aspecto que es importante destacar es la forma de administración de los carotenoides. Así, si se realiza a través de suplemento o en matriz alimentaria, la duración del tratamiento y la combinación con otros nutrientes es fundamental, pero también lo es, factores individuales de los participantes como si están sanos o sufren alguna patología y su estado nutricional global.

De entre los carotenoides que no tienen actividad provitamina A, la luteína y la zeaxantina, merecen una atención particular. Estas moléculas se acumulan preferentemente en la retina, junto con la meso-zeaxantina, mejorando la salud ocular. Estas xantofilas conocidas como carotenoides maculares o colectivamente como pigmento macular, son especialmente beneficiosas para la

salud ocular debido a su funcionamiento como filtro de luz azul y como antioxidantes, que protegen la retina del daño oxidativo inducido por la luz (Mares, 2016). De igual forma, los carotenoides incoloros: fitoeno y fitoflueno, absorben al máximo en la región UV, protegiendo la piel de posibles daños que se producen por este tipo de radiación de alta energía (280-400 nm) (Meléndez-Martínez et al., 2018). Estas xantofilas también destacan en su actuación como antioxidantes, ya que están presentes en las regiones perifoveal y periférica de la retina, zonas expuestas a altas concentraciones de oxígeno y con altas tasas de metabolismo. Cada vez son más numerosas las publicaciones que relacionan significativamente altas concentraciones de este pigmento macular en tejidos oculares, suero y plasma con una posible reducción del riesgo de padecer DMAE (Bernstein et al., 2016; Bone & Landrum, 2010; Carpentier et al., 2009; Hammond & Fletcher, 2012; Ma et al., 2012). Esta enfermedad es la principal causa de ceguera en las personas mayores de países occidentales, comienza en la macula con depósitos amarillos, tal y como se muestra en la Figura 1.6., dadas por la falta de xantofilas junto con otras anomalías de pigmentación. La naturaleza de esta enfermedad hace complicada la interpretación de estudios epidemiológicos y ensayos clínicos.



**Figura 1.6.** Diferentes etapas en la evolución de la DMAE en la retina. De izquierda a derecha se muestra la evolución de la enfermedad desde una retina sana hasta una retina dañada irreversiblemente. Imágenes tomadas de: <https://medialibrary.nei.nih.gov>

A pesar de la existencia de estudios que manifiestan controversias sobre si el suplemento de carotenoides a largo plazo puede prevenir ciertas patologías en individuos susceptibles, no habría que descartar la posibilidad de que a largo



plazo una dieta rica en frutas y verduras, que incluya xantofilas y otros carotenoides, pueda ralentizar la progresión de algunas enfermedades como las mencionadas anteriormente. La demostración del efecto del aporte de carotenoides es bastante difícil y laborioso debido a la complejidad de la fisiología humana, a la variabilidad de la dieta, a la influencia de factores ambientales y a las limitaciones en los estudios realizados a la hora de evaluar acciones biológicas y resultados respecto a la salud.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha definido recomendaciones de ingestas diarias seguras de carotenoides, incluyendo para algunos de ellos la ingesta diaria aceptable, (ADI). Por ejemplo, para la luteína que procede de *Tagetes erecta*, que se utiliza como aditivo, su ADI está estimada en 1 mg/kg de peso corporal al día (EFSA, 2010). Igualmente para el licopeno como aditivo, es 0,5 mg/kg de peso corporal al día (EFSA, 2008). Respecto a carotenos mixtos y/o  $\beta$ -caroteno, se considera un consumo seguro por debajo de 15 mg/kg al día (EFSA, 2012a). Ingesta de 0,75 mg/kg de peso corporal al día de zeaxantina, también se ha corroborado que se considera un consumo seguro (EFSA, 2012b). Por lo tanto, se puede concluir que la ingesta de grandes cantidades de carotenoides, que significa una ingesta mucho mayor a la ingesta normal dietética, es segura. Esta ingesta se mueve en unos rangos diferentes para cada carotenoide como se muestra en la Tabla 1.6. En cualquier caso y como se ha comentado con anterioridad, las recomendaciones sobre la ingesta de carotenoides en la dieta pueden verse afectadas por el hecho de que la biodisponibilidad de los carotenoides depende de otros factores relacionados directamente con las dietas y el huésped, que además pueden conllevar a diferencias en la absorción y en el metabolismo entre individuos, y también, por la escasa información existente sobre conversiones metabólicas de los carotenoides.

**Tabla 1.6.** Rangos de consumo diario de carotenoides (Meléndez-Martínez, 2019; Rodríguez-Concepcion et al., 2018).

| <b>Carotenoide</b>     | <b>Rango de ingesta diaria (mg)</b> |
|------------------------|-------------------------------------|
| $\alpha$ -Caroteno     | 0,16-2,43                           |
| $\beta$ -Caroteno      | 0,92-8,80                           |
| $\beta$ -Criptoxantina | 0,04-1,36                           |
| Luteína + Zeaxantina   | 0,83-4,11                           |
| Licopeno               | 0,83-9,43                           |
| Fitoeno                | 2,00                                |
| Fitoflueno             | 0,70                                |

#### 1.2.4. Métodos de extracción y análisis

Los dobles enlaces conjugados que hacen tan característicos a los carotenoides por su color, también los hace susceptibles de degradarse y de isomerización ante la exposición a la luz, a altas temperaturas, al oxígeno y a los ácidos. Consecuentemente, para minimizar al máximo la pérdida de estos compuestos en su extracción, análisis y determinación, durante la preparación de la muestra se debe tener precaución y protegerlos de la luz, del calor y del oxígeno, además de trabajar con ellos a temperatura ambiente o por debajo, empleando disolventes no polares como lo son el éter de petróleo o el hexano.

El procedimiento para la determinación de los carotenoides presentes en diferentes matrices alimenticias se puede dividir en varias etapas: preparación de la muestra, extracción y saponificación; seguidos de separación, identificación y cuantificación de los carotenoides. Destacar que, en la preparación de las muestras, se deben extraer las partes más representativas de estos y congelarlos en nitrógeno líquido para detener las reacciones metabólicas antes de la liofilización. Si fuera necesario el almacenamiento de estos hasta el análisis, debe realizarse en un congelador, preferiblemente a  $-40^{\circ}\text{C}$ , a vacío o en atmósfera inerte (Meléndez-Martínez et al., 2020).

Tradicionalmente se ha usado la cromatografía en columna para extracción de estos compuestos bioactivos. Con esta técnica se aislaban y purificaban estos compuestos, con la gran desventaja de que se desarrollaba con exposición a la luz y al aire de una forma descontrolada, y consecuentemente no había una reproducibilidad en el método. A este inconveniente se suma la obtención de pequeñas cantidades de muestra, igual que ocurre con la metodología de cromatografía en capa fina, también utilizada para la separación de carotenoides. En esta última, adicionalmente, se produce la oxidación e isomerización de la muestra, debido a la presencia de oxígeno y de sílice durante su desarrollo. Por todo esto, son necesarias otras técnicas con condiciones controladas, que utilicen menor cantidad de extracto y sean más rápidas. Otras técnicas destacadas son: extracción asistida por ultrasonidos, extracción asistida por microondas, extracción asistida por enzimas, extracción de líquidos a presión o extracción acelerada con disolventes y extracción con fluidos supercríticos. Actualmente la técnica que mejor se adapta a las condiciones controladas, cantidad de muestra, rapidez, etc., es la extracción líquido-líquido (Saini & Keum, 2018; Xu et al., 2017).

Otro aspecto importante a tener en cuenta es el disolvente que se utiliza. El disolvente o la combinación óptima de disolventes va a depender de la complejidad de la matriz alimentaria y de la polaridad de los carotenoides, si son carotenos o xantofilas. Durante años los disolventes que se han venido utilizando han sido, mayoritariamente: acetona, tetrahidrofurano, éter de petróleo, éter dietílico, cloroformo, hexano, acetato de etilo y etanol. Durante la extracción y con idea de proteger de la oxidación los carotenoides, es recomendable adicionar antioxidantes, siendo el más usado el butilhidroxitolueno (BHT) (Amorim-Carrilho et al., 2014). Tras la extracción es importante la etapa de saponificación alcalina, en la cual, componentes indeseados como las clorofilas, triacilgliceroles, ésteres de xantofilas, entre otros, se van a eliminar. De este modo se evitan posibles interferencias en la separación, detección y cuantificación.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica que se viene utilizando en cuanto a separación de carotenoides. La fase estacionaria más común suele ser la constituida por columnas C18, que posteriormente se sustituyeron por columnas de fase reversa C30. Estas últimas resultaron tener mayor poder de separación de isómeros de carotenoides, debido a mayores interacciones hidrofóbicas en comparación con las C18. La identificación de estos compuestos parte de los primeros datos que se obtienen a partir de su comportamiento cromatográfico y del espectro de absorción de UV-Vis. A raíz de estos se obtendrá información como: la longitud de onda de máxima absorción y la forma del espectro, principales características del cromóforo representativo de los carotenoides (Rodríguez-Amaya & Kimura, 2004).

Se vienen utilizando diversas técnicas basadas en la cromatografía líquida, acopladas a un detector de fotodiodo array o UV-Vis. Con estos sistemas es imposible proporcionar información para la identificación sobre la estructura molecular en casos de carotenoides desconocidos y en matrices de muestras complejas. Por este motivo, muchos investigadores han complementado la identificación de carotenoides con otros detectores como la espectroscopía de masas (MS). Con estas se puede obtener información sobre la estructura molecular a partir de la masa molecular y el patrón de fragmentación en tándem de MS (MS/MS y MS/MS/MS).

Así, se han utilizado varios métodos para la ionización de carotenoides, entre los que destacan, impacto de electrones (EI), bombardeo rápido de átomos (FAB), desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), ionización por electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización a presión atmosférica (APPI) y la sonda de análisis de sólidos atmosféricos (ASAP) (Cacciola et al., 2012).

Las técnicas más utilizadas para el estudio de carotenoides son cromatografía líquida (LC) acoplada a ESI y acoplada a APCI. Esta última es una

técnica excelente de ionización para los pigmentos no polares y de carácter lipofílico como los carotenoides, mientras que la primera, ESI, es la más adecuada para compuestos polares. Varios autores han utilizado métodos LC-PDA-APCI-MS para analizar e identificar una amplia gama de compuestos carotenoides en diferentes matrices. Para la determinación de estructuras de los carotenoides, son importantes la MS y la resonancia magnética nuclear (RMN). Estas se utilizan en combinación con otras técnicas de separación, como por ejemplo: cromatografía de líquido acoplada a resonancia magnética nuclear (LC-NMR), cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), cromatografía de líquido acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) y electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masa (CE-MS) (Amorim-Carrilho et al., 2014; Singh et al., 2015).

### **1.3. Alimentos funcionales**

La nutrición adecuada que tradicionalmente se conoce es aquella que tiene como principal objetivo el aporte de los nutrientes necesarios para el correcto funcionamiento del organismo y para el mantenimiento de las necesidades tanto metabólicas como fisiológicas del mismo. Una dieta sana, variada y equilibrada debe suministrar los nutrientes necesarios para satisfacer las necesidades básicas y con ellos favorecer el mantenimiento de una buena salud. Este concepto tradicional que conocemos, está cambiando en los últimos años por el término de nutrición óptima. Este último, implica que ciertos alimentos, además de suministrar energía y nutrientes, promuevan una mejoría en nuestra salud y, además, sean capaces de reducir el riesgo de desarrollar ciertas enfermedades.

La vida actual, su ritmo acelerado, determinados hábitos de alimentación que se van adquiriendo, la falta de tiempo para cocinar, la gran oferta alimentaria, entre otros aspectos, nos conducen a no seguir una alimentación equilibrada y

con ello a no ingerir los nutrientes necesarios para cubrir las necesidades nutricionales y cantidades adecuadas para nuestra salud. Por ello, existen profesionales de la salud e investigadores que se centran en identificar qué alimentos pueden mejorar la salud y pueden conducirnos a reducir el riesgo de padecer algunas enfermedades como lo son las cardiovasculares o diferentes tipos de cáncer.

En este sentido, surge una nueva línea de investigación científica, que dentro de la industria alimentaria está cogiendo cada vez más fuerza, la ciencia de los Alimentos Funcionales, que llega a representar el área de mayor crecimiento y cuyo gran potencial está comenzando a ganar fuerza en el área comercial (Barberá Mateos & Marcos, 2007).

Son numerosas las investigaciones existentes que subrayan cómo los alimentos funcionales compensan las deficiencias y desequilibrios alimentarios y además cómo algunos de sus ingredientes naturales aportan beneficios y previenen enfermedades. Los alimentos funcionales consisten en compuestos biológicamente activos que son capaces de proporcionar beneficios para la salud más allá de sus propias capacidades nutricionales básicas. Los compuestos bioactivos, son los componentes de estos alimentos, a los que se han considerado responsables de su funcionalidad. Además, son derivados de plantas, animales u otras fuentes como son los microorganismos. Estos compuestos tienen la habilidad de interactuar con uno o más componentes del tejido vivo, proporcionando una serie de efectos positivos, entre los que destacan su actividad biológica, actuando como compuestos antioxidantes, antiinflamatorio, antidiabético, anticancerígeno, antivirales y antitumorales (Banwo et al., 2021; Fu et al., 2022; Guaadaoui et al., 2014; Konstantinidi & Koutelidakis, 2019).

### 1.3.1. Definición

Japón, en 1991, fue de los primeros países que reguló los complementos alimenticios, utilizando para ello el término FOSHU (Foods for Specified Health Use), que podría ser traducido por “alimentos para uso específico de salud”, que más tarde dio lugar al concepto que hoy conocemos como alimento funcional (Reque & Brandelli, 2021). El concepto alimento funcional tiene múltiples definiciones y aún no ha sido definido oficialmente por la legislación europea. No obstante, el Consejo Internacional de Información sobre Alimentos (IFIC), define estos alimentos como: “todo alimento semejante en apariencia física al alimento convencional, consumido como parte de la dieta diaria, pero capaz de producir demostrados efectos metabólicos o fisiológicos, útiles en el mantenimiento de la buena salud física y mental, en la reducción del riesgo de enfermedades crónico-degenerativas, además de sus funciones nutricionales básicas”. Otros organismos como el Instituto Internacional de Ciencias de la Vida en Europa (ILSI), también trabajan para una mayor aceptación de estos alimentos, definiendo, en el proyecto FUFOSSE (Functional Food Science in Europe), como un alimento funcional puede considerarse (Barberá Mateos & Marcos, 2007; Luengo Fernández, 2007):

- Alimento natural.
- Alimento al que se añade o al que se elimina algún componente mediante biotecnología o algún método tecnológico.
- Alimento al que se varía la naturaleza de alguno de sus componentes.
- Alimento al que se modifica la biodisponibilidad de alguno de sus componentes.
- Cualquier combinación de las opciones anteriores.

Además, como ya se ha comentado con anterioridad, para el ILSI, un alimento se considerará funcional si se demuestra satisfactoriamente que es beneficioso para alguna de las funciones específicas de nuestro organismo, proporcionando así mejoras en la salud, en el bienestar y reduciendo el riesgo de padecer enfermedades.

Es importante, destacar las condiciones que debe cumplir un alimento para que sea funcional (Schneider, 2001):

- Debe tener una naturaleza alimentaria, no puede consistir en una cápsula, comprimido o polvo.
- Debe consumirse como parte de la dieta diaria.
- Debe tener una función específica en el cuerpo humano como:
  - Mejorar los mecanismos de defensa biológica.
  - Prevenir el riesgo de padecer algunas enfermedades.
  - Recuperar de alguna enfermedad.
  - Controlar las condiciones físicas y también mentales.
  - Ralentizar el proceso de envejecimiento.
- Deben existir pruebas científicas de su efecto.
- Se tiene que definir a que grupos de la población está dirigido.

Finalmente, algunos ejemplos de alimentos funcionales son:

- Leches enriquecidas en:
  - Calcio; previene la osteoporosis y ayuda al desarrollo de huesos y dientes.



- Vitaminas A y D; ayuda en la actividad visual y en la absorción de calcio.
- Ácido oleico; participa en la reducción del colesterol en sangre, así como a reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares.
- Zumos enriquecidos en:
  - Vitaminas A y D; ayuda en la actividad visual y en la absorción de calcio.
  - Calcio; previene la osteoporosis y ayuda al desarrollo de huesos y dientes.
  - Hierro; ayuda al transporte de oxígeno en sangre y a prevenir anemias.
- Yogures enriquecidos en:
  - Vitaminas A y D; ayuda en la actividad visual y en la absorción de calcio.
  - Calcio; previene la osteoporosis y ayuda al desarrollo de huesos y dientes.
- Margarinas enriquecidas en:
  - Esteres de esteroides y estanoles de origen vegetal; reduce los niveles de LDL, así como el riesgo de cardiopatía isquémica y enfermedades cardiovasculares.
- Huevos enriquecidos:

- Ácidos grasos esenciales  $\Omega$ -3; ayuda a regular la hipertensión, así como a regular los parámetros lipídicos.

### 1.3.2. Otros conceptos relacionados

Existen otros conceptos como alimento fortificado o nutraceuticos con los que no hay que confundir el término de alimento funcional.

A diferencia de alimento funcional, un nutracéutico no tiene que ser un alimento de consumo diario que forma parte de nuestra dieta, sino, que se toma esporádicamente o durante un tiempo, principalmente porque contiene un componente o nutriente específico que vamos buscando consumir o del que necesitamos aumentar su consumo. Por lo tanto, se puede decir que es un suplemento dietético que se presenta en una matriz farmacéutica como cápsulas, píldoras o en suspensiones. Este suplemento consiste en un concentrado de una sustancia natural bioactiva que está presente en los alimentos. Al ingerir estos nutraceuticos se alcanzan ingestas de esta sustancia bioactiva mucho mayor que si se toma el alimento que la contiene. El uso de los nutraceuticos ayuda a alcanzar dosis favorables en cuanto a efectos beneficiosos para la salud que no se alcanzarían al tomar el alimento de forma natural en nuestra dieta. Destacar también que el origen biológico natural de los nutraceuticos es la principal diferencia que hace que estos no sean igual a los medicamentos o fármacos, los cuales se obtienen mediante síntesis y además no son considerados como alimentos (Coppens et al., 2006; Télessy, 2019).

El carácter terapéutico de los nutraceuticos es aquello que lo diferencia de los complementos alimenticios. Estos se definen según el artículo 2 de la Directiva 2002/46/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 10 de junio de 2002, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de complementos alimenticios (Directiva 2002/46/CE), como:

“productos alimenticios cuyo fin es completar la dieta normal y consistentes en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados en forma dosificada, es decir cápsulas, pastillas, tabletas, píldoras, bolsistas de polvos, ampollas de líquido, botellas con cuentagotas y otras similares que deben tomarse en pequeñas cantidades unitarias”. Estos complementos alimenticios no tienen la obligación de tener un valor añadido específico en cuanto a la prevención o tratamiento de patologías como si lo están los nutraceuticos.

Los alimentos fortificados junto con los alimentos funcionales pertenecen a la misma categoría, es decir ambos son alimentos que contienen algún componente o nutriente en concentraciones más altas que el propio alimento. Para el caso de los alimentos fortificados, uno o más de sus ingredientes están en unas cantidades mayores a las que tiene el alimento normal. Por otro lado, los alimentos funcionales, como ya se han definido anteriormente, consisten en adicionar un ingrediente o componente al alimento con el objetivo de mejorar o aportar beneficios adicionales respecto al alimento normal. Por consiguiente, el alimento funcional, es un alimento enriquecido que es cualitativamente mayor que un alimento común, es decir, es de mayor calidad, mientras que un alimento fortificado, es aquel que contiene mayor cantidad de ciertos ingredientes en su composición respecto al alimento común o normal (Santini et al., 2018; Télessy, 2019).

### 1.3.3. Legislación

El principal problema que surge en el tratamiento de los alimentos funcionales es la falta o ausencia de una normativa específica sobre ellos, sobre qué o cómo se pueden anunciar y sobre qué pueden alegar los fabricantes de estos ante sus consumidores. Además, es necesaria una legislación que regule los fraudes de aquellos alimentos o productos que no están apoyados por investigaciones científicas.

Los alimentos funcionales no están regulados bajo una normativa específica, pero al igual que todos los alimentos deben cumplir con la legislación vigente de higiene y seguridad alimentaria. Tanto la legislación española como la de la Unión Europea, obligan a que el envase del alimento posea la etiqueta nutricional, es decir, que, si a un alimento se le ha adicionado un componente o está enriquecido con un nutriente específico, el envase debe informar del aporte real de este componente en el producto.

Tanto en Japón como en EEUU, ya existían normas que regulaban el cumplimiento del aval científico-investigador de estos alimentos, mientras que en España hasta 2006 no existía normativa para ello. De aquí la importancia de las declaraciones de salud (Health Claims) que surgen como necesidad de normativas comunitarias.

En el Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables de los alimentos (Reglamento (CE) 1924/2006), se detalla el uso de estas declaraciones, así como lo que se entiende por “declaración”. Esta es cualquier mensaje o representación que no sea obligatorio con arreglo a la legislación comunitaria o nacional, incluida cualquier forma de representación pictórica, gráfica o simbólica, que afirme, sugiera o de a entender que un alimento posee unas características específicas.

En este mismo Reglamento se diferencian tres tipos de declaraciones, las nutricionales, las de propiedades saludables y las de reducción de riesgo de enfermedades. En el podemos encontrar sus definiciones, condiciones de uso y excepciones. Igualmente, es en el que se especifica que para que una declaración determinada sea validada, debe fundamentarse científicamente, mediante datos científicos disponibles y la aprobación de pruebas.

La ciencia y la investigación tienen un gran campo de trabajo por delante con estos alimentos funcionales, la identificación de marcadores, su biodisponibilidad y factores con los que puedan verse afectados. A este hecho se suma que serán fundamentales e imprescindibles como apoyo para que las empresas alimentarias apliquen y cumplan con todas estas declaraciones. La reciente aprobación del Reglamento (CE) 194/2006, junto con sus correcciones de errores del Parlamento Europeo y del Consejo, es un positivo y gran avance en cuanto a los alimentos funcionales y su legislación.

## 1.4. Referencias

- Abe-Matsumoto, L. T., Sampaio, G. R., & Bastos, D. H. M. (2018). Do the labels of vitamin A, C, and E supplements reflect actual vitamin content in commercial supplements? *Journal of Food Composition and Analysis*, *72*, 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.07.001>
- Ambra, R., Natella, F., Lucchetti, S., Forte, V., & Pastore, G. (2017).  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -carotene, lutein, squalene and secoiridoids in seven monocultivar Italian extra-virgin olive oils. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *68*(5), 538–545. <https://doi.org/10.1080/09637486.2016.1265099>
- Amorim-Carrilho, K. T., Cepeda, A., Fente, C., & Regal, P. (2014). Review of methods for analysis of carotenoids. *Trends in Analytical Chemistry*, *56*, 49–73. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.12.011>
- Aparicio-Ruiz, R., & Gandul-Rojas, B. (2014). Decoloration kinetics of chlorophylls and carotenoids in virgin olive oil by autoxidation. *Food Research International*, *65*, 199–206. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.046>
- ATBC prevention study group, the atbc. (1994). The Alpha-Tocopherol, Beta-

- Carotene Lung Cancer Prevention Study: Design, Methods, Participant Characteristics, and Compliance. *Annals of Epidemiology*, 4(1), 1–10. [https://doi.org/10.1016/1047-2797\(94\)90036-1](https://doi.org/10.1016/1047-2797(94)90036-1)
- Banwo, K., Olojede, A. O., Adesulu-Dahunsi, A. T., Verma, D. K., Thakur, M., Tripathy, S., Singh, S., Patel, A. R., Gupta, A. K., Aguilar, C. N., & Utama, G. L. (2021). Functional importance of bioactive compounds of foods with Potential Health Benefits: A review on recent trends. *Food Bioscience*, 43, 101320. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101320>
- Barberá Mateos, J. M., & Marcos, A. (2007). *Alimentos Funcionales. Aproximación a una nueva alimentación*. Dirección General de Salud Pública y Alimentación. Subdirección General de Alimentación. Comunidad Autónoma de Madrid.
- Bernstein, P. S., Li, B., Vachali, P. P., Gorusupudi, A., Shyam, R., Henriksen, B. S., & Nolan, J. M. (2016). Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 50, 34–66. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.10.003>
- Blot, W. J., Li, J. Y., Taylor, P. R., Guo, W., Dawsey, S. M., & Li, B. (1995). The Linxian trials: Mortality rates by vitamin-mineral intervention group. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1424S-1426S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/62.6.1424S>
- Bone, R. A., & Landrum, J. T. (2010). Dose-dependent response of serum lutein and macular pigment optical density to supplementation with lutein esters. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 504(1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.06.019>
- Bonvino, N. P., Liang, J., McCord, E. D., Zafiris, E., Benetti, N., Ray, N. B.,

- Hung, A., Boskou, D., & Karagiannis, T. C. (2018). *OliveNetData: a comprehensive library of compounds from Olea europaea. Database : the journal of biological databases and curation*, 2018, bay016.
- Boskou, D. (Ed). (2006). *Olive oil : Chemistry and technology*. AOCS Press.  
<https://ebookcentral.proquest.com/lib/ujaen/detail.action?docID=3002002>.
- Boskou, D. (2015). *Olive and Olive Oil Bioactive Constituents*. AOCS Press.
- Boussahel, S., Stefano, V. Di, Muscar, C., Cristani, M., & Melilli, M. G. (2020). Phenolic Compounds Characterization and Antioxidant Properties of Monocultivar Olive Oils from Northeast Algeria. *Agriculture*, 10(11), 494.  
<https://doi.org/10.3390/agriculture10110494>
- Britton, G., & Khachik, F. (2009). Carotenoids in Food. In G. Britton, S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander (Eds.), *Carotenoids. Nutrition and Health* (pp. 45–66). Birkhäuser.
- Brown, M. J., Ferruzzi, M. G., Nguyen, M. L., Cooper, D. A., Eldridge, A. L., Schwartz, S. J., & White, W. S. (2004). Carotenoid bioavailability is higher from salads ingested with full-fat than with fat-reduced salad dressings as measured with electrochemical detection. *American Journal of Clinical Nutrition*, 80(2), 396–403. <https://doi.org/10.1093/ajcn/80.2.396>
- Cacciola, F., Donato, P., Beccaria, M., Dugo, P., & Modello, L. (2012). Advances in LC-MS for food analysis. *LC GC Europe*, 25(5), 15–24.
- Calahorra, J., Martínez-Lara, E., Granadino-Roldán, J. M., Martí, J. M., Cañuelo, A., Blanco, S., Oliver, F. J., & Siles, E. (2020). Crosstalk between hydroxytyrosol, a major olive oil phenol, and HIF-1 in MCF-7 breast cancer cells. *Scientific Reports*, 10(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63417-6>

- Canene-Adams, K., & Erdman Jr., J. W. (2009). Absorption, Transport, Distribution in Tissues and Bioavailability. In George Britton, S. Liaaen-Jensen, & H. Pfander (Eds.), *Carotenoids. Nutrition and Health* (pp. 113–148).
- Carpentier, S., Knaus, M., & Suh, M. (2009). Associations between lutein, zeaxanthin, and age-related macular degeneration: An overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 49(4), 313–326. <https://doi.org/10.1080/10408390802066979>
- Carranco Jáuregui, M. E., Calvo Carrillo, M. D. L. C., & Pérez-Gil Romo, F. (2011). Carotenoides y su función antioxidante: Revisión. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 61(3), 233–241.
- Cherfaoui, M., Cecchi, T., Keciri, S., & Boudriche, L. (2018). Volatile compounds of algerian extra-virgin olive oils: Effects of cultivar and ripening stage. *International Journal of Food Properties*, 21(1), 36–49. <https://doi.org/10.1080/10942912.2018.1437627>
- CIE 015:2018. (2018). *Colorimetry, 4th Edition*. Central Bureau of the International Commission on Illumination, Viena. <https://doi.org/10.25039/TR.015.2018>
- COI (2007). VALORACIÓN ORGANOLÉPTICA DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN. COI/T320/Doc. nº 15/Rev. 2.
- Conte, L., Bendini, A., Valli, E., Lucci, P., Moret, S., Maquet, A., Lacoste, F., Brereton, P., García-González, D. L., Moreda, W., & Gallina, T. (2020). Olive oil quality and authenticity: A review of current EU legislation, standards, relevant methods of analyses, their drawbacks and recommendations for the future. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 483–493. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.02.025>



- Coppens, P., Fernandes Da Silva, M., & Pettman, S. (2006). European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods: A framework based on safety. *Toxicology*, 221(1), 59–74. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2005.12.022>
- D'Adamo, C. R., Miller, R. R., Shardell, M. D., Orwig, D. L., Hochberg, M. C., Ferrucci, L., Semba, R. D., Yu-Yahiro, J. A., Magaziner, J., & Hicks, G. E. (2012). Higher serum concentrations of dietary antioxidants are associated with lower levels of inflammatory biomarkers during the year after hip fracture. *Clinical Nutrition*, 31(5), 659–665. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2012.01.013>
- Dias, M. G., Olmedilla-Alonso, B., Hornero-Méndez, D., Mercadante, A. Z., Osorio, C., Vargas-Murga, L., & Meléndez-Martínez, A. J. (2018). Comprehensive Database of Carotenoid Contents in Ibero-American Foods. A Valuable Tool in the Context of Functional Foods and the Establishment of Recommended Intakes of Bioactives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(20), 5055–5107. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b06148>
- Directiva 2002/46/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 10 de junio de 2002 relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros en materia de complementos alimenticios. L183, 51-57.
- EFSA. (2008). Scientific Opinion of the Panel on Food Additives , Flavourings , Processing Aids and Materials in Contact with Food Adopted on 7 March 2008. *The EFSA Journal*, 674, 1–66.
- EFSA. (2010). Scientific Opinion on the re-evaluation of lutein (E 161b) as a food additive. *EFSA Journal*, 8(7), 1678. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1678>
- EFSA. (2012a). Scientific Opinion on the re-evaluation of mixed carotenes (E

160a (i)) and beta-carotene (E 160a (ii)) as a food additive. *EFSA Journal*, 10(3), 2593. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2593>

EFSA. (2012b). Statement on the safety of synthetic zeaxanthin as an ingredient in food supplements. *EFSA Journal*, 12(7), 2891. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3758>

Fairchild, M. D. (2013). *Color Appearance Models*. Wiley.

Fu, J., Zhang, L. Le, Li, W., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, F., & Zou, L. (2022). Application of metabolomics for revealing the interventional effects of functional foods on metabolic diseases. *Food Chemistry*, 367, 130697. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130697>

Gaforio, J. J., Visioli, F., Alarcón-De-la-lastra, C., Castañer, O., Delgado-Rodríguez, M., Fitó, M., Hernández, A. F., Huertas, J. R., Martínez-González, M. A., Menendez, J. A., de la Osada, J., Papadaki, A., Parrón, T., Pereira, J. E., Rosillo, M. A., Sánchez-Quesada, C., Schwingshackl, L., Toledo, E., & Tsatsakis, A. M. (2019). Virgin olive oil and health: Summary of the iii international conference on virgin olive oil and health consensus report, JAEN (Spain) 2018. *Nutrients*, 11, 2039. <https://doi.org/10.3390/nu11092039>

Gallardo-Fernández, M., Hornedo-Ortega, R., Alonso-Bellido, I. M., Rodríguez-Gómez, J. A., Troncoso, A. M., García-Parrilla, M. C., Venero, J. L., Espinosa-Oliva, A. M., & de Pablos, R. M. (2020). Hydroxytyrosol Decreases LPS- and  $\alpha$ -Synuclein-Induced Microglial Activation In Vitro. *Antioxidants*, 9(36). <https://doi.org/10.3390/antiox9010036>

Gandul-Rojas, B., Cepero, M. R., & Mínguez-Mosquera, M. I. (2000). Use of Chlorophyll and Carotenoid Pigment Composition to Determine Authenticity of Virgin Olive Oil. *Journal of the American Oil Chemists'*

*Society*, 77(8), 853–858. <https://doi.org/10.1007/s11746-000-0136-z>

Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, L., Roca, M., & Aparicio-Ruiz, R. (2013). Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Color Issues. In R. Aparicio & J. Harwood (Eds.), *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties* (2<sup>a</sup> ed, pp. 219–259). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8>

Gandul-Rojas, B., & Mínguez-Mosquera, M. I. (1996). Chlorophyllase activity in olive fruits and its relationship with the loss of chlorophyll pigments in the fruits and oils. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 72(3), 291–294. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(199611\)72:3<291::AID-JSFA654>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(199611)72:3<291::AID-JSFA654>3.0.CO;2-O)

García-Gavilán, J. F., Bulló, M., Canudas, S., Martínez-González, M. A., Estruch, R., Giardina, S., Fitó, M., Corella, D., Ros, E., & Salas-Salvadó, J. (2018). Extra virgin olive oil consumption reduces the risk of osteoporotic fractures in the PREDIMED trial. *Clinical Nutrition*, 37(1), 329–335. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2016.12.030>

García-Oliveira, P., Jimenez-Lopez, C., Lourenço-Lopes, C., Chamorro, F., Pereira, A. G., Carrera-Casais, A., Fraga-Corral, M., Carpena, M., Simal-Gandara, J., & Prieto, M. A. (2021). Evolution of flavors in extra virgin olive oil shelf-life. *Antioxidants*, 10(3), 1–20. <https://doi.org/10.3390/antiox10030368>

García Sánchez, A. (2017). *Desarrollo de metodologías para la determinación de contaminantes en aceites de oliva. Cuantificación del contenido graso y humedad de aceitunas y orujo*. Tesis de Doctorado, Universidad de Jaén.

Giuliani, A., Cerretani, L., & Cichelli, A. (2011). Chlorophylls in Olive and in Olive Oil : Chemistry and Occurrences Chlorophylls in Olive and in Olive

- Oil: *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(7), 678–690.  
<https://doi.org/10.1080/10408391003768199>
- Goren, L., Zhang, G., Kaushik, S., Breslin, P. A. S., Du, Y. C. N., & Foster, D. A. (2019). (-)-Oleocanthal and (-)-oleocanthal-rich olive oils induce lysosomal membrane permeabilization in cancer cells. *PLOS ONE*, 14(8), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216024>
- Gruszecki, W. I. (2010). Carotenoids in Lipid Membranes. In J. T. Landum (Ed.), *Carotenoids. Physical, Chemical and Biological Functions and Properties* (pp. 19–30).
- Guaadaoui, A., Benaicha, S., Elmajdoub, N., Bellaoui, M., & Hamal, A. (2014). What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 3(3), 174–179. <https://doi.org/10.11648/j.ijnfs.20140303.16>
- Guasch-Ferré, M., Hu, F. B., Martínez-González, M. A., Fitó, M., Bulló, M., Estruch, R., Ros, E., Corella, D., Recondo, J., Gómez-Gracia, E., Fiol, M., Lapetra, J., Serra-Majem, L., Muñoz, M. A., Pintó, X., Lamuela-Raventós, R. M., Basora, J., Buil-Cosiales, P., Sorlí, J. V., ... Salas-Salvadó, J. (2014). Olive oil intake and risk of cardiovascular disease and mortality in the PREDIMED Study. *BMC Medicine*, 12(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-12-78>
- Guidi, L., Tattini, M., & Landi, M. (2017). How Does Chloroplast Protect Chlorophyll Against Excessive Light? In E. Jacob-Lopes, L. Q. Zepka, & M. I. Queiroz (Eds.), *Chlorophyll*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/67887>
- Hammond, B. R., & Fletcher, L. M. (2012). Influence of the dietary carotenoids lutein and zeaxanthin on visual performance: Application to baseball.

- American Journal of Clinical Nutrition*, 96(5), 1207–1213.  
<https://doi.org/10.3945/ajcn.112.034876>
- Haskell, M. J. (2012). The challenge to reach nutritional adequacy for vitamin A:  $\beta$ -carotene bioavailability and conversion - Evidence in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 96(5), 1193–1203.  
<https://doi.org/10.3945/ajcn.112.034850>
- Hennekens, C. H., Buring, J. E., Manson, J. E., Stampfer, M., Rosner, B., Cook, N. R., Belanger, C., LaMotte, F., Gaziano, J. M., Ridker, P. M., Willett, W., & Peto, R. (1996). Lack of Effect of Long-Term Supplementation with Beta Carotene on the Incidence of Malignant Neoplasms and Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine*, 334(18), 1145–1149.  
<https://doi.org/10.1056/nejm199605023341801>
- Hohmann, C. D., Cramer, H., Michalsen, A., Kessler, C., Steckhan, N., Choi, K., & Dobos, G. (2015). Effects of high phenolic olive oil on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine*, 22(6), 631–640. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2015.03.019>
- Holt, E. M., Steffen, L. M., Moran, A., Basu, S., Steinberger, J., Ross, J. A., Hong, C. P., & Sinaiko, A. R. (2009). Fruit and Vegetable Consumption and Its Relation to Markers of Inflammation and Oxidative Stress in Adolescents. *Journal of the American Dietetic Association*, 109(3), 414–421. <https://doi.org/10.1016/j.jada.2008.11.036>
- Huang, Y., Brobbey, M., Guo, Y., Wang, L.-Z., Fang, S.-M., Deng, Y.-R., & Gao, X.-M. (2019). Fitoterapia The Oleaceae family: A source of secoiridoids with multiple biological activities. *Fitoterapia*, 136, 104155.  
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.04.010>
- Jimenez-Lopez, C., Carpena, M., Lourenço-lobes, C., Gallardo-gomez, M.,

- Lorenzo, J. M., Barba, F. J., Prieto, M. A., & Simal-gandara, J. (2020). Bioactive Compounds and Quality of Extra Virgin Olive Oil. *Foods*, 9(8), 1014. <https://doi.org/10.3390/foods9081014>
- Kalogeropoulos, N., & Tsimidou, M. Z. (2014). Antioxidants in greek virgin olive oils. *Antioxidants*, 3(2), 387–413. <https://doi.org/10.3390/antiox3020387>
- Konica Minolta. (2007). Precise Color Communication. ISSN: 9242-4830-92.
- Konstantinidi, M., & Koutelidakis, A. E. (2019). Functional Foods and Bioactive Compounds: A Review of Its Possible Role on Weight Management and Obesity's Metabolic Consequences. *Medicines*, 6(3), 94. <https://doi.org/10.3390/medicines6030094>
- Krinsky, N. I., & Johnson, E. J. (2005). Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26(6), 459–516. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.10.001>
- Lazerini, C., Cifelli, M., & Domenici, V. (2017). Pigments in extra virgin olive oils produced in different mediterranean countries in 2014: Near UV-vis spectroscopy versus HPLC-DAD. *LWT - Food Science and Technology*, 84, 586–594. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.06.025>
- Limón, P. M. (2017). *Aceites de oliva vírgenes extra enriquecidos con nuevos antioxidantes procedentes de microalgas. Caracterización físico-química, colorimétrica y ensayos de estabilidad*. Tesis Doctoral, Universidad de Jaén.
- Luengo Fernández, E. (2007). *Alimentos funcionales y nutracéuticos*. Sociedad Española de Cardiología.
- Ma, L., Yan, S. F., Huang, Y. M., Lu, X. R., Qian, F., Pang, H. L., Xu, X. R.,

- Zou, Z. Y., Dong, P. C., Xiao, X., Wang, X., Sun, T. T., Dou, H. L., & Lin, X. M. (2012). Effect of lutein and zeaxanthin on macular pigment and visual function in patients with early age-related macular degeneration. *Ophthalmology*, *119*(11), 2290–2297. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2012.06.014>
- Mapelli-Brahm, P., Hernanz-Vila, D., Stinco, C. M., Heredia, F. J., & Meléndez-Martínez, A. J. (2018). Isoprenoids composition and colour to differentiate virgin olive oils from a specific mill. *LWT - Food Science and Technology*, *89*, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.021>
- Mares, J. (2016). Lutein and Zeaxanthin Isomers in Eye Health and Disease. *Annual Review of Nutrition*, *36*, 571–602. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-071715-051110>
- Meléndez-Martínez, A. J. (2019). An Overview of Carotenoids, Apocarotenoids, and Vitamin A in Agro-Food, Nutrition, Health, and Disease. *Molecular Nutrition and Food Research*, *63*(15), 1–11. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201801045>
- Meléndez-Martínez, A. J., Mandić, A. I., Bantis, F., Böhm, V., Borge, G. I. A., Brnčić, M., Bysted, A., Cano, M. P., Dias, M. G., Elgersma, A., Fikselová, M., García-Alonso, J., Giuffrida, D., Gonçalves, V. S. S., Hornero-Méndez, D., Kljak, K., Lavelli, V., Manganaris, G. A., Mapelli-Brahm, P., ... O'Brien, N. (2020). A comprehensive review on carotenoids in foods and feeds: status quo, applications, patents, and research needs. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1–51. <https://doi.org/10.1080/10408398.2020.1867959>
- Meléndez-Martínez, A. J., Mapelli-Brahm, P., & Stinco, C. M. (2018). The colourless carotenoids phytoene and phytofluene: From dietary sources to their usefulness for the functional foods and nutricosmetics industries.

- Journal of Food Composition and Analysis*, 67, 91–103.  
<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.01.002>
- Melgosa, M., Huertas, R., Hita, E., Roa, J. M., Heredia, F. J., Alba, J., & Moyano, M. J. (2004). Proposal of a uniform color scale for virgin olive oils. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 81(4), 323–330.  
<https://doi.org/10.1007/s11746-004-0902-y>
- Mentella, M. C., Scaldaferrri, F., Ricci, C., Gasbarrini, A., Abele, G., & Miggianno, D. (2019). Cancer and Mediterranean Diet : A Review. *Nutrients*, 11(9), 2059. <https://doi.org/10.3390/nu11092059>
- Miho, H., Moral, J., López-González, M. A., Díez, C. M., & Priego-Capote, F. (2020). The phenolic profile of virgin olive oil is influenced by malaxation conditions and determines the oxidative stability. *Food Chemistry*, 314, 126183. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126183>
- Montealegre, C., Alegre, M. L. M., & García-Ruiz, C. (2010). Traceability markers to the botanical origin in olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(1), 28–38. <https://doi.org/10.1021/jf902619z>
- Morales, M. T., Aparicio-Ruiz, R., & Aparicio, R. (2013). Chromatographic Methodologies: Compounds for Olive Oil Odor Issues. In R. Aparicio & J. Harwood (Eds.), *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties* (2<sup>a</sup> ed, pp. 231-309). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8_8)
- Moyano, M. J., Meléndez-Martínez, A. J., Alba, J., & Heredia, F. J. (2008). A comprehensive study on the colour of virgin olive oils and its relationship with their chlorophylls and carotenoids indexes (I): CIEXYZ non-uniform colour space. *Food Research International*, 41(5), 505–512.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.03.007>



- Moyano, M. J., Melgosa, M., Alba, J., Hita, E., & Heredia, F. J. (1999). Reliability of the bromthymol blue method for color in virgin olive oils. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(6), 687–692. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0160-x>
- Moyano, María José, Heredia, F. J., & Meléndez-Martínez, A. J. (2010). The color of olive oils: The pigments and their likely health benefits and visual and instrumental methods of analysis. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 278–291. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2010.00109.x>
- Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., Keogh, J. P., Meyskens, F. L., Valanis, B., Williams, J. H., Barnhart, S., & Hammar, S. (1996). Effects of a Combination of Beta Carotene and Vitamin A on Lung Cancer and Cardiovascular Disease. *New England Journal of Medicine*, 334(18), 1150–1155. <https://doi.org/10.1056/nejm199605023341802>
- Pérez, A. G., León, L., Pascual, M., Romero-Segura, C., Sánchez-Ortiz, A., De La Rosa, R., & Sanz, C. (2014). Variability of virgin olive oil phenolic compounds in a segregating progeny from a single cross in *Olea europaea* L. and sensory and nutritional quality implications. *PLOS ONE*, 9(3), e92898. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092898>
- Phyllis, E. B., Stacewicz-Sapuntzakis, M., & Diwadkar-Navsariwala, V. (2015). Carotenoids in Human Nutrition. In C. Chen (Ed.), *Pigments in Fruits and Vegetables. Genomics and Dietetics* (1° ed., pp. 31–68). Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2356-4>
- Reglamento de Ejecución (UE) No 1348/2013 DE LA COMISIÓN de 16 de diciembre de 2013 que modifica el Reglamento (CEE) n° 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva

y sobre sus métodos de análisis. L338, 31–67.

Reglamento de Ejecución (UE) No 29/2012 DE LA COMISIÓN de 13 de enero de 2012 sobre las normas de comercialización del aceite de oliva. L12(7), 14–21.

Reglamento de Ejecución (UE) 2019/1604 DE LA COMISIÓN de 27 de septiembre de 2019 por el que se modifica el Reglamento (CEE) nº 2568/91 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. L250, 14–48.

Reglamento (CE) No 1924/2006 DEL PARLAMENTO EUROPEO Y DEL CONSEJO de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. L404, 9-25.

Reglamento (CEE) No 2568/91 DE LA COMISIÓN de 11 de junio de 1991 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis. L248, 1-128.

Reque, P. M., & Brandelli, A. (2021). Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 114, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.022>

Rodríguez-Amaya, D. B., & Kimura, M. (2004). *Harvestplus Handbook for Carotenoid Analysis*. HarvestPlus Technical Monographs Series 2.

Rodriguez-Concepcion, M., Avalos, J., Bonet, M. L., Boronat, A., Gomez-Gomez, L., Hornero-Mendez, D., Limon, M. C., Meléndez-Martínez, A. J., Olmedilla-Alonso, B., Palou, A., Ribot, J., Rodrigo, M. J., Zacarias, L., & Zhu, C. (2018). A global perspective on carotenoids: Metabolism, biotechnology, and benefits for nutrition and health. *Progress in Lipid*

*Research*, 70, 62–93. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2018.04.004>

Saini, R. K., & Keum, Y.-S. (2018). Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. *Food Chemistry*, 240, 90–103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.07.099>

Salmerón, J. F., Gómez-Robledo, L., Carvajal, M. Á., Huertas, R., Moyano, M. J., Gordillo, B., Palma, A. J., Heredia, F. J., & Melgosa, M. (2012). Measuring the colour of virgin olive oils in a new colour scale using a low-cost portable electronic device. *Journal of Food Engineering*, 111(2), 247–254. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.02.025>

Sánchez-Ortiz, A., Bejaoui, M. A., Quintero-Flores, A., Jiménez, A., & Beltrán, G. (2018). “Biosynthesis of volatile compounds by hydroperoxide lyase enzymatic activity during virgin olive oil extraction process.” *Food Research International*, 111, 220–228. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.05.024>

Santini, A., Cammarata, S. M., Capone, G., Ianaro, A., Tenore, G. C., Pani, L., & Novellino, E. (2018). Nutraceuticals: opening the debate for a regulatory framework. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84(4), 659–672. <https://doi.org/10.1111/bcp.13496>

Schneider, M. (2001). Phospholipids for functional food. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 103(2), 98–101. [https://doi.org/10.1002/1438-9312\(200102\)103:2<98::AID-EJLT98>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/1438-9312(200102)103:2<98::AID-EJLT98>3.0.CO;2-G)

Servili, M., Sordini, B., Esposto, S., Urbani, S., Veneziani, G., Maio, I. Di, Selvaggini, R., Taticchi, A., & Economico-estimative, S. (2014). Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants*, 3, 1–23. <https://doi.org/10.3390/antiox3010001>

- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*, *18*, 820–897. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.06.018>
- Siddique, A. B., Ayoub, N. M., Tajmim, A., Meyer, S. A., Hill, R. A., & El Sayed, K. A. (2019). (-)-Oleocanthal prevents breast cancer locoregional recurrence after primary tumor surgical excision and neoadjuvant targeted therapy in orthotopic nude mouse models. *Cancers*, *11*(5), 1–19. <https://doi.org/10.3390/cancers11050637>
- Singh, A., Ahmad, S., & Ahmad, A. (2015). Green extraction methods and environmental applications of carotenoids—a review. *RSC Advances*, *5*(77), 62358–62393. <https://doi.org/10.1039/c5ra10243j>
- Sommer, A. (2008). Vitamin A deficiency and clinical disease: An historical overview. *Journal of Nutrition*, *138*(10), 1835–1839. <https://doi.org/10.1093/jn/138.10.1835>
- Télessy, I. G. (2019). Nutraceuticals. In R. B. Singh, R. R. Watson, & T. Takahashi (Eds.), *The Role of Functional Food Security in Global Health* (pp. 409–421). London: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813148-0.00024-4>
- Tzekaki, E. E., Papaspyropoulos, A., Tsolaki, M., Lazarou, E., Kozori, M., & Pantazaki, A. A. (2021). Restoration of BMI1 levels after the administration of early harvest extra virgin olive oil as a therapeutic strategy against Alzheimer's disease. *Experimental Gerontology*, *144*, 111178. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2020.111178>
- Uncu, O., & Ozen, B. (2020). Importance of some minor compounds in olive oil authenticity and quality. *Trends in Food Science and Technology*, *100*, 164–

176. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.04.013>

- Visioli, F., Franco, M., Toledo, E., Luchsinger, J., Willett, W. C., Hu, F. B., & Martinez-Gonzalez, M. A. (2018). Olive oil and prevention of chronic diseases: Summary of an International conference. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 28(7), 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2018.04.004>
- Von Lintig, J. (2012). Provitamin A metabolism and functions in mammalian biology. *American Journal of Clinical Nutrition*, 96(5), 1234–1244. <https://doi.org/10.3945/ajcn.112.034629>
- Voutilainen, S., Nurmi, T., Mursu, J., & Rissanen, T. H. (2006). Carotenoids and cardiovascular health. *American Journal of Clinical Nutrition*, 83(6), 1265–1271. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.6.1265>
- Wani, T. A., Masoodi, F. A., Gani, A., Baba, W. N., Rahmanian, N., Akhter, R., Wani, I. A., & Ahmad, M. (2018). Olive oil and its principal bioactive compound: Hydroxytyrosol – A review of the recent literature. *Trends in Food Science and Technology*, 77, 77–90. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.001>
- Wen, X., Wu, J., Wang, F., Liu, B., Huang, C., & Wei, Y. (2013). Deconvoluting the role of reactive oxygen species and autophagy in human diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 402–410. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.013>
- Xiao, K., Zardawi, F., Van Noort, R., & Yates, J. M. (2013). Color reproduction for advanced manufacture of soft tissue prostheses. *Journal of Dentistry*, 41(5), e15-23. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.04.008>
- Xu, D. P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J. J., & Li, H.

Bin. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1), 20–31. <https://doi.org/10.3390/ijms18010096>

Zorić, N., Kopjar, N., Rodriguez, J. V., Tomić, S., & Kosalec, I. (2021). Protective effects of olive oil phenolics oleuropein and hydroxytyrosol against hydrogen peroxide-induced DNA damage in human peripheral lymphocytes. *Acta Pharmaceutica*, 71(1), 131–141. <https://doi.org/10.2478/acph-2021-0003>

## 2. Objetivos

---





## Objetivos

El principal objetivo de la investigación contenida en la presente Memoria de Tesis Doctoral es la obtención de alimentos funcionales basados en aceites de oliva virgen extra, enriquecidos en carotenoides. Se persigue dotar a la industria oleícola de la posibilidad de obtener nuevos productos para así ampliar su catálogo y además obtener una nueva vía de lucha contra enfermedades degenerativas asociadas al déficit de antioxidantes en nuestro organismo.

En este sentido, existe un gran interés en compuestos bioactivos como los carotenoides, por sus variadas y saludables propiedades, destacando su elevado poder antioxidante. Así, la ingesta de estos compuestos en las cantidades suficientes, puede ser efectiva para la prevención de ciertas patologías. A esto se suma que el aceite de oliva, al ser una matriz grasa, es un vehículo ideal para la ingesta, transporte y biodisponibilidad de estas moléculas. De este modo la ingesta de aceite de oliva enriquecido en carotenoides puede convertirse en una estrategia preventiva ideal ante el avance de las enfermedades desencadenadas por déficit de antioxidantes.

El objetivo general de esta tesis puede subdividirse en otros objetivos más específicos que se desglosan a continuación:

- Caracterizar físico-químicamente los nuevos aceites enriquecidos en  $\beta$ -caroteno y luteína.
- Estudiar el impacto de la adición de los carotenoides  $\beta$ -caroteno y luteína, en aceites de oliva virgen extra de diferentes variedades (arbequina, picual y royal), diferentes cosechas y de distintos índices de maduración. Así, se han evaluado parámetros de calidad del aceite, estabilidad oxidativa, contenido total de fenoles, análisis sensorial y composición.

- Estudiar y evaluar que concentración de  $\beta$ -caroteno y luteína es la más apropiada de forma global, encontrando un balance entre impacto en la calidad de los aceites controles y las cantidades necesarias a ingerir de cada compuesto bioactivo para la prevención de enfermedades.
- Determinar cómo afecta el enriquecimiento en carotenoides utilizados en esta Tesis Doctoral, a los aceites de oliva virgen ante variables de degradación típicas de alimentos como son: temperatura, exposición a la radiación y tiempo.
- Evaluar si el dispositivo de “lengua electrónica” es una herramienta efectiva para hacer una discriminación entre aceites enriquecidos y no enriquecidos, así como, entre aceites enriquecidos con diferentes concentraciones de carotenoides.

### **3. Efecto en las propiedades físico-químicas de aceites de oliva virgen extra de variedad picual, enriquecidos con $\beta$ -caroteno procedente de hongos**

---



Murillo-Cruz, MC., Chova, M. & Bermejo-Román, R. (2021). Effect of adding fungal  $\beta$ -carotene to picual extra virgin olive oils on their physical and chemical properties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45, e15186.

<http://doi.org/10.1111/jfpp.15186>

Es bien conocido que los aceites vegetales, como lo es el aceite de oliva virgen extra, tienden a oxidarse, provocando que tanto sus propiedades fisicoquímicas, su valor nutricional y en general su calidad, disminuyan y puedan llegar a perderse. Igualmente, este tipo de aceites poseen propiedades muy saludables, jugando un importante papel en la prevención de enfermedades degenerativas.

En este trabajo se ha evaluado el efecto que causa la adición del carotenoide  $\beta$ -caroteno, procedente del hongo *Blakeslea trispora*, a un aceite de oliva virgen extra de la variedad picual, con el objeto de evitar su posible degradación y además de reforzar el consumo de compuestos bioactivos. El  $\beta$ -caroteno es el principal carotenoide provitamina A y destaca, entre otras, por sus propiedades preventivas ante enfermedades como el cáncer o ciertas afecciones dermatológicas.

Para evaluar su efecto se compararon parámetros fisicoquímicos y de calidad de los aceites enriquecidos y los no enriquecidos. Los principales parámetros estudiados en este trabajo y que se exponen en este apartado son: el color, índice de peróxidos, acidez libre, coeficientes de extinción específica a 232 y a 270, valor de p-anisidina y TOTOX.

Además, se estudió el comportamiento de estos aceites ante variables de degradación, mediante calentamiento con microondas convencional y a la exposición de radiación UV.

De entre los resultados obtenidos en este capítulo, destacan las diferencias significativas que se observaron entre los aceites enriquecidos y los no enriquecidos en cuanto a color. Se produjeron importantes cambios en el mismo cuando las muestras de aceite se sometieron a calentamiento por microondas o exposición a la radiación, siendo los aceites enriquecidos con el carotenoide los que menor cambio experimentaron. Respecto al resto de parámetros de calidad estudiados, y a excepción de la acidez libre, experimentaron cambios con el calentamiento y la exposición a la radiación, siendo estas diferencias menores en las muestras enriquecidas, al igual que sucedió con el color.

Por tanto, la utilización del  $\beta$ -caroteno procedente de hongo *Blakeslea trispora* puede ser una vía efectiva para aumentar la ingesta de antioxidantes, proporcionando un valor adicional al aceite de oliva y generando una mayor resistencia a la degradación del mismo.

## **4. Mejora de las propiedades físico- químicas del aceite de oliva virgen extra de variedad arbequina enriquecido con $\beta$ -caroteno procedente de hongos**

---





Murillo-Cruz, MC., García-Ruíz, AB., Chova-Martínez, M., & Bermejo-Román, R. (2021). Improvement of Physico-chemical Properties of Arbequina Extra Virgin Olive Oil Enriched with  $\beta$ -carotene from fungi. *Journal of Oleo Science*, 70 (4), 459-469.

<https://doi.org/10.5650/jos.ess20195>

Son múltiples los estudios que ponen de manifiesto el papel fundamental que desempeñan los carotenoides y sus derivados en la salud humana, participando de manera crucial en la prevención de numerosas enfermedades degenerativas y distintos tipos de cáncer. Igualmente, estas moléculas son las principales responsables del color de muchos alimentos entre los que encontramos vegetales y frutas. Sin embargo, el ser humano no es capaz de sintetizar estas moléculas de carácter antioxidante, así como su ingesta puede ser reducida debido a un consumo inadecuado de vegetales y frutas en nuestra dieta diaria. Uno de los carotenoides más relevantes es el  $\beta$ -caroteno, que destaca por tener funciones de colorante, ser precursor de provitamina A y poseer actividad antioxidante.

Por otro lado, la principal grasa de la dieta Mediterránea es el aceite de oliva. Este tiene grandes propiedades nutricionales y organolépticas. Su consumo está ampliamente asociado a numerosos efectos beneficiosos para la salud, como la prevención de enfermedades coronarias y degenerativas.

El objetivo de este artículo es obtener y caracterizar un nuevo alimento funcional, preparando muestras de aceite de oliva virgen extra (variedad arbequina) enriquecidas con  $\beta$ -caroteno procedente del hongo *Blakeslea trispora*, a diferentes concentraciones: 0 mg/mL, 0,041 mg/mL y 0,082 mg/mL. Las nuevas muestras obtenidas, tanto enriquecidas como no enriquecidas, se evaluaron mediante la determinación de los parámetros de calidad del aceite de oliva virgen, según los respectivos reglamentos (Reglamento CEE N° 2568/91 de la Comisión, de 11 de julio de 1991, relativo a las características de los aceites de

oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis e ISO 6885:2016, aceites de origen animal y vegetal). De igual modo, se estudió el efecto de la adición de este carotenoide como un posible estabilizador oxidativo ante la degradación que sufren las muestras a través de calentamiento en microondas y de exposición a la radiación UV.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron cambios significativos en la calidad y el color de los aceites controles o no enriquecidos y los aceites enriquecidos con  $\beta$ -caroteno. El color inicial de las muestras de aceite se tornó a un color amarillo-anaranjado, originado por el color original del propio extracto del carotenoide. En cuanto al resto de parámetros, la diferencia entre las dos concentraciones estudiadas no fue significativa por lo que una concentración en torno a 0,082 mg/mL, puede ser apropiada para aumentar la dosis de antioxidantes que ingerimos diariamente. La exposición a temperatura y a la radiación UV produjeron una disminución de la calidad de las muestras de aceites estudiadas, aunque las muestras enriquecidas sufrieron menor degradación que las no enriquecidas.

El uso de antioxidantes naturales, como el  $\beta$ -caroteno, adicionados a aceite de oliva virgen extra podría ser un método eficaz para protegerlo de la degradación ante exposición a temperatura y radiación UV y, además, puede constituir una estrategia efectiva para el aumento del consumo de compuestos antioxidantes, mejorando el valor nutricional de los aceites.

## **5. Lengua electrónica como herramienta para evaluar el impacto de la fortificación en carotenoides del aceite de oliva de variedad arbequina**

---



Murillo-Cruz, MC., Rodrigues, N., Bermejo-Román, R., Veloso, A. C. A., Pereira, J. A., & Peres A. M. (2022). An electronic tongue as a tool for assessing the impact of carotenoids' fortification on *cv.* Arbequina olive oils. *European Food Research and Technology*, 248, 1287-1298.

<https://doi.org/10.1007/s00217-022-03964-6>

La fortificación de aceites de oliva en carotenoides como lo son la luteína y el  $\beta$ -caroteno, mejora las propiedades fisicoquímicas de estos aceites y aumenta el consumo de estos compuestos bioactivos con múltiples beneficios para la salud humana. Las cantidades recomendadas de ingesta de carotenoides no se alcanzan con la dieta diaria, siendo necesaria la incorporación a través de alimentos fortificados. Así, el aceite de oliva virgen extra, principal grasa de la dieta Mediterránea, puede constituir el vehículo adecuado para la incorporación de estos compuestos en nuestro organismo.

En este estudio se mostró que un dispositivo potenciométrico de lengua electrónica, construida en el propio laboratorio y compuesta por sensores de membranas lipídicas, es capaz de discriminar aceites no fortificados de aceites que han sido fortificados en carotenoides como  $\beta$ -caroteno y luteína y a diferentes concentraciones. Así se confirma el efecto de la fortificación con estos compuestos en el contenido de fenoles totales y en la parte sensorial percibida de los aceites. Este dispositivo, incluso discriminó de forma semicuantitativa los aceites fortificados a diferentes concentraciones de ambos carotenoides: 0, 0,05, 0,10, y 0,15 mg/mL.

Además, se evaluó el impacto de ambos carotenoides en los parámetros de calidad del aceite de variedad arbequina, así como en su color, estabilidad oxidativa, contenido total de fenoles y propiedades sensoriales. La adición de ambos carotenoides conllevó diferencias significativas en los parámetros

estudiados, siendo la luteína la que provocó diferencias mayores con respecto a su homónimo sin fortificar.

Por consiguiente, a pesar de las ligeras diferencias observadas en los distintos parámetros estudiados en los aceites enriquecidos con  $\beta$ -caroteno y luteína, la mejora nutricional de los nuevos aceites es una fortaleza esencial desde el punto de vista del consumidor. A ello se suma el buen rendimiento mostrado, tanto cualitativa como semicuantitativamente, por el dispositivo de lengua electrónica. Este puede convertirse en una futura herramienta práctica y rentable, capaz de evaluar el impacto de la fortificación de los aceites de oliva en carotenoides.

## **6. Aceites de oliva monovarietales fortificados en carotenoides: evaluación físicoquímica y sensorial**

---





Murillo-Cruz, MC., Rodrigues, N., Días, MI., Bermejo-Román, R., Veloso, A. C. A., Pereira, J. A., & Peres A. M. (2022). Monovarietal olive oils fortified with carotenoids: physicochemical and sensory trends and taste sensor evaluation. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 99 (12), 1113-1126.

<https://doi.org/10.1002/aocs.12650>

Los seres humanos apenas sintetizan carotenoides, sin embargo, estas moléculas están implicadas en diferentes funciones y su ingesta presenta múltiples beneficios para la salud. El carácter lipofílico de estos carotenoides convierte la fortificación del aceite de oliva en una perfecta vía para lograr alcanzar una ingesta diaria adecuada de estos.

En este estudio, se ha evaluado el comportamiento sobre los parámetros de calidad, color, estabilidad oxidativa, contenido de fenoles totales y análisis sensorial, de aceites monovarietales, arbequina, picual y royal, al enriquecerlos en  $\beta$ -caroteno y luteína a una concentración de 0,1 mg/ mL de aceite de oliva. Los aceites pertenecen a la cosecha 2020/2021 y los carotenoides utilizados para la fortificación fueron  $\beta$ -caroteno procedente de hongo y luteína procedente de flor de Marigold.

Además, se estudió la posible aplicación del dispositivo de lengua electrónica para discriminar los aceites de oliva no enriquecidos y enriquecidos para cada variedad de aceite. Así como, para evaluar el contenido total de fenoles y la intensidad de los atributos básicos como son: amargor, picor y dulzor.

Los parámetros de calidad, la estabilidad oxidativa y el contenido total de fenoles de las diferentes muestras estudiadas no sufrieron cambios importantes con el enriquecimiento, mientras que, el color y el análisis sensorial finales, difirieron significativamente de los aceites controles.

De forma global, se observó una clara diferencia en los parámetros tanto químico-físicos como sensoriales, entre los aceites que proceden de diferentes variedades de aceituna y, además, entre los aceites enriquecidos con  $\beta$ -caroteno o con luteína. Estas diferencias fueron corroboradas con el dispositivo de lengua electrónica, que, además, evaluó el impacto de la fortificación en cuanto a fenoles totales y atributos sensoriales. Así, se mostró la posibilidad de convertirse en una herramienta eficaz, siendo posible evaluar los cambios producidos en el sabor del aceite y en el contenido de fenoles totales con la fortificación en ciertos carotenoides.

## **7. Discusión General**

---



## Discusión General

El apartado que engloba la discusión general de esta Tesis Doctoral se ha dividido en dos subapartados. El primero de ellos, recoge un resumen de la discusión de los capítulos 3 y 4, conformados por los dos primeros artículos surgidos de esta Tesis. En el segundo apartado, se recoge el resumen de la discusión de los capítulos 5 y 6, correspondientes a los dos últimos artículos generados.

### 7.1. Efecto de la adición de $\beta$ -caroteno

En este subapartado se discute como afecta la adición de  $\beta$ -caroteno procedente del hongo *Blakeslea trispora* al aceite de oliva virgen extra de variedad arbequina y picual, ambos de la cosecha 2018/2019.

El color de los aceites se evaluó antes y después de la adición de este carotenoide, determinando los parámetros del espacio CIELAB ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ). El color anaranjado original del propio extracto de carotenoide (Figura 7.1.) origina un claro cambio en el color de los aceites control. El comportamiento seguido tras el enriquecimiento, tanto para los aceites de variedad picual como para los de variedad arbequina, fue similar para los parámetros  $a^*$  y  $L^*$ . La presencia de carotenoide en las muestras originó un claro aumento en los valores del parámetro de color  $a^*$ , independientemente de la variedad o del mes de recolección/producción del aceite. Igualmente ocurrió con la luminosidad ( $L^*$ ), en todas las muestras se observó un oscurecimiento a medida que se aumentaba la concentración de  $\beta$ -caroteno, lo que implicó que los valores iniciales de este parámetro disminuyeran. En cuanto al parámetro  $b^*$ , este experimentó ligeros cambios con la adición del carotenoide en todas las muestras estudiadas. Sin embargo, no se observó un mismo comportamiento para los aceites de variedad arbequina y los de variedad picual. En general, tras el enriquecimiento de los

aceites de oliva virgen, estos tendieron a cambiar desde tonalidades verde-amarillentas hasta amarillo-anaranjados, siendo además ligeramente más oscuras.



**Figura 7.1.** Disolución concentrada de  $\beta$ -caroteno procedente del hongo *Blakeslea trispora*.

Por otro lado, se evaluaron los parámetros de calidad del aceite de oliva entre los que se determinaron: acidez libre, índice de peróxidos, coeficientes de extinción específicos ( $K_{232}$ ,  $K_{270}$ , y  $\Delta K$ ), valor de p-anisidina y el valor de TOTOX. De forma general, para ambas variedades y para los tres índices de maduración estudiados (octubre, noviembre y diciembre) se observaron ligeras diferencias entre los parámetros de calidad de los aceites control y los enriquecidos, cumpliéndose en todos los casos estudiados los límites establecidos según el Reglamento (CEE) N° 2568/91 para un aceite de oliva virgen extra. Las diferencias más significativas ( $P$  valor  $<0,05$ , ANOVA de una vía) se observaron principalmente en el índice de peróxidos y los coeficientes de extinción:  $K_{232}$  y  $K_{270}$ . Además, este comportamiento se dio en ambas variedades, siendo mayor en ambos casos para los aceites producidos en los meses de noviembre y diciembre. A pesar de estas diferencias observadas, los valores que se obtuvieron para los parámetros de calidad, no son significativos en cuanto a una oxidación avanzada de los aceites tras la adición del carotenoide, es decir, no existe un deterioro

significativo en la calidad de los aceites provocado por el proceso de enriquecimiento.

Con los parámetros de calidad y de color evaluados en estos trabajos, no se obtuvo una clara tendencia del comportamiento seguido de los aceites tras la adición de carotenoides. Por lo tanto, fue necesario ampliar este estudio con una evaluación de la composición química y estabilidad oxidativa, tal y como se hizo posteriormente y se discute en el siguiente apartado.

Para observar el efecto de la adición de  $\beta$ -caroteno en las propiedades físico-químicas de los aceites de variedad picual y arbequina ante procesos de degradación, se procedió al estudio de estos aceites tras someterlos a calentamiento en microondas y a exposición de radiación UV.

El calentamiento en microondas se realizó en periodos de tiempo que comprenden los 0, 1, 3, 5, 10 y 15 min. El comportamiento de los aceites picual y arbequina fue muy similar. La acidez libre se mantuvo constante en ambos casos durante el calentamiento, aunque finalmente para los aceites de variedad arbequina, sí se produjo un ligero aumento. La formación de hidroperóxidos y con ello la oxidación primaria de los aceites, aumentó al ir aumentando el tiempo de calentamiento. Sin embargo, ambas variedades en los últimos periodos de calentamiento, mostraron una disminución de este proceso de degradación (enranciamiento), observándose una ligera tendencia a disminuir y mantener constante los valores de índice de peróxidos. En el resto de parámetros de calidad: coeficientes de extinción específica, p-anisidina y TOTOX, se observó una clara aceleración en el proceso de oxidación de los aceites a medida que se aumentaba el tiempo de calentamiento. En cuanto a la degradación de los aceites tras el calentamiento, para ambas variedades, los aceites enriquecidos mostraron una oxidación primaria y secundaria ligeramente menor respecto al tiempo 0 de calentamiento.

El estudio de las propiedades físico-químicas de los aceites tras su degradación mediante exposición a radiación UV, nos ayuda a conocer su estabilidad cuando son almacenados. El comportamiento que siguieron los aceites de variedad picual y arbequina fue similar. Además, en cuanto al deterioro hidrolítico (acidez libre), fue similar al experimentado tras el calentamiento en microondas. Los resultados expuestos de las muestras de aceite tras 8 semanas de exposición a radiación UV, mostraron un claro proceso de oxidación avanzado, este se verificó con los datos que se obtuvieron para índice de peróxidos y  $K_{232}$ . Así, se observó que la degradación por radiación UV provocó un daño oxidativo mayor que la que se ocasionó con un calentamiento en microondas. Sin embargo, los parámetros  $K_{270}$  y p-anisidina obtenidos fueron ligeramente menores que los mostrados para degradación con microondas.



## 7.2. Evaluación de la adición de $\beta$ -caroteno y luteína

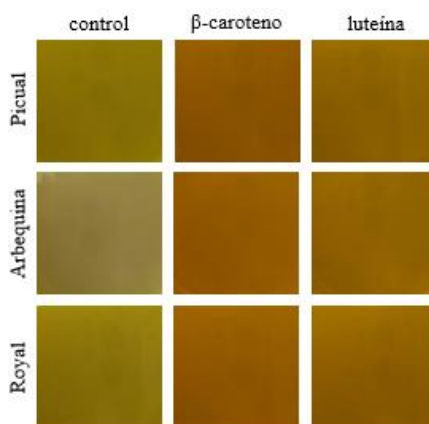
A continuación, se discute de forma general y resumida los resultados obtenidos tras el enriquecimiento con  $\beta$ -caroteno procedente del hongo *Blakeslea trispora* y de luteína procedente de flor de Marigold (*Tagetes erecta*) (Figura 7.2.), de aceites de oliva virgen extra de la cosecha 2020/2021, y de las variedades: picual, arbequina y royal (Figura 7.2.).



**Figura 7.2.** Izquierda: luteína, procedente de flor de Marigold. Derecha: muestras de aceites de diferentes variedades de aceituna.

Es importante resaltar que la apariencia visual de los alimentos juega un papel decisivo en la elección final de los consumidores. Es por ello que el color fue uno de los parámetros que se estudió tras el enriquecimiento en carotenoides. Al igual que se observó durante el desarrollo de los artículos previos (apartados 3 y 4), la fortificación en carotenoides trae consigo un cambio significativo en el color de los aceites control. Independientemente de la variedad de aceite y del carotenoide adicionado, los aceites control son significativamente ( $P$ -valor  $< 0,05$ ; ANOVA una vía) más luminosos y amarillo-verdosos que aquellos a los que se ha adicionado  $\beta$ -caroteno o luteína, como puede verse en la Figura 7.3. Estas diferencias que se observaron, son proporcionales a medida que aumenta la concentración de carotenoide. Además, independientemente de la concentración

adicionada y del carotenoide, tanto el índice de amarillamiento como la intensidad de color ( $C^*$ ), sufren incrementos mientras que, el tono ( $h$ ) disminuye significativamente en todas las muestras. En términos generales de color, la variedad arbequina muestra alteraciones de color similares para ambos compuestos adicionados, sin embargo, tanto picual como royal mostraron un cambio más significativo con la fortificación de  $\beta$ -caroteno.



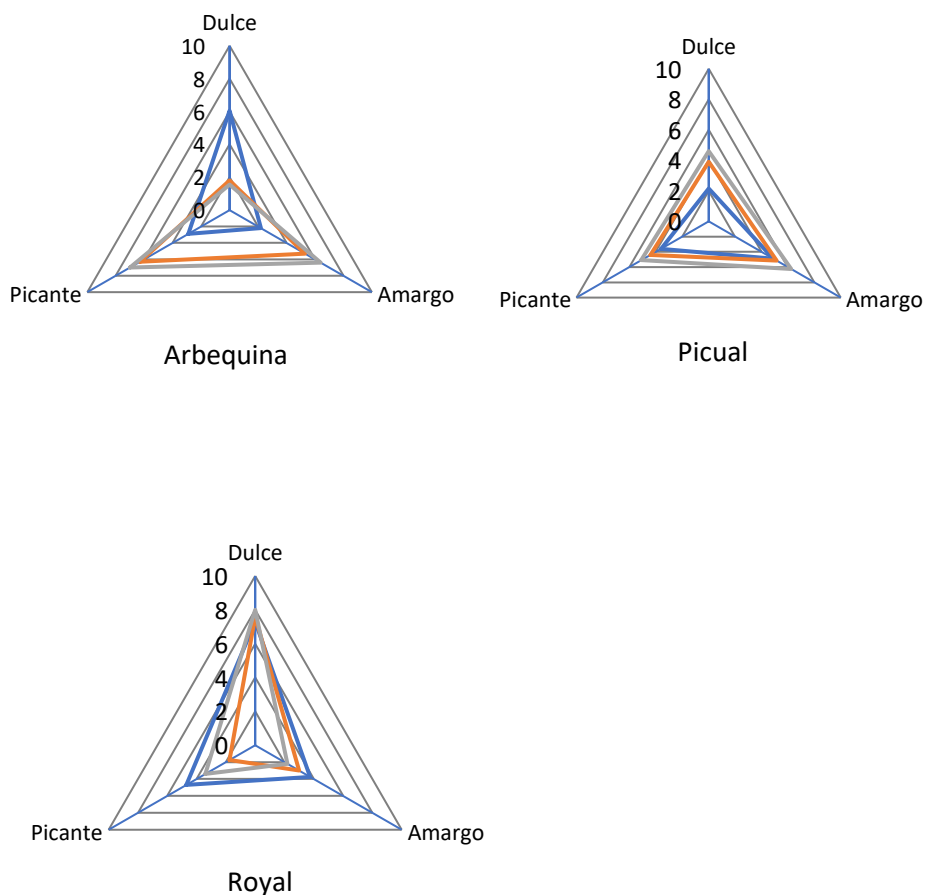
**Figura 7.3.** Color de las diferentes muestras de aceites no fortificados y fortificados en carotenoides.

La fortificación no motivó reacciones hidrolíticas en los aceites estudiados. Sin embargo, el efecto de este enriquecimiento si fue significativo en el resto de parámetros de calidad, para las tres variedades ensayadas y ambos carotenoides. Estas diferencias significativas fueron destacables en la oxidación primaria y sobre todo en las reacciones de oxidación secundaria (índice de peróxidos, coeficientes de extinción, p-anisidina y TOTOX).

Para conocer más en profundidad el efecto de la adición de  $\beta$ -caroteno y de luteína en los aceites y si este dependía de la concentración, así como de la variedad de aceituna utilizada, se determinó la estabilidad oxidativa, el contenido de fenoles totales y se llevó a cabo un análisis sensorial de los atributos básicos. Para cada variedad, la estabilidad oxidativa que se obtuvo fue similar, con

variaciones casi insignificantes entre aceites control y aceites enriquecidos. Los valores que se obtuvieron para este parámetro fueron del mismo orden de magnitud sin influir en él la concentración o carotenoide adicionado. No ocurrió lo mismo para el contenido de fenoles totales, observándose una clara tendencia de estos a decrecer, al aumentar la concentración de  $\beta$ -caroteno y luteína. A pesar de ello, la mejora del valor nutricional de los aceites fortificados es una gran ventaja para el consumidor y se confirmó mediante análisis con HPLC. Esta mejora nutricional se corroboró mediante la determinación de la concentración de carotenoides por cromatografía. Se obtuvieron valores satisfactorios tras la fortificación. La media de concentraciones obtenidas fue  $0,084 \pm 0,003$  mg de luteína/mL frente a los  $0,001$  mg/mL de los aceites control y de  $0,109 \pm 0,003$  mg de  $\beta$ -caroteno/mL frente a  $0,007$  mg/mL en los controles.

Un comportamiento totalmente contrario se observó en los resultados del análisis sensorial llevados a cabo por un panel cualificado. El cual se puede observar en los gráficos mostrados en la Figura 7.4. La fortificación afectó de forma significativa y en gran medida a los tres parámetros gustativos básicos analizados (amargo, picante y dulce). La intensidad de estos dependió principalmente de la variedad de aceite de oliva ensayado y en cierto modo también del carotenoide adicionado, pero, fue independiente a la concentración adicionada de  $\beta$ -caroteno o luteína.



**Figura 7.4.** Intensidad de los atributos básicos obtenidos del análisis sensorial de las muestras de aceite estudiadas. **Control:**—.  **$\beta$ -Caroteno:**— . **Luteína:**—.

Es importante destacar que se obtuvieron resultados positivos en cuanto al uso del dispositivo de lengua electrónica, consiguiendo discriminar los aceites fortificados de los no fortificados en  $\beta$ -caroteno y con luteína de cada variedad estudiada. Esta discriminación cualitativa nos hizo intuir su estrecha relación con las diferencias de intensidades que el panel percibió en el análisis sensorial y con el decrecimiento de los fenoles totales de las muestras fortificadas. Así y con el objetivo de utilizar este dispositivo como herramienta semicuantitativa, se

empleó para discriminar las muestras de aceite según los diferentes niveles de adición de  $\beta$ -caroteno o de luteína, obteniéndose resultados satisfactorios en los análisis de validación de modelos predictivos. Por lo tanto, y con ayuda de modelos de regresión lineal múltiples, se evaluó la posibilidad de convertir el dispositivo de lengua electrónica en una herramienta capaz de cuantificar el impacto en el contenido de fenoles totales y en las intensidades percibidas de los sabores básicos, del enriquecimiento con carotenoides de aceites monovarietales.



## **8. Conclusiones**

---





## Conclusiones

- Independientemente de la variedad de aceituna, el año y mes de recolección, la adición de  $\beta$ -caroteno implicó cambios significativos en los parámetros de calidad, estabilidad oxidativa, composición y color de todas las muestras de aceite ensayados.
- Igualmente ocurrió con la adición de luteína. Esta provocó también cambios en los parámetros de calidad, estabilidad oxidativa, composición y color de los aceites estudiados de diferentes variedades de aceituna.
- Los cambios más significativos y destacables tras la fortificación de aceites de oliva virgen extra en carotenoides fueron los inducidos en el color y en el análisis sensorial.
  - En cuanto al color característico de los aceites de oliva, este desaparece tras la adición de carotenoides. El color intenso anaranjado de estas moléculas provoca grandes cambios en los aceites controles. Las diferencias de color se manifestaron en los diferentes parámetros de color, independientemente de la variedad de aceituna, año de cosecha, mes de recolección, del carotenoide adicionado y de la concentración de este.
  - Se observaron diferencias significativas en las intensidades de los atributos básicos: amargor, picante y dulce, evaluados en el análisis sensorial de los aceites que fueron enriquecidos en  $\beta$ -caroteno y con luteína. Estos cambios con respecto al aceite sin fortificar, se percibieron en los tres aceites ensayados (arbequina, picual y royal) y con ambos carotenoides.

- Mediante HPLC se confirmó la correcta fortificación de los carotenoides en los aceites de oliva. Así, la composición de las muestras estudiadas alcanza la concentración buscada de carotenoides, dotando al aceite de un valor nutricional adicional al suyo propio. Por tanto, no solo tienen multitud de beneficios para la salud, sino que, además, con la ingesta en la dieta se alcanzan las dosis recomendadas de carotenoides para prevenir ciertas enfermedades degenerativas.
- Las diferentes concentraciones de carotenoides estudiadas no afectan de forma decisiva a la caracterización fisicoquímica de los aceites, pudiendo concluir que la concentración más adecuada es la de aproximadamente 0,1 mg carotenoide/mL de aceite. De este modo, se cumple con la ingesta media recomendada de carotenoides al consumir aceite de oliva como principal grasa de la DM.
- Los resultados de esta Tesis Doctoral también demostraron que el dispositivo de lengua electrónica es una herramienta práctica, capaz de discriminar los aceites de oliva enriquecidos con  $\beta$ -caroteno o con luteína, independientemente de su variedad. Asimismo, puede llegar a utilizarse como herramienta semicuantitativa distinguiendo el nivel de fortificación de los carotenoides.
- El dispositivo de lengua electrónica puede evaluar o estimar el impacto de la adición de carotenoides en cuanto al contenido de fenoles totales y a los atributos sensoriales básicos, independientemente de la variedad de aceituna o del carotenoide utilizado. De este modo, este dispositivo, se convierte en una herramienta con una importante relevancia comercial ante la posibilidad de detectar fraudes, poniendo de manifiesto su versatilidad como técnica de análisis de aceites de oliva.

- En el presente trabajo también se ha concluido que el calentamiento por microondas y la exposición a la radiación UV producen una disminución en los valores de algunos parámetros de calidad del aceite de oliva. A medida que el tiempo de calentamiento y el tiempo de exposición a la radiación UV aumentan, la calidad evaluada con la determinación de los diferentes parámetros de calidad disminuye. Por consiguiente, el estado de conservación, la estabilidad y la resistencia a cambios físicos y químicos se han evaluado tanto para los aceites enriquecidos en  $\beta$ -caroteno como para los no enriquecidos, siendo menos marcados los cambios para los enriquecidos. En consecuencia, la fortificación sugiere un efecto protector contra la degradación.
- Todos los aceites de oliva estudiados, tanto enriquecidos como no enriquecidos, cumplen con los umbrales legales para clasificarse como aceites de oliva virgen extra, aunque es importante resaltar, que no podrían comercializarse con tal denominación.
- El  $\beta$ -caroteno procedente del hongo *Blakeslea trispora* y la luteína procedente de flor de Marigold, son compuestos bioactivos perfectamente válidos para adicionarlos a los aceites de oliva virgen. Estos a su vez podrían ser incorporados en el mercado como nuevos productos para combatir ciertas enfermedades, promoviendo así la ingesta diaria de carotenoides y con ello cumpliendo con el enfoque propuesto como estrategia preventiva y como nueva vía para luchar contra ciertas enfermedades asociadas al déficit de estos carotenoides.



## 9. Conclusions

---



## Conclusions

- Regardless of the cultivar variety (Arbequina, Picual, and Royal), year and harvesting time, the  $\beta$ -carotene addition produced changes in quality parameters, oxidative stability, composition, and color in all the oil samples tested.
- A similar behavior resulted with the addition of lutein. Which brought changes in quality parameters, oxidative stability, composition, and color of the different cultivar varieties oils studied.
- The most significant and remarkable changes after fortifying extra virgin olive oils with carotenoids, were detected in color and sensory analysis.
  - Olive oil's characteristic color disappeared with the carotenoid fortification. The intense orange color of these carotenoids extracts lead to important changes in the control oils. The changes were observed in various color parameters, independent of cultivar variety, year and/or month of harvesting, adding carotenoids and final carotenoid concentration in sample.
  - Significant differences were observed in the intensities of the basic tastes: bitter, pungent and sweet in oils fortified with  $\beta$ -carotene or lutein. Regarding the unfortified oils, these changes were perceived in the three oils tested with both carotenoids.
- The correct addition of carotenoid to olive oils was confirmed by HPLC. Thus, the samples' composition reached the target carotenoids concentration, giving the oils an increased nutritional value. Therefore, not only they have multitude of health benefits, but also, the

recommended dose of carotenoids is reached to prevent degenerative illnesses.

- The different carotenoids concentration studied do not decisively affect the physicochemical characterization of the oils. Therefore, with an overall view of the results, we conclude that the best concentration is approximately 0,1 mg carotenoid/mL of oil. Reaching the average recommended intake of carotenoids when olive oil I used as the main fat in the MD.
- The results of this Doctoral Thesis also demonstrated that the E-tongue device is a practical tool, being able to discriminate olive oils enriched with  $\beta$ -carotene or lutein, independently of their cultivar variety. It can be also used as a semi-quantitative tool discriminating the level of carotenoid fortification.
- The E-tongue can evaluate or estimate the impact of carotenoid's addition over phenolics content and basic tastes, independently of the cultivar variety or the carotenoid. In addition, this tool is getting an important commercial relevance, targeting the possibility of fraud detection, as well as its great versatility and as a method for the analysis of olive oils.
- The present work has also concluded that microwave heating and UV radiation exposure produced a decrease in different quality parameters values for some olive oils. With the increase of heating time and UV radiation exposure time, the quality in oil decreased. Therefore, the conservation, stability, and resistance to physical and chemical changes were evaluated for both  $\beta$ -carotene-enriched oils and non-enriched oils, being the changes less pronounced for the first. Consequently, fortification suggests a protective effect against degradation.



- All olive oils samples studied, both with and without carotenoids, fulfill the legal thresholds to be classified as extra virgin olive oils, although noting that they must not be commercialized with such designation.
- The  $\beta$ -carotene from *Blakeslea trispora* fungi and the lutein from Marigold flower, are perfectly valid bioactive compounds to be added to virgin olive oils. Which, in addition, could be introduced into market as new products to prevent certain diseases. Thereby encouraging carotenoids intake to achieve the goal as a preventive strategy to fight against diseases associated with its deficiency.



# **10. Producción científica de la investigación**

---



## 10.1. Artículos derivados de esta investigación

**Título:** Improvement of Physico-Chemical Properties of Arbequina Extra Virgin Olive Oil Enriched with  $\beta$ -Carotene from Fungi.

**Autores:** M<sup>a</sup> Carmen Murillo-Cruz, Ana Belén García-Ruíz, Mariela Chova-Martínez and Ruperto Bermejo Román.

**Ref. Revista:** Journal of Oleo Science. 2021; **70** (4), 459-469.

<https://doi.org/10.5650/jos.ess20195>

**Título:** Effect of adding fungal  $\beta$ -carotene to picual extra virgin olive oils on their physical and chemical properties.

**Autores:** M<sup>a</sup> Carmen Murillo-Cruz, Mariela Chova and Ruperto Bermejo-Román.

**Ref. Revista:** Journal of Food Processing and Preservation. 2021; **45** (2), 15186.

<https://doi.org/10.1111/jfpp.15186>

**Título:** An electronic tongue as a tool for assessing the impact of carotenoids' fortification on *cv.* Arbequina olive oils.

**Autores:** M<sup>a</sup> Carmen Murillo-Cruz, Nuno Rodrigues, Ruperto Bermejo-Román, Ana C. A. Veloso, José Alberto Pereira and António M. Peres.

**Ref. Revista:** European Food Research and Technology. 2022; **248**, 1287-1298.

<https://doi.org/10.1007/s00217-022-03964-6>

**Título:** Monovarietal olive oils fortified with carotenoids: physicochemical and sensory trends and taste sensor evaluation.

**Autores:** M<sup>a</sup> Carmen Murillo-Cruz, Nuno Rodrigues, Maria Inês Dias, Ruperto Bermejo-Román, Ana C. A. Veloso, José Alberto Pereira and António M. Peres.

**Ref. Revista:** Journal of the American Oil Chemists' Society.

**Estado del artículo:** Submitted: 29, March, 2022. Under review...

## 10.2. Congresos derivados de esta investigación

### 10.2.1. Congresos Internacionales

**Autores:** M<sup>a</sup> Carmen Murillo-Cruz, Ruperto Bermejo-Román, António M. Peres, José Alberto Pereira & Nuno Rodrigues.

**Título:** Será a adição de extratos ricos em carotenóides benéfica para o azeite?

**Tipo de participación:** Comunicación Oral

**Congreso:** IX Simpósio Nacional de Olivicultura. “Tecnologia e Circularidade na Olivicultura”

Lugar celebración: Oeiras, Lisboa, Portugal.

Fecha: 2021

**Autores:** M<sup>a</sup> Carmen Murillo-Cruz, Lorena Martínez-Rodríguez, Mariela Chova-Martínez y Antonio Estrella de Castro y Ruperto Bermejo-Román.

**Título:** Efecto de la adición de carotenoides sobre las propiedades fisicoquímicas de aceites de oliva virgen extra.

**Tipo de participación:** Comunicación Oral

**Congreso:** XX Simposio Científico-Técnico de Expoliva 2021. Feria Internacional del Aceite de Oliva e Industrias Afines

Lugar celebración: Jaén

Fecha: 2021

**Autores:** Ruperto Bermejo, M. Carmen Murillo and Mariela Chova.

**Título:** Effect of adding bioactive extracts to extra virgin olive oils on their stability and carotenoids fraction.

**Tipo de participación:** Comunicación Oral

**Congreso:** Global Virtual CONFERENCE ON FOOD AND NUTRITION

Lugar celebración: London (Zoom Meeting)

Fecha: 2021

**Autores:** Ruperto Bermejo-Román, M<sup>a</sup> Carmen Murillo-Cruz, Ana Belén García-Ruíz, Mariela Chova-Martínez y Antonio Estrella de Castro

**Título:** ARBEQUINA VIRGIN OLIVE OILS ENRICHED WITH BETA-CAROTENE FROM FUNGI

**Tipo de participación:** Comunicación Oral

**Congreso:** XIX Simposio Científico-Técnico de Expoliva 2019. Feria Internacional del Aceite de Oliva e Industrias Afines

Lugar celebración: Jaén

Fecha: 2019

### 10.2.2. Congresos Nacionales

**Autores:** M<sup>a</sup> Carmen Murillo Cruz.

**Título:** How does the addition of lutein from Marigold flower affect Arbequina Extra-Virgin Olive Oil?

**Congreso:** Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Universidad de Jaén.

Lugar celebración: Universidad de Jaén

Fecha: 2021

**Autores:** M<sup>a</sup> Carmen Murillo-Cruz, Ana Belén García-Ruíz, Mariela Chova-Martínez, Antonio Estrella de Castro and Ruperto Bermejo-Román.

**Título:** Picual virgin olive oils enriched with  $\beta$ -carotene from fungi.

**Tipo de participación:** Comunicación Oral

**Congreso:** II REUNIÓN NACIONAL SOBRE CAROTENOIDES EN MICROORGANISMOS, PLANTAS, ALIMENTACIÓN Y SALUD. (CaRed. Red Española de Carotenoides)

Lugar celebración: Granada

Fecha: 2019

**Autores:** M<sup>a</sup> Carmen Murillo-Cruz, Ana Belén García-Ruíz, Mariela Chova-Martínez, Antonio Estrella de Castro y Ruperto Bermejo-Román.

**Título:** Using color determination to study vegetable oils enriched with carotenoids from microalgae and fungi.

**Tipo de participación:** Comunicación Oral

**Congreso:** XII Congreso Nacional del Color (Sociedad Española de Óptica)

Lugar celebración: Linares, Jaén

Fecha: 2019

**Autores:** M<sup>a</sup> Carmen Murillo Cruz.

**Título:** Arbequina extra virgin olive oil enriched with  $\beta$ -carotene from fungi.

**Congreso:** Jornadas de Jóvenes Investigadores de la Universidad de Jaén.

Lugar celebración: Universidad de Jaén

Fecha: 2019

### 10.3. Otras aportaciones científicas

#### 10.3.1. Artículos

**Autores:** MC. Murillo, AB. García, T. Lafarga and R. Bermejo.

**Título:** Color of extra virgin olive oils enriched with carotenoids from microalgae: influence of ultraviolet exposure and heating.

**Ref. Revista:** Grasas y Aceites. 2022; **73** (2), e455.

<https://doi.org/10.3989/gya.0104211>

**Autores:** Delia Castilla Fernández, David Moreno-González, M<sup>a</sup> Carmen Murillo-Cruz, Juan F. García-Reyes and Antonio Molina-Díaz.

**Título:** Appraisal of different clean-up strategies for the determination of fipronil and its metabolites in eggs by UHPLC-MS/MS.

**Ref. Revista:** Microchemical Journal. 2021, **166**; 106275.

<https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106275>

**Autores:** Ana Belén García, Eleonora Longo, M<sup>a</sup> Carmen Murillo and Ruperto Bermejo.

**Título:** Using a B-Phycocerythrin Extract as a Natural Colorant: Application in Milk-Based Products.

**Ref. Revista:** Molecules. 2021; **26** (2), 297. (Special Issue Natural Colorants)

<https://doi.org/10.3390/molecules26020297>

#### 10.3.2. Congresos

**Autores:** Ana García, M<sup>a</sup> Carmen Murillo, Eleonora Longo and Ruperto Bermejo



**Título:** Colorimetric evaluation of biliproteins as natural colorants to be used in food and beverages.

**Tipo de participación:** Comunicación Oral

**Congreso:** XII Congreso Nacional del Color (Sociedad Española de Óptica)

Lugar celebración: Linares, Jaén

Fecha: 2019

### 10.3.1. Actividades divulgativas

- Semana de la Ciencia 2019. Universidad de Jaén, 4-17 de noviembre 2019. “Obtención y caracterización físico-química de alimentos funcionales basados en aceite de oliva virgen enriquecido en compuestos bioactivos”.
- LA NOCHE EUROPEA DE L@S INVESTIGADOR@S 2020. Universidad de Jaén, 27 de noviembre 2020. “Nuevas tendencias en alimentos funcionales: buscando mejorar nuestra salud”.
- Día Internacional de la Mujer y la Niña en la Ciencia 2022. Escuela Politécnica Superior de Linares, Universidad de Jaén, 11 de febrero 2022. “Química en nuestro día a día”.
- Mujeres al frente de la investigación, día Internacional de la Mujer 2022. Escuela Politécnica Superior de Linares, Universidad de Jaén, 9 de marzo de 2022. “Nuevo alimento funcional basado en aceite de oliva virgen extra adicionado con carotenoides”.
- AO2022VE. Anuario Olivar Español 2022. ISSN 1137-5574. [www.revistaalmaceite.com](http://www.revistaalmaceite.com).

