



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y  
BROMATOLOGÍA**

**CALIDAD DE ACEITE DE OLIVA PRODUCIDO EN  
ALMAZARAS SIN AUTOCONTROL EN MARRUECOS**

Memoria que presenta  
**Nassira El haouhay M'hamdi**  
Para optar al grado de Doctor Internacional por la  
Universidad de Granada

Editorial: Universidad de Granada.Tesis Doctorales

Autora: Nassira El Haouhay

ISBN: 978-84-9125-249-1

URI: <http://hdl.handle.net/10481/40945>

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA**

**El Director del Departamento, Dr. Miguel Navarro Alarcón  
CERTIFICA:**

Que el presente trabajo de Investigación que lleva por título “Calidad de aceite de oliva producido en almazaras sin autocontrol en Marruecos” ha sido desarrollado en el Departamento de Nutrición y Bromatología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, por la Licenciada Nassira El haouhay M’hamdi.

Dr. Miguel Navarro Alarcón

Granada, 2015



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**FACULTAD DE FARMACIA**

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA**

**Directores de la Tesis Doctoral**

**Dra. Herminia López García de la Serrana**

**Dra. Marina Villalón Mir**

**Dra. Cristina Samaniego Sánchez**

**Memoria presentada por la Licenciada Nassira El haouhay M'hamdi**

**Aspirante al Grado de Doctor Internacional**

**Granada 2015**



# **AGRADECIMIENTOS**





.....



## ABREVIATURAS

$A_{\lambda}$	Absorción leída en espectrofotómetro
ABTS	Ácido 2,2'azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
$Abs_f$	Absorbancia final
$Abs_i$	Absorbancia inicial
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AGI	Ácidos grasos insaturados
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
AOVE	Aceite de oliva virgen extra
APPCC	Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos
$c$	Concentración de la disolución
°C	Grado centígrado o Celsius
CA	Capacidad antioxidante
CAC/ COA	Codex Alimentarius Commission
CAT	Catalasa
CEE	Comunidad económica europea
CFU	Colony forming units
cm	Centímetro
COI	Consejo Oleícola Internacional
DMPD	Dicloruro de 4-amino-N,N-dimetilfenilenediamina
CP	Compuestos fenólicos
DM	Dieta mediterránea
DPPH	1,1-difenol-2-picrilhidrazil
$E^1_{1cm\% \lambda}$	Extinción específica a la longitud de onda $\lambda$
EAG	Equivalentes de ácido gálico
ET	Equivalentes de Trólox
$e$	Espesor de la cubeta
FRAP	2,4,6-tripiridil-S-triazina
FPA	Food Product Association
$fd$	Factor de dilución
g	Gramo
GPCH	Guías de Prácticas Correctas de Higiene
G-Px	Gutación pero-xidasa
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
GPCH	Guías de Prácticas Correctas de Higiene
h	Hora
HACCP	Hazard Analysis Critical Control Points
Kg	Kilogramo
l	Litro

LCFA	Long chain fatty acid
LDL	Colesterol lipoproteína de baja densidad
log <sub>10</sub>	Logaritmo de 10
meq	Miliequivalentes
NACMCF	National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Food
MAPM	Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime
m.h.	Masa húmeda
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mmol	Milimol
M	Mol
nm	Nanómetro
N	Normalidad
$N_d$	Normalidad deseada
$N_t$	Normalidad teórica
$P$	Índice de peróxidos
PC	Punto de control
PCC	Punto de control crítico
$P.M.$	Peso molecular
P	Probabilidad
$p$	Peso
PGHs	Planes Generales de Higiene
PO	Polifenol oxidasa
PX	Polifenol peroxidasa
ppm	Partes por millón
p/v	Peso sobre volumen
$R^\bullet$	Radical
r	Coefficiente de correlación
R.D	Real Decreto
s	Segundo
SOD	Superóxido dismutasa
RL	Radical libre
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rmin	Riqueza mínima
rpm	Revoluciones por minuto
TEAC	Capacidad antioxidante equivalente al Trolox
TPTZ	2,4,6-tripiridil-S-triazina
UV - IR	Ultravioleta - infrarrojo
UV-VIS	Ultravioleta - visible
u.a.	Unidades de absorbancia
V	Volumen
$V_o$	Volumen gastado
WHO	World Health Organization
$\lambda$	Longitud de onda
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{mol}$	Micromol

# ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>1. GENERALIDADES DEL ACEITE DE OLIVA.....</b>	<b>3</b>
1.1 Origen del olivo.....	3
1.2 Características botánicas del olivo.....	4
1.3 La aceituna como materia prima: estructura, composición y variedades.....	5
1.4 Normas y clasificación de los aceites de oliva en Marruecos.....	7
1.5 Producción de aceite de oliva en Marruecos y sus métodos de extracción.....	12
1.6 Composición química del aceite de oliva .....	20
<b>2. OXIDACIÓN Y ANTIOXIDANTES.....</b>	<b>30</b>
2.1 Radicales libres: Tipos y reacciones.....	30
2.2 Sistemas de defensa antioxidantes.....	35
2.3 Antioxidantes presentes en el aceite de oliva.....	37
2.4 Medida de la actividad antioxidante.....	39
<b>3. CONCEPTO DE CALIDAD EN EL ACEITE DE OLIVA.....</b>	<b>50</b>
3.1 Criterios químicos de calidad de un aceite.....	51
3.2 Criterios microbiológicos de calidad de un aceite.....	53
3.3 Índices de deterioro de calidad relacionados con el aceite de oliva.....	54
3.3.1. Hidrólisis de triglicéridos.....	54
3.3.2. Oxidación de los ácidos grasos.....	56
3.3.3. Degradación de los polifenoles.....	59
3.3.4. Pérdida de la capacidad antioxidante.....	60
<b>4. SISTEMA DE CONTROL DE CALIDAD EN LA INDUSTRIA DE ACEITE DE OLIVA.....</b>	<b>62</b>
4.1 Los Planes Generales de Higiene.....	63
4.2 El sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC).....	65
<b>II. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS.....</b>	<b>69</b>
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>75</b>
<b>1. MUESTRAS ANALIZADAS .....</b>	<b>77</b>
<b>2. MICROBIOLOGICAL ANALYSIS: MESOPHILIC AND PSYCHROTROPHIC BACTERIA, MOULDS, YEASTS AND ENTEROBACTERIACEAE IN OLIVES AND OLIVE OILS PRODUCED IN TRADITIONAL MILLS IN MOROCCO .....</b>	<b>80</b>
2.1 MATERIALS AND METHODS.....	80
2.2 RESULTS AND DISCUSSION.....	89

2.2.1.	Olive fruits .....	89
2.2.2.	Olive oil .....	92
<b>3</b>	<b>ANÁLISIS FÍSICOQUÍMICOS DE ACEITE DE OLIVA PRODUCIDO EN ALMAZARAS TRADICIONALES EN MARRUECOS.....</b>	<b>106</b>
3.1	MATERIAL Y MÉTODOS.....	106
3.1.1.	Determinación del grado de acidez.....	109
3.1.2.	Determinación del índice de peróxidos.....	110
3.1.3.	Determinación de la absorbancia en el Ultravioleta (K232 y K270).....	112
3.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	115
3.2.1.	Grado de acidez.....	115
3.2.2.	Índice de peróxidos.....	121
3.2.3.	Absorbancia en el Ultravioleta.....	124
<b>4</b>	<b>DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE ACEITE DE OLIVA PRODUCIDO EN ALMAZARAS TRADICIONALES EN MARRUECOS.....</b>	<b>131</b>
4.1	MATERIAL Y MÉTODOS.....	131
4.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	135
4.1.1.	Ácidos grasos insaturados.....	135
4.1.2.	Ácidos grasos saturados .....	143
<b>5</b>	<b>ESTUDIO DEL CONTENIDO EN POLIFENOLES TOTALES Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE OLIVA PRODUCIDO EN ALMAZARAS TRADICIONALES EN MARRUECOS .....</b>	<b>155</b>
5.1	MATERIAL Y MÉTODOS.....	155
5.1.1.	Determinación del Contenido en Polifenoles Totales (IPT).....	157
5.1.2.	Estudio de la capacidad antioxidante.....	160
5.2	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	166
5.2.1.	Contenido en Polifenoles Totales (IPT).....	166
5.2.2.	Determinación de la capacidad antioxidante.....	171
<b>6</b>	<b>DETERMINACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS VARIABLES ESTUDIADOS..</b>	<b>189</b>
	<b>IV. CONCLUSIONES.....</b>	<b>197</b>
	<b>V. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>203</b>
	<b>VI. PUBLICACIONES Y CONGRESOS.....</b>	<b>273</b>

# **I. INTRODUCCIÓN**





## I. INTRODUCCIÓN

### 1. GENERALIDADES DEL ACEITE DE OLIVA

#### 1.1. Origen del olivo.



El árbol del olivo (*Olea europaea*) pertenece a la familia Oleaceae. Su origen es del árbol salvaje del olivo (*O. europaea var. sylvestris*). Estudios recientes informaron sobre la vida histórica del oleastre desde la última época glacial (Breton et al., 2008). Los empleos de los frutos de oliva para la comida han sido documentados más tarde, durante la edad de bronce (Riley, 2002).

El olivo ha sido cultivado en Palestina desde unos 6000 años (Terral et al., 2004) y más tarde se extendió de Este a Oeste de la cuenca mediterránea (Zamora et al., 2001; Bartolini and Petruccelli, 2002).

El cultivo del olivo ha conocido una gran extensión en el valle de la Bética con una propagación hacia la Península Ibérica y Portugal, ocupando además una gran parte del Norte de África desde Túnez hasta Marruecos.

El olivo es el árbol más emblemático del Mediterráneo (Breton et al., 2008), aunque la expansión de su cultivo haya llegado a otras regiones del mundo, más allá del Mediterráneo; como la región sudafricana, Australia, Japón ó China (Uceda et al., 1997). Por sus efectos sociales, el olivo ha sido símbolo para representar la paz, la sabiduría y la victoria en distintas etapas de la historia de la humanidad. Los frutos del olivo dejan una cosecha típica mediterránea, donde juegan un papel importante en la dieta, así como en su economía y cultura (Zamora et al., 2001; Bartolini and Petruccelli, 2002; Pinheiro and Esteves da Silva, 2005).

La civilización árabe-musulmana probablemente ha tenido una gran influencia sobre la oleicultura así que en los dos lados del estrecho, tanto en España y Portugal como en Marruecos las palabras oliva o aceituna y su extracto aceite tienen el mismo origen árabe.

	<u><b>Oliva</b></u>	<u><b>Extracto de oliva</b></u>
España:	Aceituna	Aceite
Portugal:	Azeitona	Azeite
Marruecos:	Azaitoun	Azaeit

## **1.2. Características botánicas del olivo.**

El olivo (*olea europaea L*) pertenece a la familia Oleaceae, es un árbol de tamaño mediano de unos 4 a 8 metros de altura y puede permanecer vivo y productivo durante cientos de años (Uceda et al., 2000). Requiere intensidades de luz elevadas para la diferenciación de los botones florales y el desarrollo de los brotes, por eso el fruto se localiza en su mayoría en la superficie de la copa. Las hojas son de color verde oscuro por la parte superior y grises plata en la parte inferior, son simples, de formas lanceoladas, con bordes enteros, largas de una media de 5 a 8 centímetros, persistentes y con un período de vida que va de 2 a 3 años. Las raíces tienen muchas ramificaciones superficiales que desarrollan la mayor parte de la actividad de absorción nutritiva. Se extienden horizontalmente hasta 2-3 veces la altura de la planta y penetran en el suelo, en los suelos más fértiles, hasta 1,5 ó 2 metros de profundidad. El tronco aparece gris-verde y liso hasta aproximadamente los diez años; luego se vuelve nudoso, con surcos profundos y retorcidos y toma color oscuro.

Alrededor de mayo o junio se da la formación de pequeñas flores blancas y verdes agrupados por inflorescencias, cada inflorescencia puede tener entre 10



y 40 flores, según sean las condiciones ambientales y/o fisiológicas. La corola de la flor posee pétalos de en forma de racimo. La polinización la facilita el viento. En los primeros meses veraniegos se forman los primeros frutos

verdes. De finales de septiembre en adelante, según la variedad, los frutos maduran y se transforman en las clásicas drupas de color negro morado. Los frutos de la aceituna no pueden ser consumidos tal cuál aparecen en el árbol: también las destinadas a la mesa son sometidas, después de la recolección, a particulares tratos que las convierten en comestibles (salmuera). Factores

como la edad del olivo, la variedad, estado del árbol y los factores ecológicos intervienen en el desarrollo y maduración de los frutos (Kiritsakis et al., 1992).

### **1.3. La aceituna como materia prima: estructura, composición y variedades.**

La aceituna es una drupa de forma elipsoidal o globosa y formada por tres partes (Figura I.1).

- Epicarpio es la capa externa, más fina (piel) y representa 1-2% del total del fruto.
- Mesocarpio o pulpa es la parte carnosa del fruto, forma el 68-86% del total y en él se encuentra alrededor de 70% del aceite.
- Endocarpio representa el hueso con la semilla y forma el 20-30 % y puede contener el 30% del aceite.



**Figura I.1.** Una aceituna con una travesera longitudinal que muestra el epicarpio, mesocarpio y endocarpio.

En su primer estado de maduración, la oliva es de color verde, después se transforma en morado y finalmente, en el estado más avanzado de maduración es de color oscuro brillante.

La composición de este fruto varía en función de diferentes factores tales como, la variedad, el estado de maduración, el clima y la zona geográfica. Por término medio la aceituna está formada por agua de vegetación (40-55%), aceite (18-22%) y hueso más tejidos vegetales (23-35). La siguiente tabla muestra la composición de aceituna (Tabla I.1).

	Pulpa	Hueso	Semilla
Agua	50-60	9.3	30
Aceite	15-30	0.7	27.3
Azúcares	3-7.5	41	26.6
Celulosa	3-6	38	1.9
Materia nitrogenada	2-5	3.4	10.2
Cenizas	1-2	4.1	1.5
Polifenoles	2-2.5	0.1	1-1.5
Indeterminados		3.4	2.4

**Tabla I.1.** Composición de la aceituna (Carrasco Pancorbo, 2006).

Diferentes características como el tamaño y la forma del fruto, su contenido en aceite y sus características organolépticas junto con otras diferencias del olivo, han hecho distinguir muchos tipos o variedades de aceitunas destinadas tanto para el consumo en verde como para la producción de aceite (Barranco et al., 2001), tales como Arbequina, Hojiblanca, Picual y Empeltre.

Entre las principales variedades vamos a describir la Picholine marroquí (Figura I.2) que es la variedad de aceituna, que se ha empleado en la realización del presente trabajo.



**Figura I.2.** La Picholine marroquí en su estado de maduración

Es la variedad principal de Marruecos, representando el 96% de las aceitunas cultivadas (COI, 2012). Se adapta bien a las condiciones de clima y suelo, y es resistente a la sequía. Dentro de sus distintas formas, se han efectuado una selección para introducir en las nuevas plantaciones clones con caracteres definidos. Es una variedad rústica con una época de floración media. La producción de polen es abundante y la productividad es elevada y alternante. Es una típica variedad de doble aptitud. Para uso de mesa se obtienen todo

tipo de productos: desde aceitunas verdes partidas hasta aceitunas negras maduras. La separación de la pulpa del hueso es fácil. El rendimiento en la almazara es de 22% (Chimi, 2001). En estudios de clasificación de 25 variedades del Banco de Germoplasma Mundial de Córdoba, La Picholine marroquí mostro un nivel muy alto de fenoles, un contenido alto en ácido oleico y bajo en palmítico y linoleico, y una estabilidad oxidativa alta (Uceda et al., 2005). Otra de las características del aceite producido a partir de esta variedad es su resistencia a la congelación (conserva su fluidez incluso a -12°C), por lo que se utiliza en los productos enlatados.

#### **1.4. Normativas y clasificación de los aceites de oliva en Marruecos.**

El aceite de oliva es el líquido oleoso extraído de los frutos maduros del olivo (*Olea europaea* L.), sin que haya sido sometido a manipulaciones o tratamientos no autorizados (COI, 2008). Así, diferentes normativas y reglamentos están indicados para la clasificación de este tipo de aceite, como la Normativa del Consejo Oleícola Internacional relativa a la comercialización de aceite de oliva y aceite de orujo de oliva COI/T.15/NC nº 3/Rév, de 7 de mayo de 2013 y el Reglamento de la Unión Europea (UE) Nº 61/2011 de la comisión de 24 de enero de 2011 relativo a las características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y sobre sus métodos de análisis, que modifica el Reglamento (CEE) Nº. 2568/91 de la comisión del 11 de julio de 1991.

En Marruecos, la normativa aplicada para la comercialización del aceite de oliva es la del consejo oleícola internacional (COI, 2013a) y se distinguen las categorías citadas a continuación: (Tabla I.2).

##### **Aceite de oliva virgen destinada al consumo:**

Aceite obtenido a partir del fruto del olivo únicamente por procedimientos mecánicos ó por otros medios físicos, en condiciones, sobre todo térmicas, que no ocasionen la alteración del aceite, y que no haya tenido más tratamiento que el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado.

***-Aceite de oliva virgen extra***

Aceite de oliva virgen cuya acidez libre, expresada en ácido oleico es como máximo de 0.8 g por 100 g.

***-Aceite de oliva virgen***

Aceite de oliva virgen cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no supera los 2 g por 100 g.

***-Aceite de oliva virgen corriente***

Aceite de oliva virgen cuya acidez libre, expresada en ácido oleico es como máximo de 3,3 g por 100 g.

***-Aceite de oliva virgen lampante***

Aceite de oliva virgen cuya acidez libre, expresado en ácido oleico supera 3,3 g por 100 g.

***-Aceite de oliva refinado***

Aceite de oliva obtenido mediante la refinación de aceites de oliva vírgenes, cuya acidez libre, expresada en ácido oleico, no supera 0,3 g por 100 g.

Es el aceite procedente de la refinación por procedimientos químicos, de aceites de oliva vírgenes de alta acidez. Estos aceites han perdido sus características organolépticas (color, olor y sabor) y sus propiedades naturales.

***-Aceite de oliva***

Aceite de oliva constituido por una mezcla de aceite de oliva refinado y de aceites de oliva vírgenes, cuya acidez libre expresada en ácido oleico, no podrá ser superior a 1g por 100g.

***-Aceite de orujo de oliva***

Aceite obtenido mediante tratamiento por disolvente del orujo de oliva o de otros procedes físicos con exclusión de los aceites obtenidos por procedimientos de reesterificación y de cualquier mezcla con aceites de otra naturaleza. Y se comercializa según las siguientes categorías:

***-Aceite de orujo de oliva bruto***

Aceite de orujo de oliva con las características corresponden a las fijadas para este tipo por la presente normativa. Es destinada a la refinación para su consumo.

***-Aceite de orujo de oliva refinado***

Es el aceite obtenido mediante refinación del aceite de orujo de oliva bruto, cuya acidez libre no podrá ser superior a 0,3 g por 100 g.

***-Aceite de orujo de oliva***

Aceite constituido por una mezcla de aceite de orujo de oliva refinado y de aceite de oliva virgen, cuya acidez libre expresada en ácido oleico no podrá ser superior a 1g por 100g.

:

	Huile d'olive vierge extra	Huile d'olive vierge	Huile d'olive vierge courante	Huile d'olive vierge lampante *	Huile d'olive raffinée	Huile d'olive	Huile de grignons d'olive brute	Huile de grignons d'olive raffinée	Huile de grignons d'olive
<p>4.1 <u>Caractéristiques organoleptiques</u></p> <p>- odeur et saveur</p> <p>- odeur et saveur (sur une échelle continue)</p> <p>. médiane du défaut</p> <p>. médiane du fruité</p> <p>- couleur</p> <p>- aspect à 20°C pendant 24 heures</p>	Me = 0 Me > 0	0 < Me ≤ 3,5 Me > 0	3,5 < Me ≤ 6,0**	Me > 6,0	acceptable	bonne		acceptable	bonne
<p>4.2. <u>Acidité libre</u></p> <p>% m/m exprimée en acide oléique</p>	≤ 0,8	≤ 2,0	≤ 3,3	> 3,3	≤ 0,3	jaune clair	non limitée	Claire jaune à jaune brun	Claire jaune à vert
<p>4.3. <u>Indice de peroxyde</u></p> <p>en milliéquivalents d'oxygène des peroxydes par kg d'huile</p>	≤ 20	≤ 20	≤ 20	non limité	≤ 5	limpide	limpide	limpide	limpide
						Claire jaune à vert		Claire jaune à jaune brun	Claire jaune à vert
						limpide		limpide	limpide
						≤ 1,0		≤ 0,3	≤ 1,0
						≤ 15		≤ 5	≤ 15

\* La simultanéité des critères 4.1., 4.2., 4.3. n'est pas obligatoire; un seul peut suffire.

\*\* Ou lorsque la médiane du défaut est inférieure ou égale à 3,5 et la médiane du fruité est égale à 0.

**Tabla I.2.** Características de aceite de oliva según el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2013a)



	Huile d'olive vierge extra	Huile d'olive vierge	Huile d'olive vierge courante	Huile d'olive vierge lampante	Huile d'olive raffinée	Huile d'olive	Huile de grignons d'olive brute	Huile de grignons d'olive raffinée	Huile de grignons d'olive
4.4. <u>Absorbance dans l'ultraviolet</u> ( $K^{1\%}_{1cm}$ )									
- à 270 nm (cyclohexane) / 268 nm (iso-octane)	≤ 0,22	≤ 0,25	≤ 0,30		≤ 1,10	≤ 0,90		≤ 2,00	≤ 1,70
- Δ K	≤ 0,01	≤ 0,01	≤ 0,01		≤ 0,16	≤ 0,15		≤ 0,20	≤ 0,18
- à 232 nm*	≤ 2,50**	≤ 2,60**							
4.5. <u>Teneur en eau et en matières volatiles</u> % m/m	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,3	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 1,5	≤ 0,1	≤ 0,1
4.6. <u>Teneur en impuretés insolubles dans l'éther de pétrole</u> % m/m	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05		≤ 0,05	≤ 0,05
4.7. <u>Point d'éclair</u>	-	-	-	-	-	-	≥ 120°C	-	-
4.8. <u>Traces métalliques</u> mg/kg									
fer	≤ 3,0	≤ 3,0	≤ 3,0	≤ 3,0	≤ 3,0	≤ 3,0		≤ 3,0	≤ 3,0
cuivre	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1	≤ 0,1		≤ 0,1	≤ 0,1
4.9. <u>Esters méthyliques (FAME) et esters éthyliques (FAEE) des acides gras</u>	$\Sigma$ FAME + FAEE < 75 mg/kg (campagne 2012/13) FAEE ≤ 40 mg/kg (campagne 2013-2014), FAEE ≤ 35mg/kg (campagnes 2014-2015), FAEE ≤ 30 mg/kg (après 2015)								
4.10. <u>Teneur en phénols</u>	Voir point 11.24								

\* Cette détermination est uniquement d'application par les partenaires commerciaux et à caractère facultatif.

\*\* Les partenaires commerciaux du pays de vente au détail peuvent exiger le respect de ces limites lors de la mise à disposition de l'huile au consommateur final.

Tabla I.2. Características de aceite de oliva según el Consejo Oleícola Internacional (COI, 2013a) (continuación).

### 1.5. Producción de aceite de oliva en Marruecos y sus métodos de extracción.

La producción de aceitunas en la actualidad se realiza en más de 40 países de todos los continentes, incluidos lugares exóticos como Hawái, aunque el 98% de la producción mundial de aceitunas sigue siendo en la región del Mediterráneo. España, destaca como el líder con más de 50% de la producción del aceite de oliva, seguida de Italia, Grecia, Turquía, Siria, Túnez, Marruecos, Portugal y Argelia (COI, 2013b).

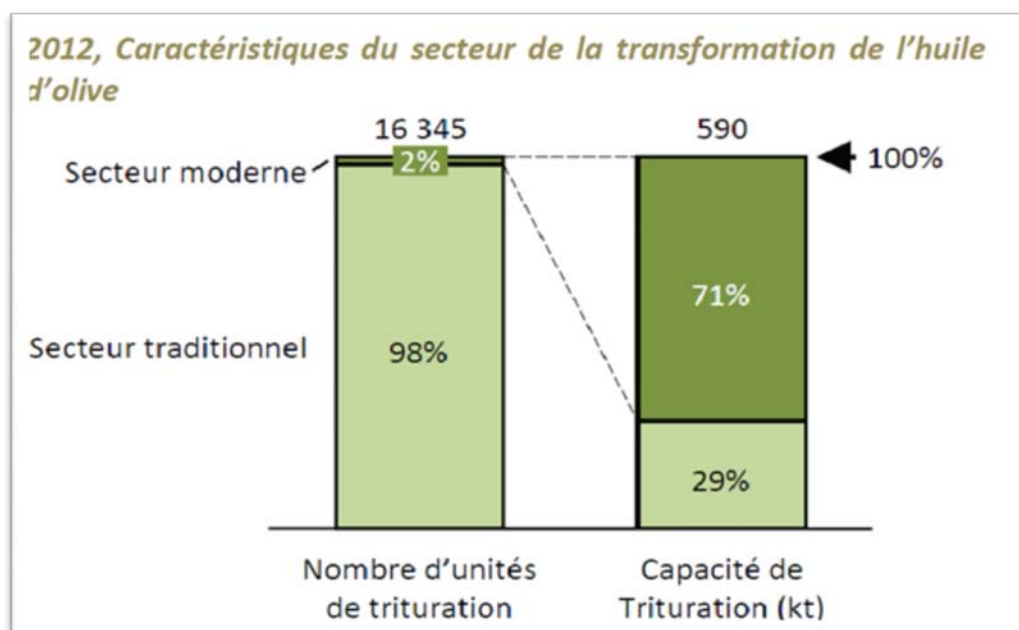
En Marruecos el olivar es la principal explotación frutícola con una superficie de 920 000 ha (Essiari et al., 2014) y alrededor de 75% de las aceitunas producidas se usa para la extracción del aceite (COI, 2012).

En el marco de la campaña 2011-2012, Marruecos alcanzó las 120 000 toneladas, lo que supone un record histórico para este país, con un aumento en la producción del aceite de oliva, respecto a la media de las ocho últimas campañas (COI, 2013b). Tanto el consumo, como la producción, han aumentado en los últimos años gracias al plan de expansión oleícola: Plan “Marruecos Verde” que ha puesto en marcha el gobierno marroquí para desarrollar y modernizar el sector agrícola (Tabla I.3).

<b>Superficie (ha)</b>	<b>1 220 000</b>
<b>Production totale d'olives (t)</b>	<b>2 500 000</b>
- Huile d'olive	330 000
- Olives de table	320 000
<b>Consommation nationale (kg/tête/an)</b>	
- Huile d'olive	4
- Olives de table	5
<b>Exportations (t)</b>	<b>120 000</b>
- Huile d'olive	150 000
- Olives de table	

**Tabla I.3.** Plan “Marruecos verde” para 2020: Objetivos del sector oleícola (COI, 2012).

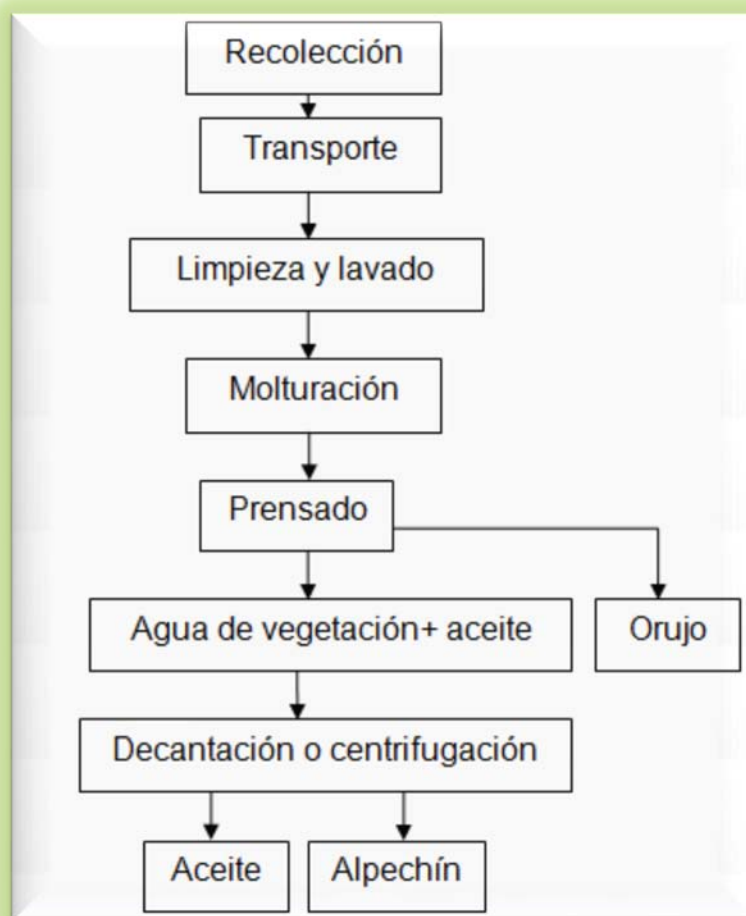
En Marruecos se distinguen dos sectores de la producción de aceite de oliva, uno llamado “sector tradicional”, formado de almazaras tradicionales o “maâsras” (llamadas así en Marruecos), y otro llamado “sector moderno” compuesto de almazaras semi-industriales e industriales (MAPM, 2013), (Figura I.3).



**Figura I.3.** Sector de la producción del aceite de oliva en Marruecos (MAPM, 2013).

El sector de almazaras tradicionales o de las “maâsras”, es el más extendido en el país con un porcentaje de 98% (MAPM, 2013). En efecto, el aceite de oliva producido en las “maâsras” es el más apreciado y preferido por la mayoría de los marroquíes e incluso lo consideran un aceite de la mejor calidad.

En las “maâsras” como en las almazaras semi-industriales la extracción de aceite se realiza por presión (Figura I.4) o por sistema discontinuo, mientras que en las almazaras industriales se practica el sistema continuo. Según el tipo de almazara, tres procesos de producción de aceite de oliva se distinguen en Marruecos: Proceso tradicional usado en las “maâsras”, proceso semi-industrial practicado en las almazaras semi-industriales y proceso industrial usado en las almazaras industriales.



**Figura I.4.** Sistema por presión de la producción del aceite de oliva en Marruecos.

### 1.5.1. Proceso tradicional.

El proceso tradicional es un método de extracción de aceite que ha sido empleado durante muchos siglos y sigue siendo el método más usado en Marruecos, con más de 16018 almazaras o “maâsras” (MAPM, 2013), que son generalmente de tipo familiar o conocidos y se encuentran localizadas cerca de las zonas del olivo.

Diferentes etapas existen en el proceso de extracción del aceite de oliva: recolección de las aceitunas, su transporte, su limpieza o lavado, su molturación y la separación del aceite del orujo y el del agua de vegetación.

### **- Recolección**

Para obtener un aceite de calidad, es fundamental recolectar la aceituna en el momento óptimo de maduración, cuando la mayoría está cambiando de color (envero), apenas quedan aceitunas verdes y algunas están completamente maduras. Los métodos de recolección han permanecido invariables durante siglos, sólo recientemente se han introducido nuevas técnicas para facilitar la recolección, tales como los vibradores. El método ideal de recolección es el ordeño, a mano. En el caso de las “maâsras”, generalmente, se golpean las ramas para hacer caer las aceitunas, este método, provoca la alteración física del fruto, y además gran parte de las aceitunas puede encontrarse directamente en contacto de la tierra, lo que ayuda a la contaminación del fruto por los posibles metales de transición.



### **-Transporte y almacenamiento**

El mejor medio de transporte de las aceitunas es la cajas de plástico con orificios especiales que permitan la ventilación y ayudan a dispersar el calor que puede ser producido por la actividad enzimática catabólica del fruto (Ibar Albiñana, 2002). Las aceitunas deben ser procesadas en la almazara lo más pronto posible y el almacenamiento debería ser lo más cortó para proteger la

calidad del aceite. En el caso de las “maâsras” las aceitunas se transportan en grandes cantidades, generalmente en los mismos sacos de plástico (de 50 kg) (Figura I.5) donde van a ser almacenadas. El almacenamiento prolongado de las aceitunas, es una etapa muy difícil a evitar en las “maâsras”, los sacos de plástico llenos de aceitunas se almacenan a temperatura ambiental durante días hasta meses, esperando el turno de la molturación.



**Figura I.5.** Aceitunas almacenadas en sacos de plástico de 50 Kg.

Muy poca cantidad de aceitunas puede ser molturada durante los primeros días de la recolección, la mayoría de los frutos van a ser molturados pasando un tiempo entre 20 y 45 días hasta 2 o 3 meses desde su recolección en las zonas de montañas (Chimi, 2001). Es importante comentar que la creencia de muchos agricultores es almacenar las aceitunas durante mucho tiempos, pensando que la fermentación de los frutos conduce a extraer un aceite “fuerte”, es decir de “la mejor calidad”, y generalmente adicionan una cantidad de sal (1%) a las aceitunas cuando el almacenamiento está programado por más tiempo (más de 45 días). La aceituna se deben molturar el mismo día de su recolección, ya que al ser un fruto con agua vegetal puede favorecer la fermentación y acelerar la oxidación del aceite. El tiempo de almacenamiento puede deteriora notablemente la calidad del producto final.

### ***-Limpieza y lavado de las aceitunas***

La etapa de limpieza y lavado de las aceitunas es fundamental para la obtención de aceite de mejor calidad. Esta etapa consiste en separar el fruto de otros componentes (hojas, ramas, tierra....) y eliminar las aceitunas dañadas y alteradas. Las aceitunas normalmente van a estar ya preparadas para el proceso de molturación. En las “maâsras” estas etapas son inexistentes, por diferentes motivos: en primer lugar estos tipos de almazaras se encuentran generalmente en zonas rurales, aisladas de fuentes de agua y electricidad, y en segundo lugar la falta de información del agricultor de que la limpieza de los frutos es muy importante para extraer un aceite de buena calidad.

### ***- Molturación***

La molturación es la técnica que rompe el fruto y permite la obtención del aceite contenido en sus células. Para este efecto, en el proceso tradicional se usan molinos de granito de una o dos ruedas, que se mueven por energía eléctrica o de forma manual (animal). Este último caso, es el más usado en las “maâsras” sobre todo en las de zonas de montaña, que emplean también molinos de una sola rueda y son de madera, y pueden estar al aire libre o protegida bajo una construcción.

Una cantidad aproximada de 400-1200 kg de aceitunas es molturada muy lentamente cada día, siendo la capacidad de producción de las “maâsras” de un 29% (MAPM, 2013).





*Figura I.6. Proceso de molturación en zona rural marroquí.*

### ***-Prensado***

La pasta de aceitunas obtenida de la molturación (una hora después), se coloca en capachos de esparto o fibra (de 5 a 10 kg de pasta), se somete al proceso del prensado con el fin de separar la parte sólida (orujo) de la fracción líquida que corresponde a la mezcla de aceite y agua de vegetación.

Por presión, fluye el mosto oleoso constituido por una mezcla de agua de vegetación y aceite que posteriormente hay que separar (decantación o centrifugación). Esta el caso de las “maâsras” este operación se repite varias veces (5-6), lo que favorece el mayor contacto de la pasta con el oxígeno (Concha-Herrera et al., 2010; Dabbou et al., 2011; Ruiz-Domínguez, 2013; Pizarro et al., 2013; Karabagias et al., 2013; Anwar et al., 2013; Ben-Hassine et al., 2013; Kalogeropoulos et al., 2014).

### ***-Decantación o centrifugación***

El líquido obtenido tras el proceso de prensado se somete a decantación o centrifugación, para favorecer la separación del aceite del agua de vegetación.



Este método se basa en la diferencia de pesos entre los pesos específicos del aceite y del agua.

En el caso de las “maâsras” el aceite se recupera después de una simple decantación y sin ser sometido al proceso de filtrado. Lo que puede indicar la presencia de agua de vegetación con el aceite y la formación de emulsiones que pueden ser el origen de su deterioro. Igual, en este caso los contenedores finales (destinados al consumidor) son generalmente de reciclaje, es decir que podrían haber sido usados anteriormente, para aceites, aguas o bebidas. El aceite en este caso puede encontrarse muy expuesto a cualquier tipo de contaminación o alteración.

### **1.5.2. Proceso semi-industrial.**

En Marruecos, el proceso semi-industrial se refiere al proceso discontinuo por presión, es decir tradicional y que se distingue del método usado en las “maâsras” por las siguientes diferencias:

- Se encuentran localizadas en zonas industriales.
- El molino es de granito, generalmente de 2 ruedas y se mueve por energía de eléctrica.
- Trituran una cantidad de oliva que puede llegar a 10 toneladas por día.
- El prensado se realiza por energía de electricidad
- La separación del aceite de agua de vegetación generalmente se realiza por centrifugación.

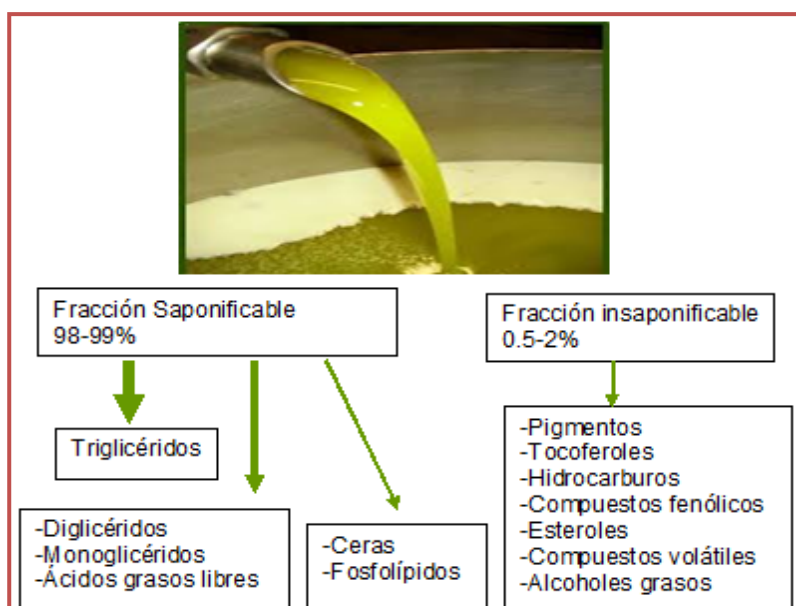
### **1.5.3. Proceso industrial.**

A nivel industrial se emplea el sistema continuo de extracción de dos y tres fases. En conjunto, el sector de las almazaras del proceso semi-industrial y del proceso industrial representa solo el 2% y llega a una capacidad de producción del 71% del total del aceite de oliva virgen extraído en el país (MAPM, 2013). Los aceites producidos en estas almazaras son generalmente destinados a la exportación.

## 1.6. Composición química del aceite de oliva.

Las grasas son, junto con las proteínas e hidratos de carbono, los principales componentes de los alimentos. La función principal es de fuente de energía, también desempeñan funciones como la de ser fuentes de ácidos grasos esenciales, favorecen el transporte de vitaminas liposolubles y confieren a los alimentos fritos la textura que los hace más apetecibles y les aporta buen sabor. Las grasas empleadas en la alimentación son de origen animal o vegetal; a estas últimas se les llama “aceites vegetales comestibles” y se dividen en dos grupos:

- Aceite de oliva, que se obtiene de la aceituna y es el principal lípido (95% del total) en la DM tradicional (Gallus et al., 2004; Visioli et al., 2004; Pauwels, 2011).
- Aceite de semillas, añadiendo el nombre de la semilla o fruto de donde procede. Los compuestos químicos del aceite de oliva pueden integrarse en dos grupos (Mataix et al., 1988): Fracción saponificable y fracción insaponificable (Figura I.7).



**Figura I.7.** Principales componentes del aceite de oliva (Mataix et al., 1988).

## **a) Fracción saponificable**

La fracción saponificable representa la mayor parte del peso del aceite de oliva (98-99%), formada por Triglicéridos y ácidos grasos libres.

### **Ácidos grasos**

Los ácidos grasos son moléculas formadas por una cadena de átomos de carbono y hidrógeno terminadas con un grupo metilo y un grupo carboxilo.

Los ácidos grasos se clasifican por la presencia de dobles enlaces en su molécula, pudiendo ser saturados (AGS) (sin dobles enlaces) o insaturados. Estos últimos, a su vez, pueden ser monoinsaturados AGMI (con un doble enlace) o AGPI (con dos o más dobles enlaces).

Los principales ácidos grasos presentes en el aceite de oliva son: mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), heptadecanoico (C17:0), heptadecenoico (C17:1), esteárico (C18:0), oleico (C18:1), linoleico (C18:2), linolénico (C18:3), araquídico (C20:0), eicosenoico (C20:1), behénico (C22:0) y lignocérico (C24:0).

La composición en ácidos grasos del aceite de oliva varía según una serie de factores entre ellos: la variedad (Amaral et al., 2010; Ruiz-Domínguez et al., 2013), zona geográfica (Karabagias et al., 2013), Irrigación (Dabbou et al., 2010), clima (García-Inza et al., 2014) latitud o altitud (eg., Spain, Tous et al., 1997; Australia, Mailer et al., 2010; Argentina, Ceci and Carelli, 2010; Italy, Orlandi et al., 2012), influencia de la calidad de las aceitunas (Gómez-Caravaca et al., 2013), tiempo de la cosecha (Dag et al., 2011) y los procesos de extracción (Zamora et al., 2001; Rotondi et al., 2004; Abaza et al., 2005; Ben Temime et al., 2006; Baccouri et al., 2007; Dag et al., 2009; Gonçalves et al., 2012).

El aceite de oliva se diferencia de otras grasas vegetales por su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados. El ácido oleico es el ácido graso monoinsaturado (AGMI) más abundante y representativo, del 53% al

83% de los ácidos grasos del aceite de oliva (COI, 2008). Entre los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), el ácido linoleico (omega 6) representa del 3.5 al 21.0 % de la composición total del aceite de oliva, mientras que ácido alfa linolénico (omega 3) representa valores de bajo o igual a 1%. Estos tipos de ácidos grasos llamados esenciales deben ser aportados al organismo a través de la alimentación. Entre los ácidos grasos saturados (AGS) se encuentra el ácido palmítico y el esteárico que representan entre 7.5-20% y 0.5-5% respectivamente (COI, 2008). Una dieta abundante en ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) se acompañaba de una reducción de mortalidad por múltiples causas (Sofi et al., 2008). El oleico, AGMI mayoritario en el aceite de oliva es considerado como un factor clave de los beneficios cardiovasculares de la dieta mediterránea (Pérez-Jiménez et al., 2007; Sofi et al., 2008; Sacks et al., 2009; Trichopoulou et al., 2009; López-Miranda et al., 2010; Carrillo Fernández et al., 2011).

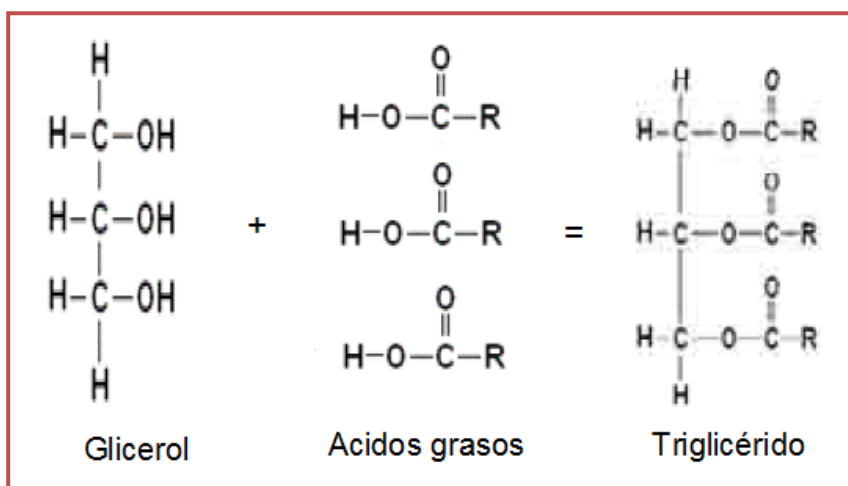
Igual, se demostró que los ácidos grasos saturados (AGS) incrementan el colesterol transportado en las LDL y en las HDL, los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) reducen ambas fracciones y los AGMI disminuyen la fracción transportada en las LDL, sin modificar o incrementar la contenida en las HDL (Mattson and Grundy, 1985).

Dentro de la categoría de AGPI existen dos familias; los omega-6 y los omega-3 con especial interés, debido a su importante función biológica y, especialmente, porque no pueden ser sintetizados por el organismo de los mamíferos. Son los llamados ácidos grasos esenciales, con funciones tales como el ser reguladores metabólicos en los sistemas cardiovascular, pulmonar, inmune, secretor y reproductor, el ser imprescindibles para preservar la funcionalidad de las membranas celulares y porque participan en los procesos de transcripción genética (Carrillo Fernández et al., 2011). Estos ácidos grasos, debido a que los seres humanos no pueden sintetizarlos, deben ser aportados por la dieta y una vez que nuestro organismo dispone de ellos, pueden ser alongados para generar ácidos grasos de cadena más larga como el eicosapentaenoicos (EPA, con 20 átomos de carbono) y el docosahexaenoico

(DHA, con 22 átomos de carbono y de gran importancia biológica, siendo el último de ellos el principal lípido estructural del cerebro (Harris et al., 2008).

### **-Triglicéridos**

Los triglicéridos son los constituyentes fundamentales de todos los aceites y grasas y se encuentran en un 95-98 % en el aceite de oliva (Nagy et al., 2005). Están formados por una molécula de glicerol esterificada con ácidos grasos.



**Figura 1.8.** Representación de la formación de un triglicérido.

La proporción de los ácidos grasos libres resultantes de la hidrólisis de los triglicéridos es la responsable del grado de acidez del aceite y su cantidad es muy importante en la clasificación del aceite.

### **-Mono y diglicéridos**

Los mono y diglicéridos se encuentran en pequeña cantidad: 0.25% y 1.3% de los ácidos grasos totales respectivamente, la presencia de estos compuestos en el aceite de oliva es indicativo que es de baja calidad (Mariani and Fedelicol, 1985).

### **-Ceras**

Las ceras son el resultado de una esterificación de los alcoholes presentes en el aceite con los ácidos grasos libres. La hidrólisis de los triglicéridos provoca un aumento de la proporción de ácidos grasos libres lo que conduce a la esterificación.

### **-Fosfolípidos**

El ácido oleico es el ácido graso predominante en la estructura de los fosfolípidos. El aceite de oliva recién producido puede contener cantidades pequeñas de fosfolípidos, entre 40 y 135 mg/Kg.

### **b) Fracción insaponificable**

La fracción insaponificable tiene los constituyentes minoritarios del aceite de oliva, del 0.5- 2 %, no reacciona con el hidróxido potásico o el hidróxido sodico para formar jabones y químicamente no están relacionados con los ácidos grasos. Es el caso de hidrocarburos, esteroides, tocoferoles, pigmentos, alcoholes grasos, compuestos volátiles, constituyentes aromáticos y compuestos fenólicos.

### **Hidrocarburos**

Los hidrocarburos presentan los componentes menos polares de la fracción insaponificable de los aceites vegetales. En el aceite de oliva se puede diferenciar los siguientes hidrocarburos: terpénicos, esteroideos y policíclicos aromáticos. En el aceite de oliva contiene dos hidrocarburos terpénicos en cantidades considerables:  $\beta$ -caroteno y escualeno.

## **Esteroles**

Los esteroides forman un amplio grupo de componentes que presentan una estructura molecular común. Se encuentran presentes en su forma libre o esterificada con ácidos grasos. El número, la posición de dobles enlaces y la naturaleza de la cadena lateral hacen distinguir varios esteroides entre ellos  $\beta$ -sitosterol (70-90 %). Se relaciona el contenido total de esteroides con la acidez libre; los aceites con un nivel alto de acidez se encuentran con valores altos de esteroides. La composición de esteroides puede ser afectada por diferentes factores como el sistema de producción del aceite y su almacenamiento del aceite.

## **Sustancias volátiles y aromáticas**

El aceite tiene un aroma y un sabor (unión entre el sabor y el olor) que son características distintivas del aceite de oliva de otros aceites comestibles. La presencia de un alto número de estas sustancias que en conjunto representan 250-500 ppm (Mataix., 2001) y son las responsables de su fragancia y sabor característico.

## **Pigmentos**

El aceite de oliva tiene un color que va desde el verde-amarillo hasta el dorado, es considerado como una característica importante de calidad, y depende de la variedad y del estado de madurez del fruto. Los responsables del especial color del aceite de oliva son los carotinoides, clorofila a y b (verdes) y feofitinas a y b (marrones). Los aceites de oliva que contienen pigmentos verdes deben estar protegidos de la luz durante su almacenamiento para minimizar los efectos de la oxidación (Kiritsakis, 1992).

## **Tocoferoles**

Los tocoferoles son compuestos heteroácidos de alto peso molecular. Se conocen 8 compuestos en la serie de tocoferoles que se encuentran en la

naturaleza, los cuales son derivados del 6-cromanol. Se han identificado varios tocoferoles como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ .

### **Alcoholes grasos**

Los alcoholes grasos presentes son constituyentes menores pero importantes en el aceite de oliva. Pueden ser utilizados para diferenciar los distintos tipos de aceites (Reglamento (CEE) N° 2568/91). Los alcoholes grasos pueden ser lineales (alifáticos), triterpénicos o diterpenoides.

### **Compuestos fenólicos (CP)**

Los CP presentes en el aceite de oliva constituyen una fracción muy compleja formada por un número muy elevado de compuestos, algunos todavía por identificar. Los CP del aceite han demostrado ser implicado en la prevención del desarrollo de una serie de enfermedades al tener efectos en la aumentación de las concentraciones del colesterol lipoproteína de alta densidad (HDL) (Covas et al., 2006; Estruch et al., 2006) y en la reducción de la oxidación del colesterol lipoproteína de baja densidad la (LDL) (Gimeno et al., 2007; De la Torre-Carbot et al., 2007; Gonzalez-Santiago et al., 2010). Estudios realizados *in vitro* muestran el efecto eficaz de CP para inhibir la proliferación, la migración y la invasión de las células del cáncer de próstata y el cáncer de mama (Elnagar et al., 2011). Los CP derivados de aceite de oliva virgen han mostrado tener acciones significativa en la capacidad antiinflamatoria, tanto *in vivo* como *in vitro* (Corona et al., 2009; Khymenets et al., 2009). CP han mostrado capaz de inhibir factor de necrosis tumoral a nivel de los monocitos que juegan un papel significativo en el desarrollo de enfermedades causantes de inflamación (Gong et al., 2009; Dell'Agli et al., 2010). Otros estudios han mostrado la capacidad de CP por su actividad terapéutica beneficiosa para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Li et al., 2009; Pitt et al., 2009), se ha observado una disminución del 40 % del Alzheimer en poblaciones que consumen una dieta de tipo mediterránea (Scarmeas et al., 2009).



Los CP contribuyen de manera importante a la calidad sensorial del aceite (Angerosa et al., 2000; Andrews et al., 2003; Gutiérrez-Rosales et al., 2003; Lesschaeve et al., 2005; Beltrán et al., 2007; García-Mesa et al., 2008; Santosa, 2010). Como a su estabilidad oxidativa (Velasco et al., 2002; Van der Sluis et al., 2005; Mateos et al., 2005).

La cantidad y la composición de los polifenoles en el aceite de oliva está relacionada con diferentes factores naturales: clima, geografía, variedad, estado de maduración, (Cicerale et al., 2009; Issaoui et al., 2009, 2010; Dabbou et al., 2010; García-González et al., 2010; Ouni et al., 2011; Manai-Djebali et al., 2012; Anwar et al., 2013; Ben-Hassine et al., 2013; Dagdelen et al., 2013), los sistemas de extracción, temperatura y tiempo de molturación (Servili et al., 2008; Taticchi et al., 2013; Ben-Hassine et al., 2013; Reboredo-Rodríguez., 2014; Kalogeropoulos et al., 2014), el estado biológico de las aceitunas (Gómez-Caravaca., 2013).

Diferentes grupos de compuestos fenólicos están presentes en el aceite de oliva, como ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, flavonoides, lignanos y secoiridoides (Figura I.9).

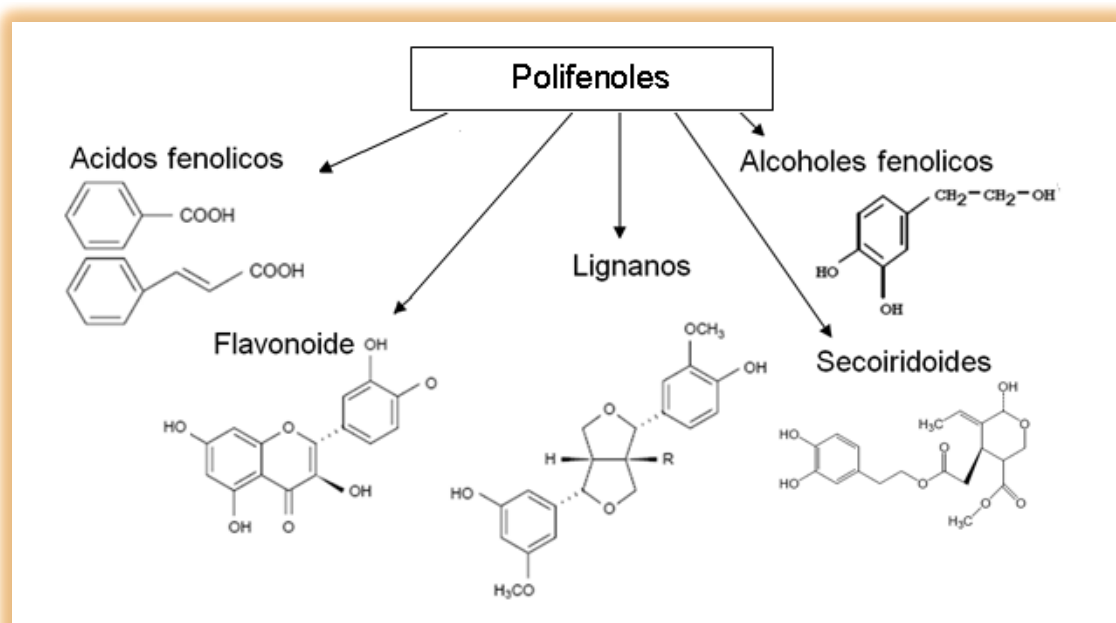


Figura I.9. Principales clases de polifenoles presentes en el aceite de oliva.

### ***-Ácidos fenólicos***

El término ácidos fenólicos, en general, describe los fenoles que poseen un grupo carboxílico ácido funcional.

Los fenoles ácidos encontrados en la oliva se distinguen principalmente en dos grupos: ácidos benzoicos y ácidos cinámicos.

Ácidos benzoicos: ácido benzoico, p-hidroxibenzoico, gálico, siríngico, protocatequico, y vanílico.

Ácidos cinámicos: ácido cinámico, p-cumárico, o-cumárico, cafeico, ferúlico, y sinapico están presentes en productos de la aceituna (Ryan and Robards, 1998; Tuck and Hayball, 2002; Pinelli, 2003; Garcia et al., 2003; Yang, 2007).

Los ácidos fenólicos se asocian con el color y con las propiedades sensoriales al igual que con los beneficios sobre la salud y a las propiedades antioxidantes (Maga, 1978). Shahidi y Nacsk (1995) han evaluado el contenido y el perfil de los fenoles ácidos en la conservación de los alimentos.

### ***-Secoiridoídes***

Los principales fenoles glucósidos identificados en el fruto del olivo de diferentes variedades en las etapas de maduración son oleuropéina y demeteloleuropeína (Obied et al, 2008; Gómez-Rico et al., 2008).

Oleuropéina es el principal glucósido secoiridoideo presente en la aceituna.

Durante los procesos de la molienda y malaxación, la oleuropéina y demeteloleuropeína son hidrolizadas por enzimas endógenas. Los aglicones son solubles en la fase del aceite mientras que los glucósidos pueden pasar en la fase del alpechín. Otro secoiridoideo de interés presente en el aceite de oliva es el ligustrósido. El contenido en derivados de ligustrósido aglicona y de la forma aldehídica de la oleuropéina aglicona se han relacionada con las propiedades sensoriales de amargo y picante (Tovar et al., 2001; Mateos et

al., 2004). Oleuropéina se considera como el principal responsable del gusto amargo de las aceitunas (Andrews, 2003).

### ***-Alcoholes fenólicos***

Los alcoholes fenólicos: hidroxitirosol o (3,4-dihidroxifenil) etanol, tirosol o (p-hidroxifenil) etanol y (3,4- dihidroxifenil) etanol glucósido, son identificados durante almacenamiento del aceite de oliva (Segura-Carretero et al., 2010). Son derivados secoiridoides resultados de la hidrólisis enzimática de oleuropéina, ligstroiside y demetiloleuropeina (Montedoro et al., 2002). Los compuestos alcoholes fenólicos son conocidos como constituyen cuantitativamente de la fracción fenólica más significativa del aceite de oliva (Mateos et al., 2001; Lerma-García et al., 2009) y como compuestos con la actividad antioxidante más potente (Artajo et al., 2006). Los fenoles, y en particular el hidroxitirosol, oleuropéina y sus derivados, contribuyen bastante a la estabilidad de oxidación del aceite (Papadopoulos and Boskou, 1991; Rice-Evans et al., 1996).

### ***-Flavonoides***

Los flavonoides se subdividen en flavonas, flavonoles, flavanones y flavanoles. Los flavonoides tienen un efecto beneficioso contra algunos cánceres y enfermedades coronarias (Nestel, 2003; Kanadaswami et al., 2005). Varios autores indican la presencia de los flavonoides de tipo luteolina y apigenina en aceite de oliva (Rovellini et al., 1997; Ryan et al., 2003; Murkovic et al., 2004; Morelló et al., 2005; Carrasco-Pancorbo et al., 2006; Ocakoglu et al., 2009).

### ***-lignanós***

La presencia de lignanos tales como el pinoresinol y el acetoxipinoresinol se han detectado también en la fracción fenólica de aceites de oliva (Brenes et al., 2000; Yang et al., 2007).

## **2. OXIDACIÓN Y ANTIOXIDANTES**

### **2.1. Radicales libres.**

Un radical libre (RL) se define como especie química neutra o con uno o más electrones desapareados en sus orbitales (Fridovich, 1978), lo que lo convierte en un compuesto altamente inestable capaz de formar otros radicales libres. Para alcanzar su estabilidad molecular el RL reacciona con otras moléculas cercanas de los lípidos o proteínas de la membrana celular, cediendo o captando un electrón para compensar este orbital incompleto y como consecuencia se desestabiliza la configuración electrónica de la molécula atacada, que perdiendo un electrón, se convierte a su vez en radical libre, y de esta manera se puede iniciar una reacción en cadena (Halliwell, 1993), que puede dañar muchas células.

Las fuentes exógenas de radicales libres son muy diversas; como la exposición ambiental a la luz UV, radiación X, radiación gamma, contaminantes, el tabaco, y el metabolismo de algunos fármacos (Gilbert and Colton, 1999; Brook et al, 2004).

A nivel del organismo, los factores que favorecen la generación de radicales libres pueden ser procesos oxidantes metabólicos, respiración celular, acción de enzimas oxidativas y reacciones inflamatoria. Las mitocondrias se consideran como las principales que consumen más del 90% del oxígeno presente en el organismo. Otra fuente endógena de radicales libres son las células fagocíticas, que destruyen células infectadas por bacterias o virus dan lugar a oxidantes como  $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ , NO y  $OCl^-$ . En este caso los radicales libres juegan un papel positivo en el organismo, formando parte de la defensa inmunitaria (Diplock et al., 1998), sin embargo, las células sanas pueden ser dañadas si no hay un control suficiente por los antioxidantes (D'Odorico et al., 2001).

El exceso de radicales libres puede superar la defensa antioxidante en el organismo y provocar un desequilibrio llamado estrés oxidativo (Rezaie et al., 2007; Zhu and Li, 2012). Este efecto puede deberse a un aporte insuficiente en la dieta de antioxidantes, a una producción excesiva de radicales libres durante el metabolismo de fármacos, o por una activación excesiva del sistema celular (Halliwell, 1996). También el avance en la edad mostró una reducción significativa a nivel de sistemas de defensa enzimáticos (El haouhay et al., 2003).

Los radicales libres causan daño al capturar electrones de los lípidos y proteínas de la membrana celular, que entonces no podrá cumplir sus funciones. A nivel de la célula, los RL reaccionan con componentes moleculares y son capaces de modificar la estructura de membrana celular; provocando cambios en sus propiedades fisicoquímicas, aumentando su permeabilidad y perdiendo progresivamente sus funciones como el intercambio de nutrientes y descartar los materiales de desecho celular, complicando el proceso de regeneración y reproducción celular. También los RL pueden atacar a las proteínas oxidando los aminoácidos y impidiendo el normal desarrollo de sus funciones; enzimas que regulan el metabolismo celular, transportadores iónicos de membranas, receptores y mensajeros celulares (Davies, 1987; Stadtman, 1992). La molécula ADN (ácido desoxirribonucleico) es además un objetivo de ataque de RL. Su daño produce bases modificadas, teniendo una serie de consecuencias en el desarrollo de mutaciones y carcinogénesis por una parte, o la pérdida de expresión por daño al gen específico y muerte celular o apoptosis por otra parte (Droge, 2002; Dincer et al., 2007; Moret et al., 2012).

Los radicales libres se han asociado, con el desarrollar de diversas enfermedades inflamatorias, aterosclerosis, cáncer, enfermedades cardiovasculares y enfermedades degenerativas (Uttara et al., 2009; Yu et al., 2009; Beltrán et al., 2010; Almenier et al., 2012; Zhu and Li, 2012; Moret et al., 2014).

### **2.1.1. Tipos de radicales libres.**

Existen diferentes tipos de RL, los derivados del oxígeno; “Especies Reactivas de Oxígeno” o “Reactive Oxygen Species” (ROS) y los “Especies Reactivos de Nitrógeno”, o “Reactive Nitrogen Species” (RNS), que contengan nitrógeno en su estructura. Las principales especies reactivas que se encuentran a nivel del organismo son:

- Oxígeno molecular singlete ( $O_2$ ): especie no radicalaria excitada que se forma por exposición a la luz UV. Presenta toxicidad baja.
- Anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ): su formación ocurre a nivel de la cadena de transporte de electrones, a través de la membrana mitocondrial interna. En este proceso el oxígeno ( $O_2$ ) actúa como aceptor final de electrones ( $e^-$ ) y su reducción puede llevar a reacciones intermedias con el resultado de la formación de diferentes RL.
- Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ): se forma cuando el radical superóxido capta dos protones. Tiene pocas estructuras diana oxidables y es fácilmente transformado en agua por las enzimas catalasas (Del Rio et al., 1992).
- Radical Hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) es altamente reactivo, ataca a la mayoría de las estructuras celulares, y actúa inmediatamente en el lugar en el que se produce (Diplock et al., 1998) o cerca de su sitio de formación (Finley et al., 2011).
- Radicales peróxido ( $ROO^{\bullet}$ ): son capaces de combinarse con átomos de hidrogeno de otro ácido graso, iniciando reacciones en cadena que pueden transformar los ácidos grasos de la membrana en hidroperóxidos (Halliwell, 1991). El peróxido más simple es el radical

hidroperoxil o perhidroxil ( $\text{HOO}\cdot$ ) que es la forma protonada del ion superóxido  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (De Grey, 2002).

- Óxido nítrico (NO): tiene una doble función, con efectos beneficiosos en el organismo y dañinos. Importante función como neurotransmisor, mediador de la respuesta inmune y regulador en la agregación plaquetaria y relajación de la musculatura vascular lisa. Actúa también, destruyendo células y tejidos jugando un papel significativo en la aparición de enfermedades inflamatorias, como diabetes aterosclerosis y artritis.

### **2.1.2. Reacciones de los radicales libres.**

Los RL pueden actuar sobre diversas componentes celulares, en especial los lípidos, sobre todo, los ácidos grasos poliinsaturados, que son las biomoléculas más susceptibles de ser atacados por estas especies reactivas (Cheeseman and Slater, 1993). El proceso oxidativo de los lípidos o peroxidación lipídica conduce al deterioro de los ácidos grasos que componen las membranas celulares, y se realiza durante diferentes etapas: (Figura I.10) (Arana Molina, 2006).

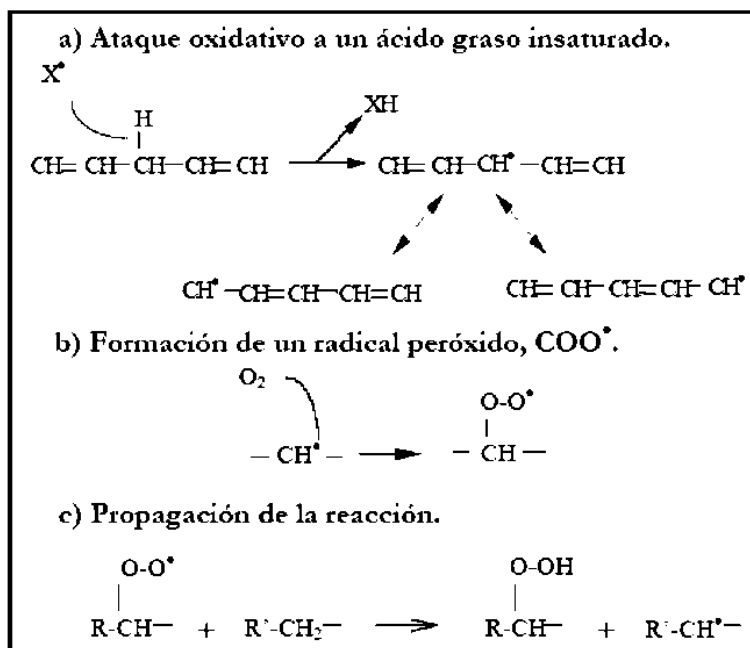


Figura I.10. Principales etapas de la peroxidación lipídica.

- Fase de iniciación o ataque oxidativo de los ácidos grasos: se forman los radicales libres por la presencia de un agente iniciador. La peroxidación se inicia cuando se extrae un átomo de hidrógeno de uno de los grupos  $-\text{CH}-$  de la cadena carbonada dejando un electrón no apareado en el átomo de carbono.
- Fase de formación de radical peróxido,  $\text{COO}^\bullet$ : el radical de carbono formado se convierte en una molécula altamente reactiva que se combina rápidamente con el oxígeno para dar lugar a radicales peróxido ( $\text{COO}^\bullet$ ).
- Fase de propagación de la reacción: los radicales peróxido ( $\text{COO}^\bullet$ ), a su vez, son capaces de combinarse con átomos de hidrógeno de otros ácidos grasos, iniciando reacciones en cadena que pueden continuar hasta que los ácidos grasos de la membrana hayan sido completamente oxidados a hidroperóxidos.



- Fase de terminación: se detiene la reacción por neutralización entre los radicales o por la inactivación de estos, en presencia de sustancias antioxidantes como: glutatión, tocoferoles, carotinoides, fenoles, etc.

## **2.2. Sistemas de defensa antioxidante.**

Las células están provistas de un gran cantidad de sistemas de defensa antioxidantes (Halliwell, 1996). Se define como antioxidante aquella sustancia que presente a baja concentración respecto a las de un sustrato oxidable, retarda o previene su oxidación (Halliwell, 1995). El antioxidante, al reaccionar con el radical libre cede un electrón, se oxida y se transforma en un radical libre, débil no tóxico, estable e incapaz de propagar la reacción. Y por lo tanto, proteger las moléculas del daño producido por los RL (Halliwell, 1986; Fridovich, 1989).

Existen dos tipos de sistemas antioxidantes: el primero endógeno, se basa en un sistema enzimático de defensa específico y variado, presente en el sitio de lo RL, que los mantiene a bajas concentraciones. Este grupo de sistemas incluye la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (GRd) y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Estas enzimas interactúan entre sí y previenen el daño oxidativo metabolizando los RL tóxicos producidos como consecuencia del metabolismo respiratorio normal o durante el estrés oxidativo. El segundo sistema es de antioxidantes no enzimáticos, denominados antioxidantes exógenos, incluye el tocoferol (vitamina E), el manitol, el ascorbato (vitamina C), el glutatión, el ácido úrico, la melatonina, el escualeno, los carotenoides y los compuestos fenólicos. A diferencia de los antioxidantes enzimáticos, estos otros reaccionan con los radicales libres y modifican su estructura, es decir, los capturan o neutralizan, y se oxidan en el proceso, haciéndose un radical libre débil, no tóxico que es estable e incapaz de propagar la reacción. No obstante, algunos metales, como selenio, cobre, zinc y magnesio, que en ocasiones forman parte de la estructura molecular de las enzimas antioxidantes, también son fundamentales en este mecanismo de protección celular.

Según sus mecanismos de acción, los antioxidantes se clasifican en primarios, secundarios ó terciarios:

### ***-Antioxidantes Primarios***

Previenen la formación de las especies reactivas del oxígeno (ROS), convirtiéndolas en moléculas menos perjudiciales, o evitan su producción a partir de otras moléculas, como es el caso de la quelación de los iones metálicos implicados en el proceso de oxidación.

### ***-Antioxidantes Secundarios***

Capturan radicales libres formados, impidiendo reacciones en cadena que aumenten el daño celular. Inhiben la generación de ROS, entre ellos se encuentra superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión pero-xidasa (G-Px). Estas enzimas son antioxidantes biológicos que actúan directamente sobre los radicales libres, neutralizando los especies reactivos de oxígeno (ROS) (Haskins et al., 2003; Puiggrós et al., 2005; Oliveras-López et al., 2014). La SOD cataliza la reacción de  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  y la CAT y GPx catalizan el  $H_2O_2$  a  $H_2O$  (Moret et al., 2014). La superóxido dismutasa además ha sido ampliamente caracterizada como enzima antiapoptótica (Bernard et al., 2001). Otras enzimas han sido indicadas en la inhibición de la propagación de la formación de ROS, como albúmina, Bilirrubina (Assad et al., 2001) y Ubiquinonas (coenzima Q) (Bentiger et al., 2007).

### ***-Antioxidantes Terciarios***

Reparan o eliminan las biomoléculas dañadas. En este grupo se incluyen las enzimas reparadoras del ADN (Page et al., 2009) y la metionina sulfóxido reductasa.

Para prevenir tales complicaciones, un suministro exógeno de antioxidantes en la dieta es necesario, para reforzar la defensa de antioxidantes endógenos y enfrentarse a situaciones en las cuales se producen radicales libres en exceso.

Numerosos estudios realizados en voluntarios, han destacado las propiedades que tienen ciertos alimentos de la dieta, tras el consumo, como son el té verde (Koutelidakis et al., 2009), chocolate (Schroeter et al., 2006; Vetrani et al., 2014) y el aceite de oliva (Oliveras-López, 2005; Perona et al., 2006; Salvini et al., 2006; Covas, 2007; Samaniego-Sánchez, 2010; Oliveras-López, 2014) para modular la capacidad antioxidante total del plasma.

### **2.3. Antioxidantes presentes en el aceite de oliva.**

El aceite de oliva es el principal componente graso de la dieta mediterránea (Willett et al., 1995), sus propiedades saludables están atribuidas a su alto contenido en ácido graso monoinsaturados (MUFA) (Tripoli et al., 2005; Fitó et al., 2005, 2007; Carluccio et al., 2007; Gimeno et al., 2007) y también a su contenido en múltiples componentes menores, con propiedades antioxidantes y actividades biológicas importantes (Perona et al., 2006; Fitó et al., 2007; Oliveras-López et al., 2013).

Entre los principales antioxidantes del aceite de oliva se encuentran los polifenoles (Trípoli et al., 2005; Oliveras-López, 2005; Perona et al., 2006), tocoferoles, carotenoides (Beltrán et al., 2005; Hrnčirik and Fritsche, 2005; Samaniego-Sánchez et al., 2012) y escualeno (Mateos et al., 2003; Samaniego-Sánchez et al., 2010).

El  **$\alpha$ -tocoferol** es el formato más común a la vitamina E, forma una fuente bioactiva importante del aceite de oliva (Tsimidou, 2010) y es el principal antioxidante liposoluble del organismo humano, que ha mostrado actividad biológica muy alta frente a los reactivos del oxígeno (ROS) en los sistemas biológicos, tiene efectos positivos frente a células dañadas en diferentes tipos de cáncer, protección del sistema inmune y previene contra enfermedades cardiovasculares (Bramley et al., 2000; Schneider, 2005).

El  **$\beta$ -caroteno** es el más abundante en el aceite de oliva y es el más importante precursor de la vitamina A, actúa como un potente antioxidante

capaz de bloquear el oxígeno singlete en forma activa de oxígeno, impidiendo la oxidación lipídica. Estos efectos antioxidantes de  $\beta$ -caroteno han sido descritos en el aceite de oliva virgen (Beltrán et al., 2005; Hrnčirik and Fritsche, 2005). Presenta propiedades antioxidantes y proapoptóticas, disminuyendo el crecimiento epitelial prostático en tumores andrógeno-independientes, reduciendo los factores de crecimiento insulínicos y protegiendo contra enfermedades cardiovasculares (Platz and Giovannucci, 2006; Key et al., 2007; Von Low et al., 2007; Britton et al., 2008).

El **escualeno** es una fuente bioactiva importante del aceite de oliva (Tsimidou, 2010; Samaniego-Sánchez et al., 2010), ha mostrado tener propiedades antioxidantes capaces de reforzar el sistema de antioxidantes endógenas frente al daño oxidativo (Mateos et al., 2003; Tsimidou, 2010).

Los **compuestos fenólicos (CP)** presentes en el aceite de oliva forman una fracción muy compleja constituida por un número muy elevado de compuestos, algunos todavía por identificar. Estos compuestos han mostrado estar implicados en la prevención del desarrollo de una serie de enfermedades al tener efectos significativos sobre los radicales libres (Goya et al., 2007; Cioffi et al., 2010), reducen la oxidación lipídica por inhibición de la iniciación o de la propagación de la oxidación, al inactivar o eliminar los radicales libres (Cerretani and Bendini, 2010). Los CP han sido identificados como potentes antioxidantes para reducir la oxidación del ADN y de los lípidos (Toshima et al., 2000; Marrugat et al., 2004; Oliveras-López, 2005; Hillestrøm et al., 2006; Covas et al., 2006; De la Torre-Carbot et al., 2007; Paiva-Martins et al., 2009; Loru et al., 2009; De la Torre-Carbot et al., 2010).

Investigaciones han puesto de manifiesto como el aceite de oliva rico en CP modula beneficiosamente el equilibrio entre el glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) (Oliveras-López, 2005; Visioli et al., 2005; Salvini et al., 2006; Bogani et al., 2007; Oliveras-López et al., 2014) y reduce el daño oxidativo en los glóbulos rojos, células renales e intestinales (Paiva-Martins et al., 2009; Loru et al., 2009).

Es importante conocer los efectos antioxidantes de los compuestos fenólicos del aceite de oliva, teniendo especial interés aquellos que poseen grupos orto-difenólicos. (Mateos et al., 2003; Bouaziz et al., 2005), como el hidroxitirosol, decarboximethyl oleuropéina aglicona y oleuropéina aglicona (Bendini et al., 2007).

#### **2.4. Medida de la actividad antioxidante.**

Es una medida básica en la determinación del potencial antioxidante y del valor biológico de producto alimentario (Kuskoski et al., 2005) y se considera un parámetro importante para la determinación de la calidad y del valor nutritivo del aceite (Koidis and Boskou, 2015).

Recientemente, la actividad antioxidantes está ampliamente estudiada en productos vegetales (Li et al., 2012; Shahat and Marzouk, 2013; Zenil Lugo et al., 2014; Sochor et al., 2014).

Debido a la complejidad de los procesos de oxidación es obvio que no existe un único método de prueba, que refleja de forma completa el perfil antioxidante de la muestra estudiada (Pérez-Camino et al., 2003). Los métodos descritos miden la actividad global de todos los antioxidantes (conocidos o no) presentes en la muestra (Ivekovic et al., 2005). Prior et al. (2005) definieron una serie de características “ideales”: que sea fácil, con un mecanismo químico y punto final fijo, instrumentación disponible, buena reproducibilidad, adaptable a ensayos con antioxidantes hidrofílicos y lipofílicos y con diferentes fuentes generadoras de radicales, y un elevado rendimiento de análisis. Otras características a establecer para fijar un método “ideal” de medida de la capacidad antioxidantes incluye: a) rango analítico, b) recuperación, c) repetibilidad, d) reproducibilidad, y reconocimiento de sustancias que puedan interferir en el análisis (Prior et al., 2005).

Los componentes antioxidantes actúan inhibiendo o captando las especies reactivas, reduciendo sus acciones o actúan como quelantes de metales

(Leonarduzzi et al., 2010). Los antioxidantes pueden inactivar los radicales libres por transferencia de un átomo de hidrogeno o por transferencia de un electrón. Ambos tipos de reacciones pueden ocurrir en el mismo tiempo. Y el mecanismo dominante tendrá que ser determinado a través de estructura y propiedades del antioxidante; la solubilidad, el coeficiente de partición, el solvente del sistema, la energía de disolución y el potencial de ionización (Prior et al., 2005). Así que la capacidad antioxidante de un alimento está determinada por un conjunto de diversas sustancias con diferentes mecanismos de acción. De hecho, es importante la determinación de la capacidad antioxidante *in vitro*, aplicando más de un método (Pérez-Jiménez et al., 2008).

Los métodos usados para medir la capacidad antioxidante de una sustancia se clasifican en dos grupos: métodos indirectos y métodos directos (Tabla I.4) (Samaniego Sánchez, 2006).

En los métodos indirectos se emplea una diana como punto de detección, la presencia de los radicales produce una pérdida o aparición de este reactivo y la presencia de antioxidantes produce un aumento o pérdida de la señal. Entre los ensayos usados en este caso se incluyen; ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) (Prior et al., 2005) y TRAP (Total Radical-Trapping Antioxidant Parameter) (Serafini et al., 2000).

	Método	Fundamento	Determinación de la actividad antioxidante
Captura de Radicales Superóxido	Ensayo de Hipoxantina/Xantina Oxidasa <sup>1</sup>	El superóxido generado enzimáticamente reacciona con el azul de tetrazolio, se absorbe a 560 nm	Inhibición de la formación de azul de formazán y de A <sub>560</sub>
Captura de Radicales Peroxilo	TRAP <sup>2</sup>	Producción de peroxilos por descomposición térmica de AAPH, con consumo de oxígeno	Medida de la fase de retardo en el consumo de oxígeno
	Modificaciones del TRAP <sup>3</sup>	Los radicales peroxilo oxidan a una proteína produciendo fluorescencia.	Medida de la fase de retardo en la aparición de la fluorescencia
	ORAC <sup>4</sup>	Los radicales peroxilo oxidan a la ficoeritrina o fluoresceína y disminuye su fluorescencia	Mantenimiento de la fluorescencia (AUC)
Captura de Radicales Hidroxilo	Ensayo de la Desoxirribosa <sup>5</sup>	Generación de OH por la reacción de Fenton, que ataca a la desoxirribosa. Determinación de los productos por el ensayo TBARS	Inhibición de la oxidación de la desoxirribosa
Captura de radicales Peroxinitrito	Método de la Dihidrorrodamina <sup>6</sup>	Los peroxinitritos oxidan la dihidrorrodamina 123 y pierde su fluorescencia	Mantenimiento de la fluorescencia
Poder Reductor	FRAP <sup>7</sup>	Formación de un complejo Fe <sup>3+</sup> -TPTZ	Reducción del complejo Fe <sup>3+</sup> a Fe <sup>2+</sup> , y aumento de la absorbancia a 593 nm
Captura de radicales sintéticos	Método ABTS <sup>8</sup> Método DPPH <sup>9</sup> Método DMPD <sup>10</sup>	Radicales coloreados con máximo de absorbancia a 414, 515, 505 nm	Disminución de la absorbancia

Refs: <sup>1</sup> De Gaulejac et al., 1999; <sup>2</sup> Wayner et al., 1985; <sup>3</sup> Ghiselli et al., 1995; <sup>4</sup> Cao et al., 1999; <sup>5</sup> Sánchez- Moreno, 2002; <sup>6</sup> Kooy et al., 1994; <sup>7</sup> Benzie et al., 1996; <sup>8</sup> Cano et al., 1998a; <sup>9</sup> Sánchez- Moreno et al., 1998; <sup>10</sup> Fogliano et al., 1999.

Tabla I.4. Principales métodos de determinación de captura de radicales libres.

En los métodos directos el radical se emplea como un factor de cuantificación, así la adición del antioxidante provoca una disminución de la señal debida al radical. El empleo del antioxidante puede ser antes o después a la generación del radical (Arnao et al., 1998). En el ensayo de post-adición se forma el radical en ausencia de la muestra, hasta obtener una señal estable. Cuando se añade la sustancia antioxidante la concentración del radical disminuye y se puede medir el descenso de señal producido. En el ensayo de inhibición, la muestra se une a los sustratos de oxidación antes de la generación del radical y la reacción comienza con la adición del oxidante.

Una amplia aplicación del método en directo es la prueba de Folin-Ciocalteu (Singleton et al., 1965), que permite la estimación de la capacidad reductora de moléculas fenólicas. En los ensayos de cuantificación de uso más extendido se emplea DPPH (2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) (Brand-Williams et al., 1995), ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Miller et al., 1993), FRAP (ferric reducing antioxidant power) (Benzie and Strain, 1996) y DMPD (*N,N*-dimethyl-1,4-diaminobenzene) (Fogliano et al., 1999).

A continuación se describen con mayor detalle estos cinco métodos empleados en el presente trabajo.

#### **2.4.1. Ensayo Folin-Ciocalteu**

El ensayo de Folin-Ciocalteu es un método comúnmente utilizado en el área de agroquímica e industrias alimenticias, por su simplicidad y por la disponibilidad comercial del reactivo. El método se fundamenta en el carácter reductor de los polifenoles. Emplea como reactivo una mezcla de ácido fosfotúngstico y ácido fosfomolibdico, en medio básico, que se reduce al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $Mo_8O_{23}$ ). La absorbancia del color azul desarrollado es máxima en torno a los 725 nm, proporcional a la concentración total de polifenoles y se expresa como índice



de Folin-Ciocalteu. Se trata la muestra con el reactivo de Folin-Ciocalteu en presencia de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Los resultados obtenidos con este método espectrofotométrico se pueden correlacionar perfectamente con los test de capacidad antioxidante realizados en el aceite de oliva (Samaniego-Sánchez, 2006).

El compuesto fenólico determinado por el ensayo de Folin-Ciocalteu más frecuentemente expresado en equivalentes de ácido gálico (Ainsworth and Gillespie, 2007), aunque sea por aceite de oliva virgen, la expresión con respecto a otras normas, tales como tirosol, ácido 3,4-dihidroxifenil o el ácido cafeico (Lafka et al., 2011) también se utiliza. La reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu no es selectiva debido a la determinación contemporánea de todo tipo de moléculas fenólicas (fenoles y o-difenoles) en el extracto de aceite de oliva.

#### **2.4.2. Ensayos de la medida de la capacidad antioxidante.**

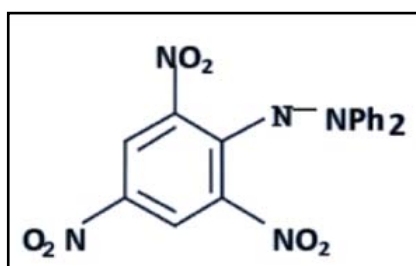
Existen diversos métodos para evaluar la actividad antioxidante (Robards et al., 1999; Cintra et al., 2001; Antolovich et al., 2002; Moreira et al., 2003), ya sea *in vitro* o *in vivo*. Una de las estrategias más aplicadas en las medidas *in vitro* de la capacidad antioxidante total de un compuesto, mezcla o alimento, consiste en determinar la actividad del antioxidante frente a sustancias cromógenas de naturaleza radical; la pérdida de color ocurre de forma proporcional con la concentración del antioxidante (Arena et al., 2001; Moyer et al., 2002).

La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; igual depende del microambiente en que se encuentra el compuesto. Los compuestos interactúan entre sí pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios (Kuskoski et al., 2005).

**-DPPH (2, 2- Difenil-1-picrilhidrazilo)**

El DPPH es un método más aplicado en la determinación de la capacidad antioxidante de productos naturales (Prior et al., 1998; Arnao, 2000; Antolovich et al., 2002; Montoya et al., 2003).

El DPPH<sup>•</sup> es un radical libre que puede obtenerse directamente sin una preparación previa, es uno de los pocos radicales que produce soluciones de color profundamente púrpura, es disponible en el comercio. Se puede disolver solo en medio orgánico, puede ser neutralizado por reducción directa a través de la transferencia de electrones o por eliminación radical a través de la transferencia de un átomo de hidrógeno (Prior et al., 2005), (Figura I.11).



**Figura I.11.** Estructura química de DPPH.

El antioxidante reacciona con el radical DPPH<sup>•</sup> disuelto en mezclas de diferentes solventes (por ejemplo, el metanol, metanol/agua) (Fernandez-Orozco et al., 2011). El efecto o la capacidad del componente antioxidante es proporcional a la decoloración de la solución del radical DPPH<sup>•</sup> en presencia de la muestra (Brand-williams et al., 1995).

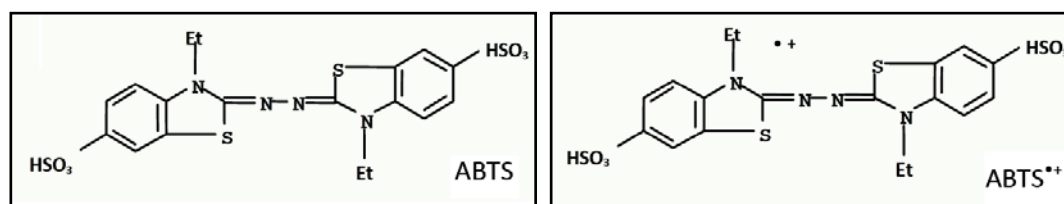
La aplicación de DPPH se realiza usando espectrofotómetro o cromatografía de líquidos; HPLC (Bandoniene and Murkovic, 2002; Polasek et al., 2004). En el primer caso, se mide la absorbancia en longitud de onda de 515-517 nm y presenta un pico de absorbancia a 515 nm (Sánchez-Moreno et al., 1998; Kim et al., 2002) y en el caso de HPLC la determinación se realiza a 280 nm (Cerretani and Bendini, 2010).

El DPPH puede ser expresado como  $1/EC_{50}$ , donde la concentración del antioxidante causante de la reducción del 50% de la concentración inicial de DPPH es definida como  $EC_{50}$  (Cerretani and Bendini, 2010; Hayes et al., 2011) como puede ser expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox ( $\mu\text{mol Trolox/g}$  o  $\mu\text{mol Trolox/l}$ ).

El DPPH ha sido usado para medir la capacidad antioxidante a nivel de plantas medicinales (Shahat and Marzouk, 2013), frutos de olivo (Fernandez-Orozco et al., 2011; Hassanzadeh et al., 2014), orujo de oliva seco (Uribe et al., 2014), aceites vegetales en general (Bubonja-Sonje et al., 2011; Lafka et al., 2011; Christodouleas et al., 2015) y en aceites de oliva en particular (Nakbi et al., 2010; Samaniego-Sánchez et al., 2012; Franco et al., 2014; Mancebo-Campos et al., 2014).

#### **-ABTS (ácido 2, 2'-azino-bis -3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)**

El fundamento de este método consiste en generar el radical  $ABTS^{*+}$  a partir de su precursor, el ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfónico (ABTS) (Figura I.12). El  $ABTS^{*+}$  se genera tras una reacción que puede ser química (dióxido de manganeso, persulfato potasio, ABAP) (Re et al., 1999; Arnao, 2000; Sellappan et al., 2002; Kuskoski et al., 2004), enzimática (peroxidase, mioglobulina), o también electroquímica (Ishige et al., 2001; Imeh and Khokhar, 2002). En ausencia de antioxidantes,  $ABTS^{*+}$  es bastante estable, pero reacciona enérgicamente con moléculas capaces de dar átomos de hidrógeno o electrones, como los compuestos fenólicos, lo que lleva a la desaparición del color azul / verde de este radical.



**Figura I.12.** Estructura química de ABTS y de  $ABTS^{*+}$

ABTS<sup>•+</sup> puede ser neutralizado, por reducción directa a través de la transferencia de electrones o por eliminación radical a través de la transferencia de un átomo de hidrógeno. Un medio ácido facilita el mecanismo por transferencia de electrones (Prior et al., 2005). El radical ABTS<sup>•+</sup> tiene, además, la ventaja de que su espectro presenta máximos de absorbancia a 414, 654, 754 y 815 nm en medio alcohólico (Kuskoski et al., 2005). El ABTS<sup>•+</sup> puede ser soluble tanto en solventes acuosos como en orgánicos, con este método se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, aunque la mayor parte de su aplicación es para determinar la actividad antioxidante de los extractos fenólicos en solventes polares (Cerretani and Bendini, 2010). Se aplicó este método para determinar la capacidad antioxidante en el té (Venditti et al., 2010) en las hojas del olivo (Hayes et al., 2011) y de las aceitunas verdes (Piscopo et al., 2014).

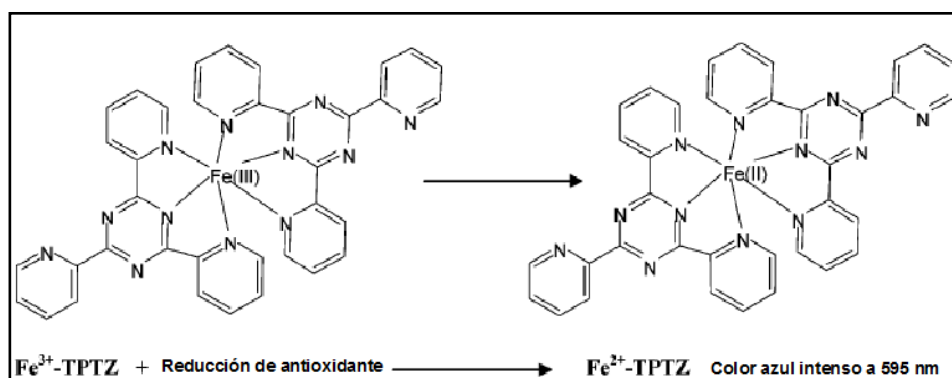
La reacción con ABTS<sup>•+</sup> como con DPPH<sup>•</sup> ocurre más bien despacio. Por lo tanto, los resultados de estas pruebas dependen del tiempo de incubación para alcanzar un estado estable, de la proporción cantidad de muestra y de concentración del radical (Cerretani and Bendini, 2010).

Un inconveniente del método ABTS es que en las reacciones con componentes donantes de átomo de hidrogeno, el radical ABTS<sup>•+</sup> puede ser reducido por componentes con grupos-OH que no contribuyen significativamente al efecto antioxidante (Cerretani and Bendini, 2010).

El método ABTS ha sido comprobado que tiene eficacia para la determinación de la actividad antioxidante en el aceite de oliva virgen extra (Samaniego et al., 2007). Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox ( $\mu\text{mol Trolox/g}$  o  $\mu\text{mol Trolox/l}$ ).

**-FRAP (poder antioxidante de reducción ferrica)**

El ensayo FRAP se basa en la capacidad del antioxidante para reducir  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , (Figura I.13), el mecanismo reductor férrico de FRAP se fundamenta en la transferencia de electrones en lugar de la transferencia de un átomo de hidrógeno (Prior et al., 2005).



**Figura I.13.** Reducción del FRAP.

La reacción FRAP se realiza a pH ácido de 3,6 para mantener la solubilidad del hierro, por lo que la reacción a un pH bajo se reduce el potencial de ionización que impulsa la transferencia de un átomo de hidrógeno y aumenta el potencial redox, que es el mecanismo de reacción dominante. Cuando la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  se produce en presencia de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), la reacción se acompaña de la formación de un complejo coloreado en azul (Ou et al. 2002; Pohanka et al., 2012).

El ensayo FRAP es sencillo, rápido (generalmente 4-6 min), de bajo costo y se puede realizar a través de protocolos semiautomático o automático (Cerretani and Bendini, 2010).

La preparación del oxidante se realiza mezclando TPTZ, 25 ml de buffer de acetato, y 2,5 ml de  $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (20mM). El conglomerado es conocido como "reactivo FRAP". La solución final tiene hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ) de 1,67 mM y TPTZ de 0,83 mM. Por lo tanto, el TPTZ se encuentra en la proporción ideal para una estequiometría de reacción entre el hierro  $\text{Fe}^{3+}$  y el TPTZ de 1 a 2. En este caso el oxidante no es solo el  $\text{Fe}^{3+}$  ( $\text{TPTZ}$ )<sub>2</sub>; también contiene otras especies de  $\text{Fe}^{3+}$  que pueden crear problemas potenciales ya que muchos quelantes en

alimentos pueden ligarse con el ion  $\text{Fe}^{3+}$  y formar complejos que son capaces de reaccionar con los antioxidantes (Huang et al., 2005).

Esta reacción produce un cambio de color que es monitorizado midiendo la absorbancia a 595 nm durante 4 minutos, según el método original, aunque este tiempo fue posteriormente ampliado hasta 30 minutos (Pulido et al., 2000), ya que a los 4 minutos los compuestos de reacción lenta (algunos fenoles) no la han completado (Prior et al., 2005).

El cambio en la absorbancia ( $\Delta A = A_{n \text{ min}} - A_{0 \text{ min}}$ ) se calcula y relaciona con el  $\Delta A$  de una solución estándar de hierro ( $\text{Fe}^{3+}$ ). El  $\Delta A$  es linealmente proporcional a la concentración de antioxidante. Una unidad FRAP se define arbitrariamente como la reducción de 1 mol de hierro  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  (Huang et al., 2005). Los resultados se expresan en equivalentes de Trolox ( $\mu\text{mol Trolox/g}$  o  $\mu\text{mol Trolox/l}$ ), tras elaborar una curva de calibrado de este compuesto, un análogo hidrosoluble de la vitamina E muy utilizado en la expresión de resultados de capacidad antioxidante.

Este método presenta diferentes inconvenientes:

- En la misma longitud de onda, 593 nm, aplicada en la determinación de la capacidad antioxidante en el ensayo de FRAP, pueden absorber otros compuestos, como la bilirrubina oxidada, que produce biliverdina, aumentando el valor FRAP (Prior and Cao, 1999; Ou et al., 2002).
- Cualquier compuesto con un potencial redox inferior a 0,77 V, que es el potencial de reducción del  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , podría reducir al  $\text{Fe}^{3+}$ , sobreestimando el valor de FRAP (Ou et al., 2002).
- Existen componentes como el ácido ascórbico que, además de reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ , pueden reaccionar con éste último para generar nuevos radicales libres (Cao and Prior, 1998). Por ejemplo, en fluidos biológicos, el ion ferroso puede interactuar con agua oxigenada para producir radical hidroxilo (Ou et al., 2001).

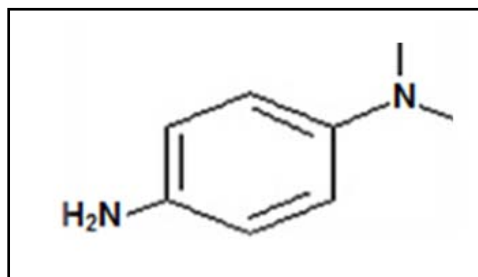
- El método FRAP se realiza a un pH ácido, que no es fisiológico (Prior and Cao, 1999; Pulido et al., 2000), mide la capacidad reductora basada en el ion férrico, que no es ni fisiológica, ni mecanísticamente relevante para la actividad antioxidante (Prior et al., 2005) y no mide antioxidantes tiol como el glutatión y proteínas (Cerretani and Bendini, 2010).

En conjunto con otros métodos para la medida de la capacidad (ABTS y DPPH); este ensayo se ha aplicado en el estudio de las interacciones de la matriz alimentaria con los compuestos antioxidantes; (Sochor et al., 2014); del efecto que ejerce el medio de extracción y las sustancias bioactivas sobre la capacidad antioxidante (Pohanka et al., 2012).

Se empleó el FRAP para la determinación de la actividad antioxidante a nivel de vino (Anastasiadi et al., 2010; Lutz et al., 2012), hojas del olivo (Hossain et al., 2008; Hayes et al., 2011), frutos del olivo (Ziogas et al., 2010), hueso de las aceitunas (Lama-Muñoz et al., 2014) y aceite de oliva (Ozgen et al., 2006; Kalogeropoulos et al., 2014).

**-DMPD (dicloridrato de N, N-dimetilp-fenilendiamina)**

Es un método con un mecanismo de transferencia de electrones (SET) parecido al del método ABTS (Huang et al., 2005) que emplea la N,N-dimetil-p-fenilendiamina (DMPD) (Figura I.14).



**Figura I.14.** Estructura química de DMPD.

El DMPD se disuelve en medio acuoso (Fogliano et al., 1999; Re et al., 1999; Arnao, 2000; Antolovich et al., 2002), en presencia de cloruro férrico (III) y a un pH ácido (5,25) se forma el radical catiónico DMPD<sup>•+</sup>, que es estable y fuertemente colorado.

La solución del radical alcanza valores estables de absorbancia a 505 nm (Fogliano et al., 1999; Kuskoski et al., 2005; Sochor et al., 2010), pasando un tiempo de 18 a 21h, desde su preparación, periodo durante lo cual el radical debe estar en refrigeración (4°C) y bien protegido de luz.

La presencia de un antioxidante produce la transferencia de un átomo de hidrogeno al radical, lo que provoca una decoloración de la solución proporcional a la concentración del antioxidante. Los resultados se expresan en TEAC, o sea, actividad equivalente a Trolox ( $\mu\text{mol Trolox/g}$  o  $\mu\text{mol Trolox/l}$ ) o bien en VCEAC, actividad equivalente a vitamina C ( $\text{mg/l}$  o  $\text{mg/100 g}$  (Kuskoski et al., 2005).

Ha sido aplicado este método para determinar la capacidad antioxidante a nivel de extractos hidrofílicos y lipofílicos de vinos, cereales, legumbres (Rivero-Pérez et al., 2007; Corra-Aguayo et al., 2008; Rodríguez-Nogales et al., 2011), extractos de plantas medicinales (Dorman et al., 2011), té verde preparado en frío y en caliente (Venditti et al., 2010). Igual, se uso para medir la capacidad antioxidante en frutas como mango, fresa, açai, uva, mora, guayaba, graviola, piña, maracuyá, cupuaçu, acerola (Kuskoski et al., 2005; Sochor et al., 2014), en las hojas del olivo (Briante et al., 2004) y en aceite de oliva (El haouhay et al., 2014).

### **3. CONCEPTO DE CALIDAD EN EL ACEITE DE OLIVA.**

La calidad se define como “*grado o nivel de excelencia*” o “*grado de pureza*”, según las definiciones del diccionario, y en cuanto al concepto de “*Calidad Alimentaria*” existen numerosas definiciones. Y entre ellas comentamos la siguiente: “*Calidad es aquella combinación de atributos de un alimento que*



*determina el grado de aceptabilidad del producto por el consumidor y por tanto condiciona su valor comercial” (Serra Belenguer, 1997).*

Las características o atributos de aceite de oliva, que determinan su calidad vienen recogidas en numerosos estudios (Parenti, et al., 2007; Servili et al., 2008; Cerretani et al., 2008; Bendini et al., 2010; Dabbou et al., 2011; Masella et al., 2011; Amirante et al., 2012b; Clodoveo, 2013; Ben-Hassine et al., 2013; Kalogeropoulos et al., 2014) y dependen de una serie de factores naturales (geografía, clima, suelo, variedad), sistemas técnicos de cultivo y el conjunto de operaciones desde la recolección de las aceitunas hasta el envasado del aceite (Angerosa et al., 2001; Amirante et al., 2010; Bendini, et al., 2010; Concha-Herrera et al., 2010; Fernandez-Orozco et al., 2011; Lozano-Sánchez, 2011; Stefanoudaki et al., 2011; Anwar et al., 2013; Karabagias et al., 2013; Pizarro et al., 2013; Ruiz-Domínguez, 2013).

Para evaluar la calidad del aceite de oliva existen parámetros estandarizados por normativas o reglamentos, tanto del Consejo Oleícola Internacional como de la Unión Europea. Estos límites estandarizados permiten establecer unos criterios de calidad en el aceite (Reglamento (UE) nº 61 de la Comisión Europea, 2011).

### **3.1. Criterios químicos de calidad de aceite de oliva.**

El aceite de oliva es clasificado según parámetros o criterios de calidad que determinan sus características. Los principales criterios químicos de calidad son: acidez, índice de peróxidos y absorbancia en el Ultravioleta.

#### **-Grado de acidez**

Se denomina grado de acidez el porcentaje de ácidos grasos libres de una grasa expresados convenientemente según la naturaleza del aceite o grasa en ácido oléico, palmítico o láurico. En el aceite de oliva, el grado de acidez se expresa como gramos de ácido oleico por 100 gr de grasa (% m/m), considerándose todos

los ácidos grasos libres como si fueran ácido oleico. El grado de acidez es un índice importante de calidad.

La acidez de un aceite puede ser un indicio de unas inadecuadas prácticas llevadas a cabo durante el almacenamiento previo de las aceitunas a los procesos de molturación y extracción de su aceite. Un crecimiento de bacterias, mohos y levaduras en las aceitunas puede conducir al aumento del grado de acidez del aceite obtenido de ellas, ya que la presencia de ácidos grasos libres se debe a la ruptura de los enlaces éster de los triglicéridos por acción de lipasas microbianas. Los ácidos grasos libres a bajas concentraciones, son compuestos naturales de aceite de oliva. Sin embargo, el aumento de la cantidad de estos elementos por hidrólisis de los triglicéridos del aceite es muy importante para la determinación de su calidad. El valor de la cantidad de los ácidos grasos libres presentes en el aceite de oliva es acreditado por diferentes regulaciones y cambia según el tipo de aceite y clase comercial (Consejo Oleícola Internacional (COI, 2013a) y Reglamento de la Comisión (UE) N° 61/2011).

### ***-Índice de peróxidos***

El contenido de peróxidos, producto de la reacción entre las grasas presentes en el aceite y el oxígeno, define su estado de oxidación primaria y nos da por tanto un parámetro de su tendencia al enranciamiento, determina el estado de oxidación e indica el deterioro que pueden haber sufrido ciertos componentes del producto.

El oxígeno y la luz solar se consideran los principales factores de oxidación. La reacción del oxígeno del aire con los ácidos grasos puede conducir a la formación de compuestos que al descomponerse originan otros, a los cuales se les atribuye el olor y sabor desagradables característicos de las grasas oxidadas, y es esto lo que se conoce con el nombre de rancidez. Al principio de la oxidación de las grasas es posible que, en su mayoría, el producto de la reacción no sea más que hidroperóxido. Al aumentar la cantidad de peróxidos y aparecer el olor y el sabor característicos de la rancidez, se demuestra la

presencia de otros productos resultantes de la descomposición de los hidroperóxidos.

La oxidación es por ello una de las principales causas que afectan a la calidad del aceite de oliva y que podría tener lugar durante la producción del aceite o de su almacenamiento (Kiritsakis et al., 1998a).

### ***-Absorbancia en el Ultravioleta***

El estado de oxidación de una grasa se puede conocer a través de la medida de su K270 y K232. Son parámetros que se utilizan para detectar los componentes anormales en un aceite virgen y mide la absorbancia de un aceite a la longitud de onda de 270 nm y 232 nm. Generalmente, siempre que la extracción se realice a partir de aceituna sana, que no haya sido sometida a ningún tratamiento diferente a las operaciones físicas propias de su extracción, su valores serán inferiores al límite establecido por el Consejo Oleícola International (COI, 2013a) y la Reglamento de la Comisión (UE) N° 61/2011. El K270 y K232 son indicadores de la presencia en el aceite de compuestos de oxidación complejos, distintos de los peróxidos. Se originan por una mala conservación o por modificaciones inducidas por los procesos tecnológicos.

Los aceites con valores superiores a los límites se consideran lampantes y necesitan ser refinados para ser aceptados para el consumo (Boskou, 1996; García et al., 1996).

### **3.2. Criterios microbiológicos de calidad de aceite de oliva.**

Los criterios microbiológicos establecen un límite por encima del cual un producto alimenticio se considera no apto para el consumo, por haber sido considerado contaminado con microorganismos para los que se ha fijado los criterios. El aceite de oliva como cualquier alimento destinado al consumo debe tener ausencia de patógenos y sus toxinas o de aquellos microorganismos que por sus números o especificidad puedan provocar alteraciones en el consumidor (Reglamento CE 2073/2005).

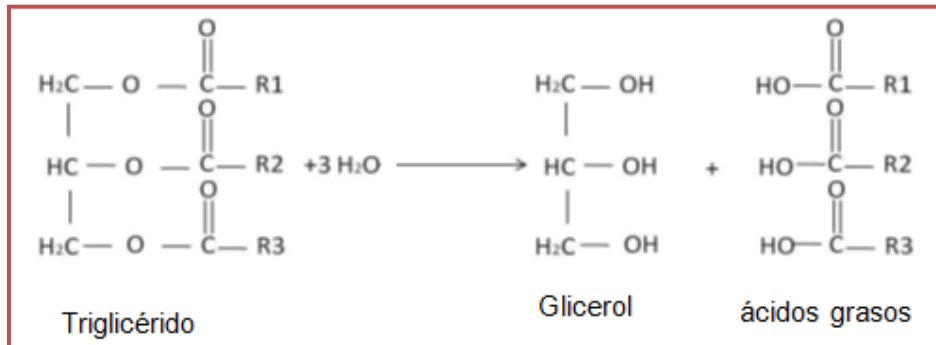
### 3.3. Índices de deterioro de calidad relacionados con el aceite de oliva.

#### 3.3.1. Hidrólisis de triglicéridos.

La degradación o hidrólisis de los triglicéridos se realiza por acción de lipasas.

#### **-lipasas**

Lipasas (triacylglycerol acyl hydrolases, EC 3.1.1.3) son enzimas naturales que catalizan la degradación de las grasas y aceites; hidrolizando los triglicéridos en la di-y monoacilgliceroles, ácidos grasos y glicerol (Figura I.15), en una interfase donde hay presencia de agua o de sustratos emulsionados (Villeneuve et al., 2000). Es un fenómeno conocido como la activación interfacial (Schmidt et al., 1998).



**Figura I.15.** Hidrólisis de triglicérido y liberación de ácidos grasos.

Sin embargo, bajo ciertas condiciones, también son capaces de catalizar reacciones de síntesis en medios no acuosos (Costas et al., 2004; Silva et al., 2005; Sun et al., 2009).

Las lipasas están ampliamente extendidas en la naturaleza, y se han encontrado en los animales, las plantas superiores y microorganismos (Wooley et al., 1994).

### ***-Microorganismos fuentes de lipasas***

Las lipasas están presentes en el mundo microbiano; ampliamente distribuidas en bacterias (Shafei and Abd-Elsalam, 2005; Zhen-Qian and Chun-Yun, 2009; Liu et al., 2011), mohos y levaduras (Belhaj-Ben Romdhane et al, 2010; Contesini et al., 2010; Yoshida, et al., 2011; Sathish Yadav et al, 2011).

Los microorganismos más potentes para la producción de lipasa se pueden encontrar en diversos lugares, suelos contaminados por aceite, en las aguas de vegetación y en alimentos alterados (Sharma et al., 2001).

Varias bacterias, mohos y levaduras se han aislado de las aguas de vegetación, es por ellos que aguas residuales de la producción de aceite se han usado para aislar bacterias capaces de producir lipasas con alta actividad (Ertugrul et al., 2007).

En los aceites de fritura se han aislado microorganismos con mayor producción de lipasas. En estos aceites se identificó una mayor producción de lipasas por el género *Pseudomonas* (Haba et al., 2000). Así altas actividades catalíticas de lipasas se caracterizan en microorganismos psicotróficos (Mayordomo et al., 2000; Rashid et al., 2001; Lee et al., 2003; Zhang and Zeng, 2006; Yang et al., 2008; Park et al., 2009).

### ***-Lipasas y aceite de oliva***

La hidrólisis de los triglicéridos del aceite de oliva puede comenzar cuando los frutos están todavía en el árbol, por lipasas endógenas propias del fruto (Kiritsakis and Markakis, 1978). Estas lipasas relacionadas con la degradación de los triglicéridos a nivel de las aceitunas se han mostrado presentes en diferentes estados de maduración (desde color verde hasta morado o negro), con un nivel bajo de actividad y que se reduce más con la maduración (Panzanaro et al., 2010).

Las aceitunas maduras son más susceptibles a los daños mecánicos (Gutiérrez et al., 1999) y a la infección producida por hongos (Mazuelos Vela, 1972).

Levaduras producidas de lipasas causantes de la hidrólisis de los triglicéridos pueden estar cultivadas en la pasta de las aceitunas durante la trituración (Ciafardini, 2006).

El aceite de oliva recién producido puede estar contaminado por microorganismos producidos de enzimas catabólicas que influyen negativamente en la calidad de este alimento; modificando sus características físico-químicas y organolépticas (Ciafardini, 2006).

La cantidad de ácidos grasos libres resultante de la degradación de triglicéridos se considera muy importante para la valoración de un aceite vegetal y su clasificación comercial (Reglamento (UE) nº 61 de la Comisión Europea, 2011)

### **3.3.2. Oxidación de los ácidos grasos.**

La oxidación de lípidos o la rancidez representa el principal factor de degradación de los aceites comestibles y se considera como el parámetro principal que afecta a su calidad. Varios estudios han llevado a cabo que la interacción del fenómeno oxidativo con los compuestos de hidrólisis: ácidos grasos libres, monoacilgliceroles y diacilgliceroles, se realiza durante el procesamiento y almacenamiento del aceite (Aubourg, 2001; Colakoglu, 2007; Paradiso et al., 2010).

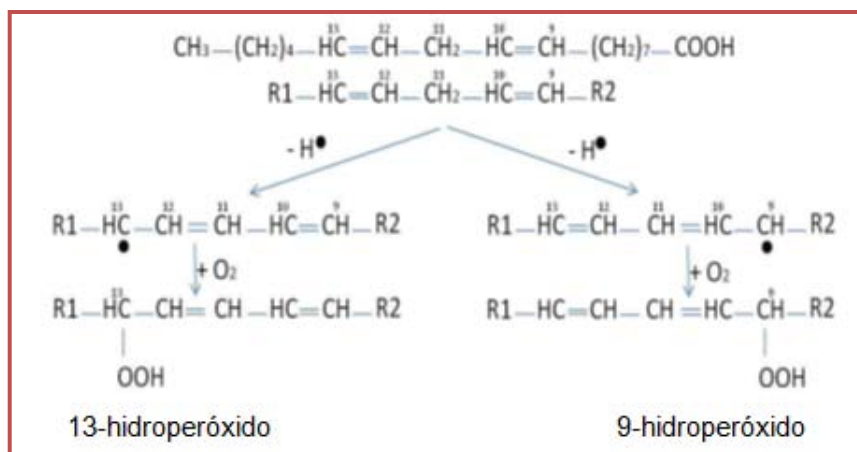
Los ácidos grasos libres contienen en la misma molécula una cola de hidrocarburo hidrofóbica y una cabeza de ácido carboxílico hidrofílica. Esta combinación de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos permite que las moléculas de ácidos grasos libres se concentren en la superficie de las interfaces de agua-aceite (Choe, 2008). En emulsiones de agua-aceite, la autooxidación de los ácidos grasos provocó la formación de concentraciones significativamente altas de hidroperóxido (Waraho et al., 2011). Los ácidos grasos libres son prooxidantes debido a su capacidad de concentrarse en la superficie de las gotas de emulsiones, donde atraen los metales de transición prooxidantes que promueven la oxidación (Waraho et al., 2009).

Estudios realizados por Kinsella, et al. (1978) mostraron que en aceites a granel, los ácidos grasos libres son más susceptibles a la autooxidación que los de ácidos grasos esterificados. Años después, Miyashita y Takagi (1986) observaron que los ácidos grasos libres se autooxidan más rápidamente que los ácidos grasos de éster de metilo y que la tasa de oxidación aumentó con los ácidos grasos libres insaturados.

Los ácidos grasos con alto grado de insaturación son fácilmente atacados por la oxidación lipídica. (Decker and McClements, 2008; Shahidi and Wanasundara, 1998).

Una concentración de ácidos oleico tan baja como 0.1% ha sido capaz de provocar el aumento de la tasa de la oxidación lipídica, mientras que concentraciones de 0.5 a 1% de ácido oleico provocaron la formación de concentraciones significativamente más alta de hidroperóxido (Waraho et al., 2011; Paradiso et al., 2010).

Es conocido que el mecanismo de oxidación que consiste en la descomposición de hidroperóxidos lipídicos (RCOOH) por peroxidación de radicales de alta reactividad (peroxilo: RCOO· y aloxilo: RO·) forman radicales lipídicos al reaccionar con ácidos grasos insaturados (Figura I.16). La propagación de la oxidación lipídica empieza con la reacción del radical formado inmediatamente con otro lípido que se encuentra cerca de él (Min and Boff, 2002).



**Figura I.16.** Auto-oxidación del ácido linoleico (Frankel, 1984)

Igual, Colakoglu (2007) observó que la adición de un 1 % de ácido esteárico al aceite de soja, durante la oxidación a 55°C en 24 h causó el aumento del consumo de oxígeno y la formación de peróxido en el aceite.

Para una investigación en profundidad sobre los efectos de esta clase de sustancias en los fenómenos oxidativos; con el fin de evaluar la actividad de pro-oxidante de los triglicéridos en ausencia de cualquier posible interferencia, Gomes et al. (2008, 2011) emplearon un aceite purificado; libre de compuestos antioxidantes y pro-oxidante. Los resultados de estos trabajos mostraron la presencia de una acción pro-oxidante tanto en el aceite de oliva purificado como en su correspondiente aceite sin purificación, es decir que el tiempo de inducción de oxidación disminuyó con el aumento de las concentraciones de triglicéridos oxidados. Bilancia et al. (2007) mostraron que las cantidades de triglicéridos oxidados, detectados en el aceite de oliva virgen durante el almacenamiento fueron significativos y inversamente proporcionales a los tiempos de inducción de la oxidación.

El ácido graso necesario para activar el fenómeno de oxidación puede estar fácilmente disponible, a causa de la hidrólisis del triacilglicerol producido por enzimas lipolíticas de los frutos o de la microflora ambiental (López-López et al., 2009). Las bacterias mesófilas, psicrótróficas, mohos y levaduras además



de ser indicativas en la oxidación por causar la liberación de ácidos grasos, han mostrado ser responsables de la degradación de cadenas de carbono de estos componentes (Lalman and Bagley, 2001; Pereira et al., 2002, 2004; Becker, 2010; Valladão et al., 2011; Gonçalves et al., 2012).

### **3.3.3. Degradación de los polifenoles.**

#### ***-Oxidación de los fenoles durante la producción del aceite de oliva***

Reacciones de oxido- reducción endógenas y reacciones exógenas; tales como el aumento de los radicales libres por la oxidación de los ácidos grasos, intervienen durante los procesos de extracción de aceite de oliva para promover la oxidación fenólica (Servili et al. 2008; García-Rodríguez et al., 2011). De hecho, una lenta molturación de la pasta de las aceitunas en presencia de oxígeno puede reducir a media la concentración de componentes fenólicos de aceites (García et al., 2001).

Bacterias que se encuentran con más frecuencia en materias primas de origen vegetal en estado de fermentación, es el caso de variedades de verduras y aceitunas, son capaces de degradar fenoles ácidos por decarboxilasa. La enzima decarboxilasa ha sido expresada como fuente rápida y con una síntesis inducible tras su exposición a fenoles ácidos o sus derivados (Landete et al., 2010; Rodríguez et al., 2008b; Rodríguez et al., 2008c).

#### ***-Degradación de los fenoles durante almacenamiento del aceite***

La oxidación de aceite es un proceso inevitable cuando el aceite ya está extraído y almacenado sobre todo durante un tiempo prolongado.

Estudios han examinado la influencia de la luz sobre cambios de concentración de compuestos fenólicos en el aceite de oliva virgen extra, y los resultados han mostrado una disminución de la concentración de compuestos fenólicos en aceites metido a una ligera exposición a la luz, durante un período ampliado de

almacenaje (Gutierrez and Fernandez, 2002; Okogeri et al., 2002; Rastrelli et al., 2002; Luna et al., 2006). Otros estudios han detectado cambios de la concentración fenólica durante el almacenaje sin la exposición de las muestras a la luz (Gomez-Alonso et al., 2007; Baiano et al., 2009; Lerma-Garcia et al., 2009). En efecto, la oxidación del aceite de oliva virgen es un proceso inevitable de envejecimiento y por lo tanto totalmente no puede ser prevenida; aún sin la exposición a tal factor como la luz (Samaniego-Sánchez et al., 2012). Todas estas reacciones oxidativas pueden intervenir en una gran parte, en el contenido total o final de los compuestos fenólicos en el aceite de oliva (García-Rodríguez et al., 2011).

#### **3.3.4. Pérdida de la capacidad antioxidante.**

Tocoferoles, carotenoides, esteroides y compuestos fenólicos forman los componentes antioxidantes del aceite de oliva (Franco et al., 2014; Mancebo-Campos et al., 2014). El hidroxitirosol, oleuropeína y sus derivados son los antioxidantes más potentes de los fenoles (Beardsell et al., 2002; Giugliano, 2000; Boskou et al., 2006; Mateo, 2005), contribuyen bastante a la estabilidad de oxidación del aceite (Gutfinger, 1981; Papadopoulos and Boskou, 1991; Rice-Evans et al., 1996; Velasco and Dobarganes, 2002; Mateos et al., 2005; Van der Sluis et al., 2005) y presentan efectos antioxidantes muy beneficiosos sobre la Salud (Hollman et al., 2011; Solà-Alberich et al., 2011). Molidura de las aceitunas es el proceso principal para obtener el aceite de oliva, provoca la hidrólisis de fenoles glucósidos por actividad producida por enzimas  $\beta$ -glucosidasa, que expone la afinidad más alta de sustrato hacia oleuropeína (Romero-Segura et al., 2009).

La  $\beta$ -glucosidasa puede tener origen endógeno; del fruto del olivo (Amiot et al., 1989; Angerosa et al., 1995; Botía et al., 2001) como puede tener origen exógeno; de los microorganismos: bacterias y levaduras (Ciafardini et al., 1994; Marsilio et al., 1996; Marsilio and Lanza, 1998; Ciafardini and Zullo, 2000; Ciafardini and Zullo, 2002; Landete et al., 2010).

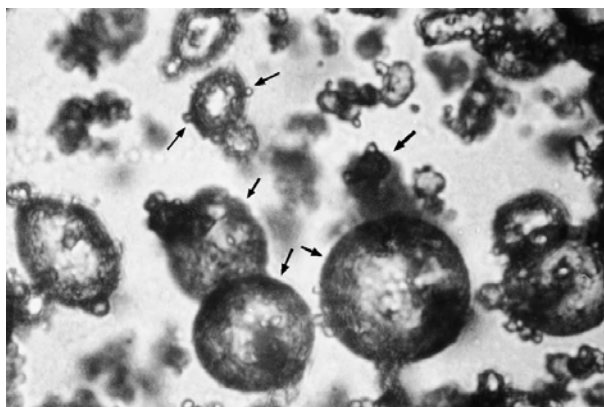
Además de radicales libres que son los principales oxidantes de los fenoles en productos de plantas, existen enzimas de actividad oxido-reductasa tales como polifenol peroxidasa (PX) y oxidasa (PO) que se consideran enzimas relacionadas con la oxidación de fenoles, tanto en procesos fisiológicos asociados con la madurez del fruto como en cualquier forma de manipulación que implica el daño o la fractura del tejido del fruto (Pourcel et al., 2006).

La oxidación de fenoles por PO es implicada en dos reacciones diferentes; hidroxilación de los fenoles para formar ortodifenoles, y oxidación de estos ortodifenoles para transformarse en quinonas. Estos tipos de reacciones han sido estudiados por Falguera et al. (2010).

En alguna planta los polifenoles no son directamente oxidados por PO, pero son degradados por reacciones secundarias (Pourcel et al., 2006).

Aunque la contribución de PX a la oxidación de fenoles sea limitada por la disponibilidad de radical  $H_2O_2$ , la autooxidación de fenoles causada por el daño de tejido del fruto más la exposición prolongada al oxígeno y la oxidación de los ácidos grasos aumentan la formación de  $H_2O_2$  que puede ser usado por la PX para realzar la oxidación de compuestos fenólicos (Takahama and Oniki 2000). Las actividades de PX y PO demostradas en etapas de maduración, son capaces de oxidar tanto principales compuestos fenólicos encontrado en el fruto del olivo, como compuestos fenólicos que surgen durante el proceso de obtener el aceite, sobre todo aquellos derivados de hidroxitirosol (García-Rodríguez et al., 2011).

Investigaciones realizados por Ciafardini y Zullo (2002) han mostrado la presencia de una microflora abundante en aceite de oliva recién producido (Figura I.17), lo que puede decir que el almacenamiento de los aceites después de una simple decantación y sin filtración puede conducir a la incubación de microorganismos con el aceite, lo que puede favorecer más el medio para potenciar los fenómenos de oxidación y autooxidación, y reducir los componentes antioxidantes del aceite.



**Figura I.17.** Presencia de microorganismos, partículas sólidas y agua de vegetación en aceites de oliva recién producidos; observados con microscopio 600x (Ciafardini and Zullo, 2002).

Modificaciones cuantitativas y cualitativas de los componentes del aceite pueden ocurrir durante almacenamiento a causa de reacciones de descomposición y oxidación (Morelló et al., 2004). El oxígeno, la luz, la temperatura, la presencia de metales de transición y la composición de ácidos grasos insaturados, todos influyen en el mecanismo de procesos de autooxidación de los radicales libres (Montedoro, 1972; Frankel, 1985). Lo que se puede transmitir por una degradación de los componentes antioxidantes del aceite, una pérdida de su capacidad antioxidante y de una reducción de sus beneficios sobre la salud (Lerma-García et al., 2009).

#### **4. SISTEMAS DE CONTROL DE CALIDAD EN LA INDUSTRIA DEL ACEITE DE OLIVA.**

La gestión de la calidad, desde la recepción de las aceitunas en la almazara hasta el almacenaje del aceite de oliva antes de ser envasado para su venta viene recogida en numerosas Guías de Prácticas Correctas de Higiene (GPCH) y manuales de calidad, Consejo Oleícola Internacional (COI, 2006). En España, es de obligado cumplimiento por parte de las almazaras del establecimiento de unos sistemas de autocontrol basados en la filosofía del Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos. Cualquier almazara independientemente de su tamaño y volumen de producción deberá tener implementado este sistema de autocontrol, afín de garantizar la calidad del aceite y prevenir riesgos

alimentarios que puedan poner en peligro la salud de los consumidores (R.D.2207/95).

Quizás se podría pensar que el aceite de oliva, debido a que no es un alimento perecedero, no requiere de un control tan estricto como otros productos alimentarios (pescados, carnes, lácteos...). Sin embargo la aplicación de la metodología APPCC no solo minimiza la aparición de posibles peligros en este tipo de industrias sino que también puede proporcionar una serie de ventajas colaterales.

#### **4.1. Los Planes Generales de Higiene.**

Los PGHs se definen como el conjunto de programas y actividades preventivas básicas, a desarrollar en todas las empresas alimentarias para la consecución de la seguridad alimentaria (Consejería de salud, 2007). Tienen como objetivo establecer procedimientos operativos sobre aspectos básicos de la higiene y sobre determinadas actividades de una empresa (Sánchez Rodríguez et al., 2003).

Una parte del concepto de seguridad alimentaria lo constituyen las medidas higiénicas básicas que incluyen entre otras la limpieza y desinfección y la aplicación de los principios de APPCC (CE, 2004).

Los métodos higiénicos de la persona, del equipo y generalmente del entorno del proceso de producción deben estar aplicados antes de la implantación del sistema APPCC (Walker et al., 2003; FPA, 2006; Roberto et al., 2006; Jacxsens et al., 2009; Kök, 2009). De hecho unas buenas prácticas higiénicas por parte de los manipuladores en cualquier punto de la cadena alimentaria se han manifestado como uno de los mejores métodos para mejorar la seguridad alimentaria (Egan et al., 2007). Son numerosos los casos de alimentos contaminados con microorganismos que han sido relacionados con diferentes tipos de enfermedades (McLauchlin et al., 2004; Codex, 2009; Orsi et al., 2011; Lubber et al., 2011; Dehesa Santisteban, 2012; Faccio et al., 2013; Chaves and Brashears, 2014).

En el documento orientativo de especificaciones de Sistemas de Autocontrol (Consejería de Salud, Junta de Andalucía. 2003), se describen los siguientes Planes de Higiene:

1. Control del agua potable.
2. Limpieza y Desinfección.
3. Control de plagas: Desinsectación y Desratización.
4. Mantenimiento de instalaciones, equipos y útiles.
5. Rastreabilidad, trazabilidad o loteado de productos.
6. Formación de manipuladores.
7. Certificación de proveedores.
8. Buenas Prácticas de Fabricación o de Manejo.
9. Eliminación de residuos y vertidos.
10. Otros que, según las características de su empresa, sean necesarios para garantizar la seguridad de los alimentos o le sean indicados por parte de la Autoridad Sanitaria.

Los PGHs forman un apoyo esencial para avanzar en una correcta y exitosa aplicación del Sistema APPCC (Mortimore, 2000; Mortimore and Wallace, 2001; Adams, 2002) y ofrecer garantías para la seguridad alimentaria (Stier, 2003; Martín-Belloso et al., 2014). Los PGHs controlan el día a día del sistema APPCC con la finalidad de simplificar su procedimiento y desarrollo, y facilitar su efectividad (Wallace and Williams, 2001), una vez que el sistema APPCC sea implantado (Ropkins and Beck, 2003).

La seguridad de los productos alimenticios se garantiza principalmente mediante un enfoque preventivo, como la adopción de buenas prácticas de higiene y la aplicación de procedimientos basados en los principios de HACCP (CE, 2005).

#### **4.2. El sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC).**

El sistema APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos) o HACCP “Hazard Analysis Critical Control Points” ha sido desarrollado por primera vez en los años 1960 por Pillsbury, por la cooperación de la Aeronáutica Nacional y la Administración Espacial (la NASA) (Untermann, 1999). El ejército estadounidense y el Laboratorio de Espacio de Fuerzas Aéreas estadounidense han diseñado este sistema para prevenir peligros microbianos, químicos y físicos en el alimento, con el objetivo de que los astronautas viajen con alimentos sanos (Goldmann and Kaushal, 2002; Ten Eyck et al., 2006).

APPCC/HACCP es un sistema preventivo establecido para la protección de la seguridad alimentaria (FAO, 1997). Su implantación sirve para detectar peligros biológicos, químicos y físicos que afecten la seguridad de productos de alimentación (FAO, 1997; FPA, 2006) y eliminarlos o reducirlos a un nivel aceptable (Ehiri et al., 1995; Walker et al., 2003). Igual, es el sistema de gestión de la seguridad alimentaria (Al-Kandari and Jukes, 2011), ampliamente reconocido como el mejor método para garantizar la seguridad del alimento. De hecho este sistema es reconocido internacionalmente como herramienta de control de riesgo de la seguridad alimentaria (CAC, 2003; Wallace et al., 2005; Gorris, 2005; Van Schothorst et al., 2009). No obstante, la práctica del sistema APPCC en la industria alimentaria y su efectiva aplicación han sido investigadas ampliamente (Wallace et al., 2011; Motarjemi, 2014).

La Identificación, Evaluación y Control de riesgos son los tres principales objetivos del sistema APPCC (Manning and Baines, 2004; Van der Spiegel et al., 2004; Eves and Dervisi, 2005; Burlingame and Pineiro, 2007; Trienekens and Zuurbier, 2008; Doménech et al., 2008).

### ***-Identificación de Peligros***

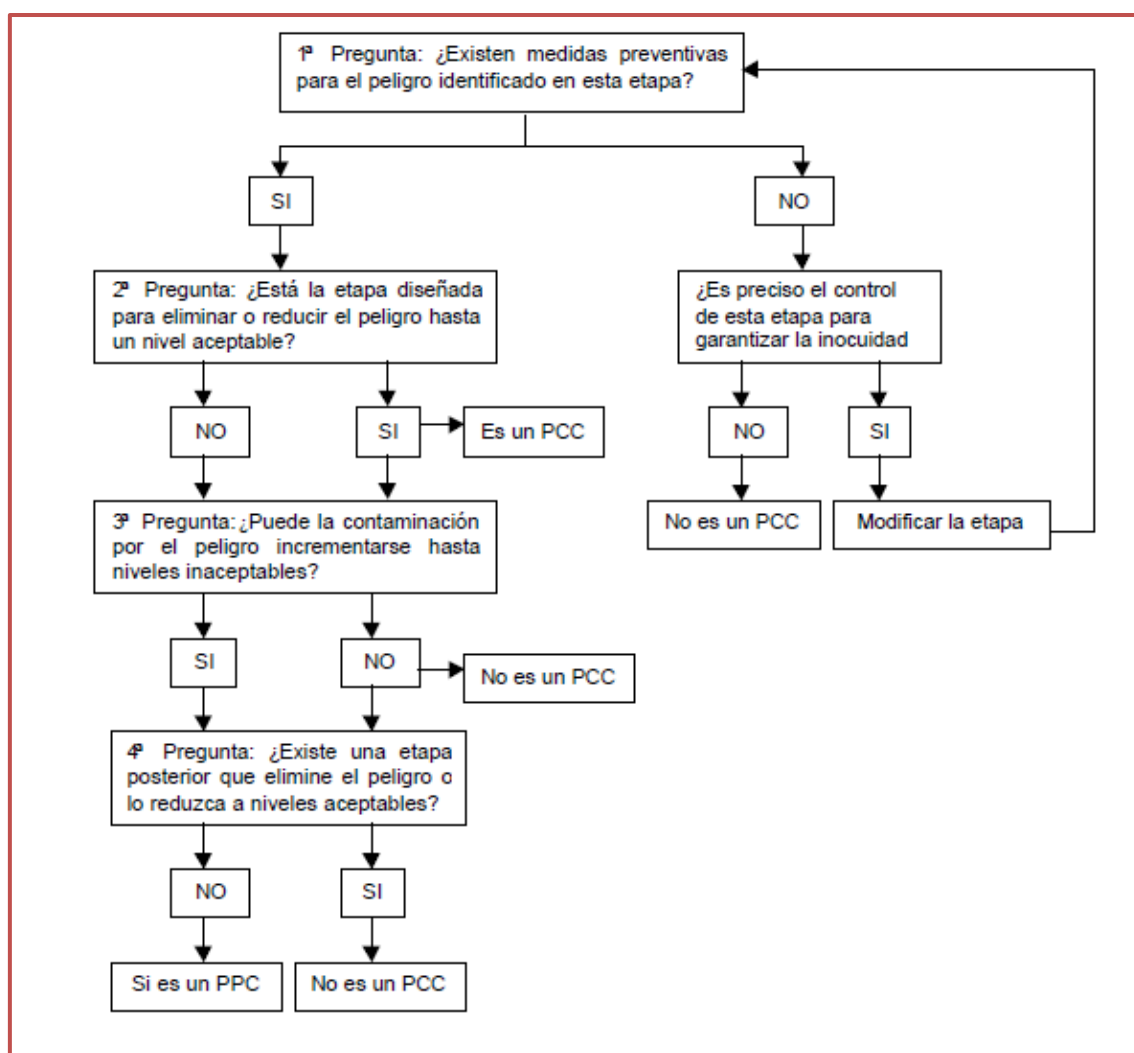
El Sistema APPCC/HACCP permite identificar las etapas clave para prevenir, controlar y eliminar los peligros asociados a la elaboración de un producto, minimizando por tanto, los posibles problemas relacionados con la seguridad del alimento (Buchanan, 1995), mediante esta identificación y análisis, basados en el análisis científico y en la evidencia (Jouve, 1998).

Los peligros son agentes biológicos (Microorganismos o sus toxinas), químicos o físicos presentes en el alimento, o la condición en la que se encuentra el alimento y que pueden causar un efecto negativo para la salud. Su identificación se realiza durante todas las etapas de producción donde los peligros ocurren y se diseñarán mecanismos de control (Ropkins et al., 2000).

### ***-Evaluación de Peligros***

La evaluación de los riesgos de la seguridad de alimento es un procedimiento que se realiza con anticipación; se evalúa los peligros asociados a la producción, y una vez identificados todos los posibles peligros de cada etapa se determina cuál de los puntos de control críticos es más importante, con orden para establecer su control (NACMCF, 1997). Esta evaluación de riesgos se puede hacer a través de un árbol de decisiones (Figura I.18). La aplicación de este árbol de decisiones consiste en responder secuencialmente a una serie de preguntas referidas a los peligros y a las medidas preventivas en cada etapa del diagrama de flujo. Se utiliza el mismo árbol para peligros físicos, químicos y biológicos. En función de las respuestas obtenidas iremos avanzando en un sentido u otro en el árbol de decisiones hasta obtener la respuesta a nuestra pregunta original: ¿es esta etapa un punto de control crítico (PCC) o simplemente un punto de control (PC)? (CECAM, Castilla-La Mancha, 2009).





**Figura I.18.** Modelo de un árbol de decisiones (CECAM, Castilla-La Mancha, 2009).

### -Control de Peligros

Una vez que se han identificado todos los peligros significativos, el siguiente paso es controlar las medidas usadas para prevenir, eliminar o reducir a un nivel aceptable los riesgos identificados (Untermann, 1999).

Una medida de control se define como cualquier acción o actividad que pueda ser usada para prevenir o eliminar un peligro para la seguridad alimentaria o reducir su impacto a un nivel aceptable. Consiste en realizar una secuencia planificada de observaciones o medidas de los parámetros de control para evaluar si un PCC está o no bajo control (CAC, 2003).

Sin embargo, el éxito y la eficacia del sistema APPCC dependen de la puesta en práctica de sus siete principios (Tabla I.5) y de su correcta aplicación (Ramírez Vela and Martín Fernández, 2003; FAO and WHO, 2006, Lawley, 2007; Kök, 2009).

<b>Principio 1</b>	Establecer un análisis de riesgo para determinar si los peligros son significativos para la seguridad alimentaria y especificar las medidas de control. Preparar un organigrama de los pasos en el proceso, identificar y catalogar los peligros juntos con sus causas o fuentes.
<b>Principio 2</b>	Determinar los puntos de control críticos (CCPs). Un árbol de decisión se puede utilizar.
<b>Principio 3</b>	Establecer los límites críticos de las medidas preventivas que corresponden a cada CCP identificado.
<b>Principio 4</b>	Establecer un sistema para supervisar el control del CCP por pruebas previstas u observaciones.
<b>Principio 5</b>	Establecer las acciones correctoras que deben tomarse cuando el control indique una desviación del límite crítico establecido.
<b>Principio 6</b>	Establecer procedimientos para la verificación para confirmar que el sistema HACCP funciona con eficacia; esto también debería incluir actividades de revisión y la validación.
<b>Principio 7</b>	Establecer la documentación que concierna todos los procedimientos y registros apropiados a estos principios y su uso.

**Tabla I.5.** Los siete principios del sistema HACCP (COA, 2003).

## **II. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**



## **II. HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS**

En Marruecos, la mayor parte del sector de aceite de oliva esta presentado por pequeñas almazaras, muchas de ellas con carácter familiar, donde se siguen técnicas muy antiguas para la producción de aceite. La mayoría de los habitantes prefieren el consumo de aceite de oliva producido en almazara tradicional y además lo consideran de mejor calidad. Generalmente, en este tipo de almazara, las aceitunas destinadas a la molturación se almacenan durante varios días hasta meses, medidas en sacos de plástico y a temperatura ambiente, y el aceite se produce sin ningún reglamento ni sistema de control de calidad.

Al no haber sistemas que permitan identificar, evaluar y controlar peligros que comprometan la inocuidad de los aceites así producidos, la posibilidad de alteraciones químicas, microbiológicas y enzimáticas de estos aceites es elevada. Esto podría suponer una mayor incidencia de reacciones de oxidación y enranciamiento. Lo que se traduciría en alto grado de acidez, índices de peróxidos oxidantes y disminución de la actividad antioxidante natural del aceite.

Todas estas posibles alteraciones conducen a una pérdida de la calidad tanto organoléptica como nutritiva e higiénica del aceite.

### **OBJETIVOS**

1. Analizar el perfil microbiológico a nivel de aceitunas de la variedad Picholine Marroquí, estudiando el comportamiento microbiano durante la etapa de almacenamiento previo a la molturación y estableciendo la influencia que estos sistemas de almacenamiento puedan tener sobre la composición química y microbiológica de los aceites obtenidos de estas aceitunas.

2. Analizar el perfil microbiológico de los aceites obtenidos a partir de esas aceitunas en dos almazaras tradicionales marroquíes en la región rural de Oujda-Taourirt: una almazara con muela y prensa de madera y la otra almazara con muela de granito y prensa de metal, a fin de establecer si el tipo de almazara pudiera influir sobre dicho perfil microbiológico.
  
3. Determinar la evolución en los parámetros físico-químicos: grado de acidez, índice de peróxidos y absorbencia en el Ultravioleta (K232 y K270), durante el almacenamiento de los aceites obtenidos en esas dos almazaras.
  
4. Determinar el cambio en el perfil de ácidos grasos de los mismos aceites, durante almacenamiento.
  
5. Estudiar la evolución del contenido en fenoles totales y de la capacidad antioxidante total de los aceites, en esas mismas condiciones de almacenamiento.

## **OBJECTIVES**

1. Analysis of microbiological profile of olive fruits, from Moroccan Picholine variety; studying behaviour of microorganisms during stages of storage before milling, and establishing the influence that these systems of storage can have on chemical and microbiological composition of oils obtained from these fruits.
2. Analysis of microbiological profile of oils obtained from these olive fruits, in two types of Moroccan traditional mills, in the rural region of Oujda-Taourirt: one mill with roller and press made of wood and the other mill with roller of granite and press made of metal, to establish if the type of mills can influence on microbiological profile.
3. Measure changes in physico-Chemical quality parameters: Percentage of free fatty acids, peroxide index, and ultra-violet light absorbance (K232 and K270), during storage of olive oil obtained in these mills.
4. Determine changes in fatty acid percentage of the same olive oils, during storage.
5. Study changes in total phenol content and antioxidant capacity in olive oil, in the same conditions of storage.





### **III PARTE EXPERIMENTAL**



### **III PARTE EXPERIMENTAL**

#### **1. MUESTRAS ANALIZADAS**

- ***Muestras de aceitunas.***

Se han analizado muestras de aceitunas de la variedad Picholine marroquí recolectadas durante la cosecha 2011, en la región rural de Oujda-Taourirt, en el Este de Marruecos.

Estas aceitunas se han dividido en tres lotes de acuerdo con los períodos de su almacenamiento antes de su molturación:

**A1: aceitunas almacenadas durante 7 días.**

**B1: aceitunas almacenadas durante 15 días.**

**C1: aceitunas almacenadas durante 30 días.**

Cada lote contiene aproximadamente 800 kg de aceitunas distribuidos en sacos (bolsas) de plástico de unos 50 Kg. Estos sacos fueron almacenados a la intemperie, a una temperatura ambiente de alrededor de 11°C y con una humedad relativa de alrededor del 71%, según las condiciones de almacenamiento que se siguen en las almazaras de esta zona de Marruecos.

Al terminar el tiempo de almacenamiento para cada lote y justo antes de la molturación de las aceitunas, se tomaron, al azar y de cada uno de los sacos, muestras de aceitunas; un total de 24 muestras (8/ grupo) y se mantuvieron en refrigeración (4° C) hasta la realización del estudio microbiológico al que se sometieron.

● **Muestras de aceites**

Los lotes de aceitunas se distribuyeron por igual entre dos almazaras (400 Kg/ lote/almazara) de esta zona; una almazara de granito y otra de madera. Las dos almazaras se encuentran geográficamente muy próximas una a la otra.

Las aceitunas se sometieron a un proceso de molturación en cada almazara, siguiendo una técnica de obtención de aceite muy primaria. En la almazara de madera, el rodillo para molturar las aceitunas y la prensa es de madera (Figura III.1a), mientras que en la almazara de granito, el rodillo es de granito y la prensa es de metal (Figura III.1b).

En ambas almazaras, las muelas usadas son de una sola rueda que se mueven con la energía animal.



**Figura III.1a** Almazaras de madera en la región de Oujda-Taourirt, en el Este de Marruecos, usada para obtener muestras de aceite analizadas.



**Figura III.1b** Almazaras de granito en la región de Oujda-Taourirt, en el Este de Marruecos, usada para obtener muestras de aceite analizadas.

El tiempo de trituración de las aceitunas es alrededor de unas 12 horas para una molturación completa. La pasta se pone a triturar 4 a 6 veces para sacar el aceite de los mismos frutos, quedando los huesos y las pieles sin extracción y el todo forma el orujo que se elimina al final del proceso. La separación del aceite del agua de vegetación ha sido por una simple decantación y sin filtración lo que implica la inclusión de pequeñas cantidades de agua con el aceite.

En estas almazaras, muy representativas del tipo de almazara existente en la región rural de Oujda-Taourirt, donde las familias de la zona llevan las aceitunas en su mayoría procedentes de sus propias cosechas, no existen Planes Generales de Higiene (PGH) ni Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC) que garanticen la calidad higiénica de los aceites allí obtenidos.

En total, se han analizado 210 muestras de aceite, las cuales han sido clasificadas en tres grupos: A, B y C, según el tiempo de almacenamiento de sus correspondientes aceitunas:

- **Grupo A:** aceites obtenidos de aceitunas que han sido almacenadas durante 7 días.
- **Grupo B:** aceites obtenidos de aceitunas que han sido almacenadas durante 15 días.
- **Grupo C:** aceites obtenidos de aceitunas que han sido almacenadas durante 30 días.

De estas muestras:

- 138 muestras proceden de la almazara de granito. A su vez y dependiendo del tipo de envase utilizado para su conservación, 78 muestras (26/ grupo) han sido envasadas en botellas de Tereftalato de Polietileno (PET) y 60 muestras (20/ grupo) en botellas de cristal ámbar.

- 72 muestras proceden de la almazara de madera. Y de éstas ,36 muestras (12/ grupo) han sido envasadas en botellas de PET y 36 muestras (12/ grupo) en botellas de cristal ámbar.

Una vez obtenidos y envasados los aceites, todas las muestras han sido guardadas en laboratorio a temperatura ambiente (17-23 ° C) y protegidas de la luz, hasta su análisis a los 3 y a los 6 meses de almacenamiento.

## **2. MICROBIOLOGICAL ANALYSIS: MESOPHILIC AND PSYCHROTROPHIC BACTERIA, MOULDS, YEASTS AND *ENTEROBACTERIACEAE* IN OLIVES AND OLIVE OILS PRODUCED IN TRADITIONAL MILLS IN MOROCCO.**

### **2.1. MATERIALS AND METHODS**

#### ***2.1.1. Microbiological determinations***

The microbiological analysis was made on the olive pulp and on the olive oil (Figure III.2). In order to evaluate the microbiological quality, the microorganisms researched were mesophilic and psychrotrophic bacteria, moulds, yeasts and *Enterobacteriaceae*. The samples preparation was accomplished according to the methods described by Majadahonda (1982).

#### ***2.1.2. Apparatus and material of laboratory***

- Autoclave P. Selecta. Autester MOD. 437. G
- Incubator Thermo Scientific – Heraeus
- Bunsen burner
- Balance
- Vortex mixer / shaker
- Glass pipettes of 1, 10 and 25 ml
- Test tubes of 16 x 160 mm with plugs suitable for sterilizing
- Erlenmeyer flask of 100 and 250 ml
- Vessels of precipitates (1 and 2 litres)

- Sterile Petri plates (90 mm diameter)
- Inoculating triangle glass handle
- Inoculating loop handle

**DILUTIONS PREPARATION:** Buffered peptonated water (Scharlau) (Table III.1) was used for samples dilution.

Typical formula	g/l
Peptone	10.0
Sodium chloride	5.0
Disodium phosphate	9.0
Potassium phosphate	1.5

**Table III.1.** Composition of Peptone Water.

**PREPARATION:** 25.5 g of powder was dissolved in 1 liter of distilled water, distributed into containers and sterilized in the autoclave at 121°C for 15 minutes. The pH of the solution was adjusted prior sterilization to  $7.0 \pm 0.2$  with 0.1N of NaOH.

### 2.1.3 Samples preparation

For the olive pulp analyses, 20 g of each sample was weighted aseptically and homogenized in grinder (Taurus, Spain) with 180 ml of peptone water (1:10 dilution). Further 1 ml of 1:10 dilution was added to 9 ml of sterile peptone water solution, and then homogenized (1:10<sup>2</sup> dilutions). A series of decimal dilutions until 1:10<sup>5</sup> dilution, were made with the same solvents.

In order to analyze the olive oil, 1ml of each sample was taken aseptically (near the Bunsen burner). Then 1 ml of the sample was homogenized with 9 ml of

sterile peptone water (1:10 dilution). Several decimal dilutions were made with the same solvents until 1:10<sup>4</sup> dilutions were achieved.



**Figure III.2.** Olive oil obtained in traditional mill in region Oujda-Taourirt of Morocco.

#### **2.1.4 Enumeration of the total mesophilic bacteria**

Enumeration was made on Plate Count Agar (Oxoid) (Table III.2).

Typical formula	g/l
Tryptone	5
Yeast extract	2.5
Glucose	1
Agar	9

**Table III.2.** Composition of Plate Count Agar (P.C.A).

**PREPARATION:** 17.5 g of medium was suspended in 1 liter of distilled water, dissolved by bringing to the boil frequent stirring, mixed and distributed into final containers. The solution was sterilized by autoclaving at 121° C for 15 minutes. The pH of the medium was adjusted prior sterilization to 7.0 ± 0.2 with 0,1N of NaOH.



**TECHNIQUE:** 1 ml of each sample dilutions were dispensed in triplicate into 90-mm Petri plates, where an aliquot of between 15 and 20 ml sterile media, previously cooled to 47 ° C were added. The content was mixed gently by moving the plate several times in one direction and sometimes in the opposite direction and allowed to dry at room temperature. Further, plates were incubated; in invest position at 31°C for 72 h. It enumerated plates with 50-300 colonies.

Results were expressed as colony forming units of mesophilic microorganisms per gram of pulp olive (CFU/g) or per ml of olive oil (CFU/ml). The number of CFU was multiplied by the dilution factor (DF) and divided by the inoculation amount in order to determine the CFU per gram of olive paste. The CFU numbers were also transformed into corresponding logarithmic numbers.

**2.1.5. Enumeration of the total psychrotrophic bacteria**

Enumeration of the psychrotrophic bacteria was carried out on a solid medium of King A agar (Scharlau) (Table III.3) with glycerol (Panreac).

Typical formula	g/l
Peptone	20
Magnesium chloride	1.4
Potassium sulfate	10
Agar	15

**Table III.3.** Composition of King A Agar.

**PREPARATION:** 46.4 g of powder was suspended in 1 liter of distilled water with 10 ml of glycerol dissolved by bringing to the boil frequent stirring, mixed and distributed into final containers. The solution was sterilized by autoclaving at 121° C for 15 minutes. The pH of the medium was adjusted prior sterilization to 7.0 ± 0.2 with 0.1N of NaOH.

**TECHNIQUE:** An aliquot of between 15 and 20 ml sterile media, previously cooled to 47 °C was dispensed in triplicate into 90-mm Petri plates, and allowed to dry at room temperature. Further 0.1 ml of each diluted sample was dispensed in triplicate into Petri plates and extended with sterilized triangle glass handle. Plates were incubated at 17°C for 5 days, and enumerated with 50-300 colonies.

Results were expressed as colony forming units of psychrotrophic bacteria per gram of pulp olive (CFU/g) or per ml of olive oil (CFU/ml). The number of CFU was multiplied by the dilution factor (DF) and divided by the inoculation amount in order to determine the CFU per gram of olive paste. The CFU numbers were also transformed into corresponding logarithmic numbers.

#### **2.1.6. Enumeration of the total moulds and yeasts**

Moulds and yeasts were counted on Chloramphenicol agar (Scharlau) (Table III.4).

Typical Formula	g/l
Casein peptone	5
Meat peptone	5
D(+)-Glucose	40
Chloramphenicol	0.5
Agar	15

**Table III.4.** Composition of Sabouraud Chloramphenic Agar

**PREPARATION:** 65.5 g of powder was suspended in 1 liter of distilled water and brought to the boil. Then, the dissolution was distributed into final containers

and sterilized in the autoclave at 121°C for 15 minutes. The pH of the medium was adjusted prior sterilization to  $5.6 \pm 0.2$  with 0.1N of HCl.

**TECHNIQUE:** 1 ml of each sample dilution were dispensed in triplicate into 90-mm Petri dishes, where an aliquot of between 15 and 20 ml sterile media, previously cooled to 47 °C were added. The content was mixed gently by moving the plate several times in one direction and sometimes in the opposite direction and allowed to dry at room temperature. Further, plates were incubated in invest position at 25 °C for 5 days.

Results were expressed as colony forming units of moulds per gram of pulp olive (CFU/g) or per ml of olive oil (CFU/ml). The number of CFU was multiplied by the dilution factor (DF) and divided by the inoculation amount in order to determine the CFU per gram of olive paste. The CFU numbers were also transformed into corresponding logarithmic numbers.

### **2.1.7. Enumeration and identification of Enterobacteriaceae**

Analysis of Enterobacteriaceae microorganisms was carried out on TSB, (Cultimed) (Table III.5), EE, BROTH (Table III.6), VRBD (Scharlau) and (Table III.7).

Typical formula	g/l
soya peptone	3.0
Glucose	2.5
casein peptone	17.0
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5
sodium chloride	5.0

**Table III.5.** Composition of Tryptone Soy Broth (TSB).

**PREPARATION:** A suspension of 30 g was made in 1 liter of distilled water, mixed and heated gently until completely dissolved. The medium was sterilized at 121°C for 15 minutes. The pH of the medium was adjusted prior sterilization to  $7.3 \pm 0.2$  with 0.1N of NaOH.

Typical formula	g/l
Ox bile	20
Dextrose	5
Gelatin peptone	10
Monopotassium phosphate	2
Di-sodium phosphate (2H <sub>2</sub> O)	8
Brilliant green	0.015

**Table III.6.** Composition of Enrichment Enterobacteriaceae Broth (EE Broth).

**PREPARATION:** 45 g of powder was suspended in 1 liter of distilled water, mixed well and heated gently until completely dissolved. The pH of the medium was adjusted to  $7.2 \pm 0.2$  with 0.1N of NaOH. The medium was prepared without sterilization in autoclave.

Typical formula	g/l
Yeast extract	3.0
Peptone	7.0
Bile salts	1.5
D(+)-Glucose	10.0
Sodium chloride	5.0
Neutral red	0.03
Crystal violet	0.002
Agar	13.0

**Table III.7.** Composition of Violet Red Bile Dextrose Agar (VRBD).

**PREPARATION:** 39.5 g of powder was suspended in 1 liter of distilled water and brought to the boil with constant stirring. The pH of the dissolution was adjusted to  $7.2 \pm 0.2$  with 0.1N of NaOH. The medium does neither autoclave nor overheat.

**TECHNIQUE:** The cultivation was performed in Erlenmeyer flask. 1 ml of each sample dilution 1:10 were dispensed in duplicate into flasks containing 9 ml of TSB, the flasks were kept during 2 h at laboratory temperature, this first phase was for revivification of the possible *Enterobacteriaceae*. Passing 2 hours, 10 ml of broth EE were added at each flask. The flasks were incubated at 31°C during 24h; this second phase consisted to the enrichment of the *Enterobacteriaceae*. Petri plates with the VRBG medium were surface-inoculated with the last

mixture after the period of incubation, then these plates were incubated at 31 °C for 24 h; this way is for isolation and conformation of *Enterobacteriaceae*.

To consider microorganisms of *Enterobacteriaceae* as positive when they appear colonies tinted in violet red surrounded by a halo of the same color.

#### **2.1.8. Statistical analysis**

The results obtained are expressed as mean and standard deviations. To determine the influence of storage time, among other variables studied, when the variables fulfilled the parametric conditions, one-way ANOVA analysis was used, and when the variables were non-parametric, the Kruskal–Wallis test was used. Fisher's Least Significant Difference (LSD) procedure was used to discriminate between the means of the variables when necessary.

The Kolmogorov–Smirnov test and the Bartlett test were used to test the normal distribution of variables and the homogeneity of variances, as well as the Wilcoxon test. Statistical analysis was performed using SPSS 20.0 and Statgraphics1 Plus 4.1 software. Differences of  $p < 0.05$  were considered significant.

## 2.2. RESULTS AND DISCUSSION

Olives are the principal fruits produced in the agriculture area of Morocco, where their major quantity (75%) is destined for oil extraction (MAPM, 2013). Microbiological profile of olives and its corresponding oil is showed in Table III.8 and Table III.9.

### 2.2.1. Olive fruits.

The evolution of microorganisms' population (mesophilic bacteria, psychrotrophic bacteria, moulds and yeasts) during storage of Moroccan Picholine olives destined for the extraction of olive oil, after 7, 15 and 30 days (Groups A1, B1 and C1) was summarized in Table III.8.

Groups of samples	Storage time (days)	Mesophilics <sup>a</sup>	Psychrotrophics <sup>a</sup>	Moulds <sup>a</sup>	Yeasts <sup>a</sup>
A1	7	4.10 ± 3.78 a	4.84 ± 3.84 b	3.40 ± 2.76 a	4.09 ± 3.65 c
B1	15	4.06 ± 3.84 a	5.08 ± 3.55 c	3.96 ± 2.18 b	5.26 ± 4.95 b
C1	30	4.19 ± 3.87 a	4.65 ± 3.69 a	4.04 ± 3.04 c	5.30 ± 3.02 a

**Table III.8.** Quantity of micro-organisms ( $\log_{10}$  CFU/g) obtained in Moroccan Picholine olives stored for different periods.

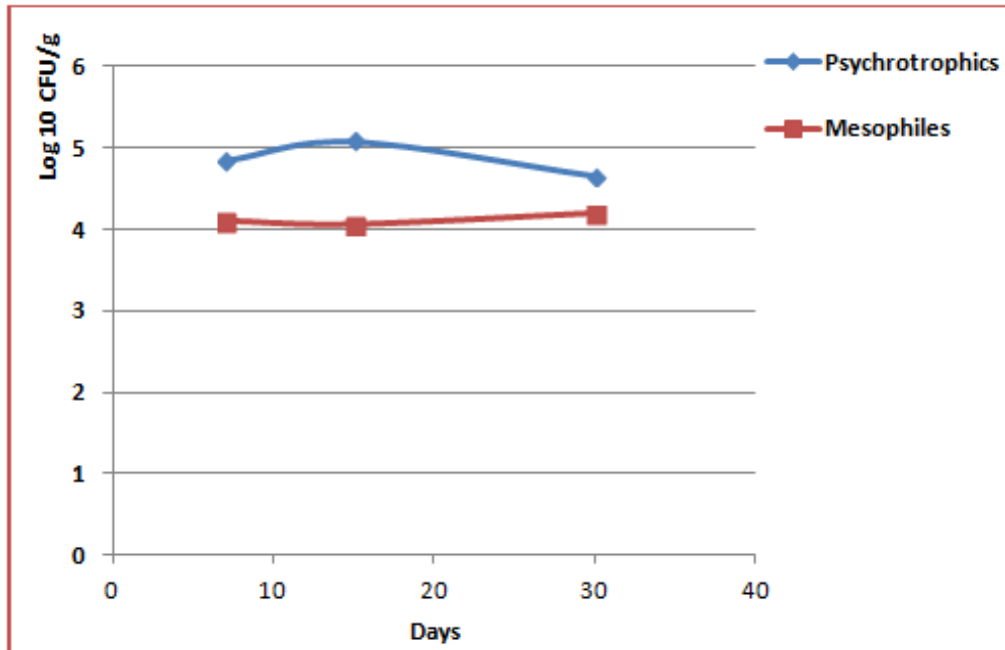
**Note:** <sup>a</sup> Means ± SD of three replicates, n = 24 (8/group).

Means followed by the same letter in the same micro-organism are not significantly different (p > 0.05).

#### **-Mesophilic and psychrotrophic bacteria**

The mesophilic bacteria were detected in all olive groups, without significant difference, whereas the number of psychrotrophic bacteria were reduced significantly after 30 days of storage (group C1), the change might be caused by the increase of mesophilic microorganisms mainly moulds or yeasts (Table III.8 and Figure III.3). Mesophilic and psychrotrophic bacteria were also

detected by Panagou (2006) in black olives used to prepare a traditional type of table olives known as “naturally black dry salted olives”. Silva et al. (2011) also reported that species of yeasts found in brined olives exhibited both mycogenic and antibacterial activities against common food-borne pathogens.



**Figure III.3.** Evolution of mesophilic and psychrotrophic bacteria during olive storage.

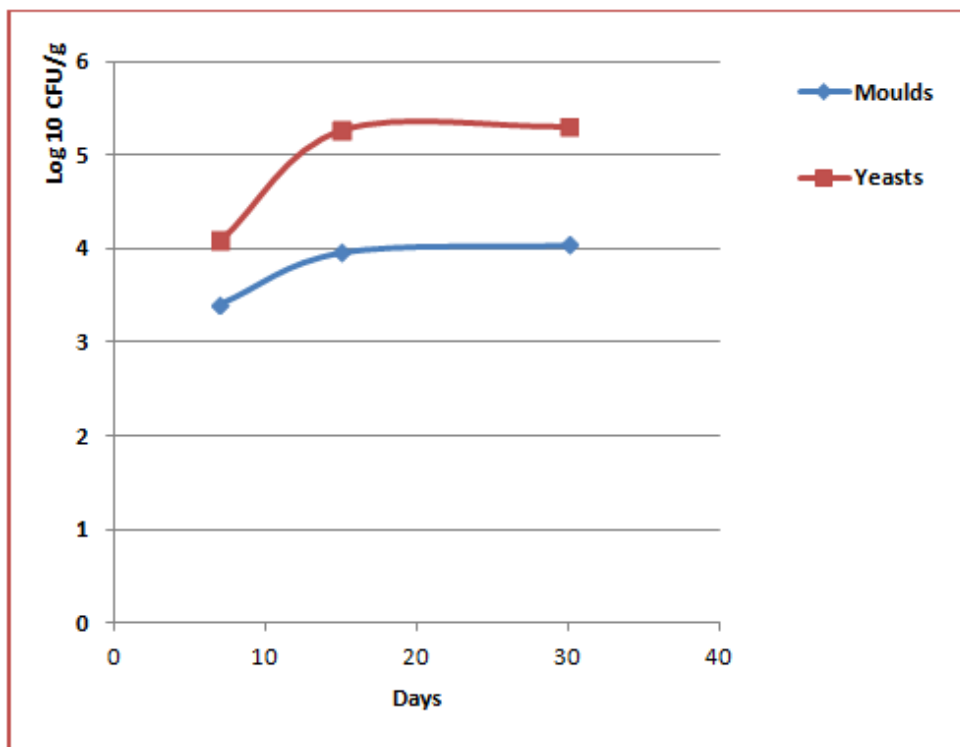
### **-Moulds and yeasts**

A significant increase ( $p < 0.05$ ) was detected in the mould population with longer storage (from 7 to 30 days) (Table III.8 and Figure III.4). The presence of moulds in Moroccan olives during storage was reported previously by Asehraou et al. (1992). Roussos et al. (2006) isolated moulds from spoiled olives and olive cake obtained from olive oil production in Morocco.

Many moulds strains are able to develop on olives and produce mycotoxins after harvesting and during storage (El Adlouni et al., 2006). Moreover, the presence of moulds can compromise the safety of the product, especially in the case of mycotoxin-producing fungi (Zinedine and Manes, 2009). The most representative microbiota of black olives was species of moulds (Asehraou et



al., 1992), which may be associated with food poisoning due to their mycotoxins.



**Figure III.4.** Evolution of moulds and yeasts during olive storage.

The yeast population increased significantly ( $p < 0.05$ ), from around 4.09 to 5.30 log<sub>10</sub> CFU/g, during storage (from 7 to 30 days) (Table III.8 and Figure III.4). The behaviour of yeasts was in good agreement with previous published works on olive brines (Arroyo-Lopez et al., 2008; Alves et al., 2012). Rodríguez-Gómez et al. (2010) reported that yeasts were found in high proportions during the ripe olive storage of Manzanilla and Hojiblanca cultivars, and they showed three phases: initial and vigorous growth (0-20 days), a relatively short stationary phase (usually between 3 and 5 days) and a decline phase with the presence of tailing. The same authors reported that microorganisms were increased in population to about 5.1 log<sub>10</sub> cfu/ml after 21-28 days of storage, and there was a decrease in the yeast population at a level of about 3.6 log<sub>10</sub> cfu/ml.

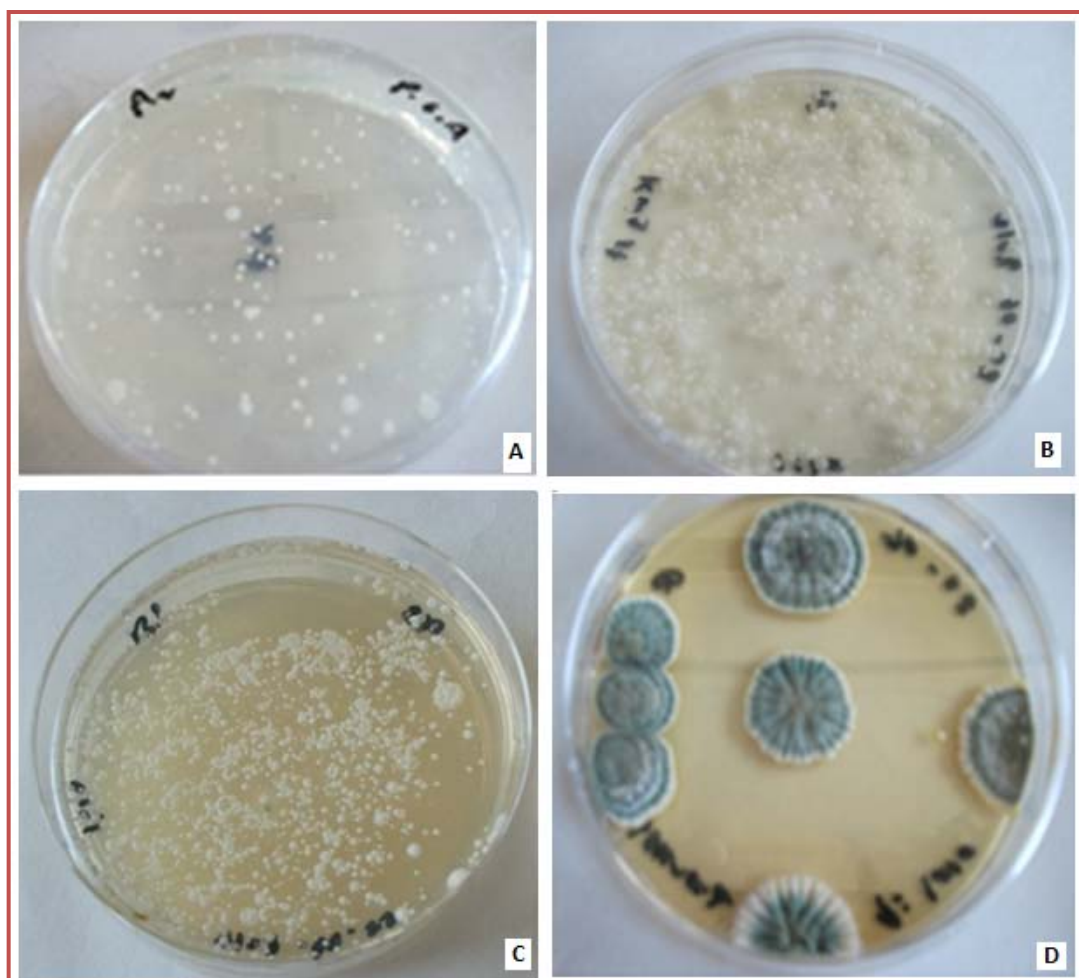
In a previous work (Panagou, 2006), yeasts coexisted with bacteria, showing about  $5.7 \log_{10}$  cfu/g in natural black olives cv Thassos in Crete. In the same study only yeasts were able to survive after 20 days of dry-salting and became the dominant microbial group, the population of which ranged from 4.7 to 6.0  $\log_{10}$  cfu/g throughout process. Similar microbiological results have been reported previously (Asehraou et al., 1992) in a survey of Moroccan dry-salted olives, according to which the prevailing microflora comprised of yeasts and moulds.

Moreover, several yeasts were obtained directly from natural black olive fermentations (Arroyo-López et al., 2006; Coton et al., 2006; Nisiotou et al., 2010) and green table olive fermentations (Bautista-Gallego et al., 2011). Furthermore, it was reported that yeasts were the most relevant microorganisms in the fermentation of cracked green table olives (Alves et al., 2012).

Yeast species with lipolytic activities were isolated from table olives (Marquina et al., 1992; Psani and Kotzekidou, 2006; Hernández et al., 2007; Rodríguez-Gómez et al., 2010). And its presence in olive fermentation can yield it with a milder taste and less stability (Panagou et al., 2008). Furthermore, the presence of bacteria and fungi in olives may modify the nutritional composition of the olive oil as well as its quality parameters.

### **2.2.2. Olive oil.**

The results obtained on the evolution of microorganisms populations; mesophilic bacteria, psychrotrophic bacteria, moulds and yeasts (Figure III.5), in groups A, B and C of olive oil extracted from olives stored for 7, 15 and 30 days, respectively, were summarized in Table III.9. The *Enterobacteriaceae* were not detected throughout the entire study.



**Figure III.5.** Microorganisms found in olive oil samples; A: Mesophilic bacteria, B: Psychrotrophic bacteria, C: Yeasts and D: Moulds.

A rich microflora was showed in olive oil recovered after a single decantation (Ciafardini and Zullo, 2002). The micro-organisms found in the oil were derived from the olives' phyllosphera which, during the crushing of the olives, migrate into the oil together with the solid parts of the fruit and micro-drops of vegetation water (Zullo and Ciafardini, 2008). The presence of vegetation water with oil may lead to formation of an oil-in-water emulsion. In fact, presence of water in oil showed an important role in both the growth of microorganisms and their enzyme function (Yoshida et al., 2011). Furthermore, catalytic reaction of lipases took place at the lipid–water interface, a phenomenon known as interfacial activation (Schmidt and Verger, 1998).

Mill/ Container	Groups of samples	Mesophilics <sup>a</sup>		Psychrotrophics <sup>a</sup>	
		3 months	6 months	3 months	6 months
Granite/ PET (n=78)	A	3,33 ± ,19 cA	2,88 ± 2,35 aA*	4,53±4,22 aA*	4,10 ± 3,39 bA*
	B	3,46 ± 3,19 bB	2,88 ± 2,51 aC*	3,96 ± 3,05 bC	2,55 ± 2,30 aC
	C	3,29 ± 3,04 aC	2,31 ± 2,24 bE	4,05 ± 3,98 bE	2,68 ± 2,59 aD
Granite/ Glass (n=60)	A	3,01 ± 1,30 aA*	1,96 ± 1,16 cB	3,16 ± 1,17 aB	1,92 ± 0,74 bB*
	B	3,76 ± 0,87 bB*	2,29 ± 1,01 dD	3,16 ± 1,27 aD	2,40 ± 0,81 bC
	C	3,55 ± 1,11 abC	2,30 ± 0,97 dF	2,71 ±1,46 aE	1,73 ± 1,06 bE
Wood/ PET (n=36)	A	3,41 ± 0,52 aA	2,28 ± 0,48 bB*	4,11 ±0,89 aA*	2,51 ± 0,72 bB*
	B	3,35 ± 0,50 aA	2,36 ± 0,50 bB*	3,75 ±1,13 aA	2,39 ± 0,90 bB
	C	3,68 ± 0,89 aA	2,61 ± 0,75 bB	3,14 ±1,58 aA	2,02 ± 1,32 bB
Wood/ Glass (n=36)	A	3,21 ± 0,34 aA	2,14 ± 0,47 bB	3,73 ±1,03 aA	2,76 ± 1,08 bB*
	B	3,19 ± 0,26 aA*	2,27 ± 0,63 bB	3,83 ± 1,03 aA	2,07 ± 1,09 dcB
	C	3,38 ± 1,08 aA	1,97 ± 1,01 bB	2,88 ± 1,62 aA	1,81 ± 1,13 bB

**Table III.9.** Quantity of micro-organisms ( $\log_{10}$  CFU/ml) obtained in olive oil produced in traditional Moroccan olive oil mills and stored for 3 and 6 months.

**Note:** A (oil obtained from olives stored for 7 days), B (oil obtained from olives stored for 15 days) and C (oil obtained from olives stored for 30 days).

<sup>a</sup> Means  $\pm$  SD of three replicates.

-Means followed by the same small letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ), comparing, between the same type of microorganisms, of the same type of container and of the same type of mill.

-Means followed by the same big letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ), comparing, between two type of container of the same type of mill.

-Means followed by the same symbol:\* are significantly different ( $p < 0.05$ ), comparing, between the same container of two type of mill.

Mill/ Container	Groups of samples	Moulds <sup>a</sup>		Yeasts <sup>a</sup>	
		3 months	6 months	3 months	6 months
Granite/ PET (n=78)	A	1,96 ± 1,80 a A	-	2,71 ± 2,51 a A	4,46 ± 4,03 d A
	B	1,80 ± 1,73 a A	-	2,75 ± 2,65 a B	3,83 ± 3,53 b C
	C	2,24 ± 2,12 a A*	-	2,87 ± 2,32 a D	2,77 ± 2,75 c D
Granite/ Glass (n=60)	A	0,47 ± 0,85 a B*	-	3,21 ± 1,08 c A	3,28 ± 0,83 c B
	B	1,03 ± 1,44 a A	-	4,00 ± 0,82 b C*	3,83 ± 1,18 b C*
	C	0,86 ± 1,04 a B*	-	3,56 ± 1,07 b c E	2,58 ± 1,03 b c D*
Wood/ PET (n=36)	A	1,65 ± 0,95 a A	-	3,00 ± 1,46 a A	2,97 ± 1,44 a A
	B	1,25 ± 1,30 a A	-	2,95 ± 0,98 a A	3,60 ± 0,86 a A
	C	1,52 ± 1,06 a A*	-	3,27 ± 1,29 a A	2,07 ± 1,28 b B
Wood/ Glass (n=36)	A	1,45 ± 0,87 a A*	-	2,73 ± 1,53 a A	2,77 ± 1,42 a A
	B	1,00 ± 0,97 a A	-	3,11 ± 1,12 a A*	3,28 ± 0,54 a A*
	C	1,37 ± 1,09 a A*	-	3,32 ± 1,19 a A	2,18 ± 1,09 b B*

**Table III.9.** (Continuation) Quantity of micro-organisms ( $\log_{10}$  CFU/ml) obtained in olive oil produced in traditional Moroccan olive oil mills and stored for 3 and 6 months.

**Note:** A (oil obtained from olives stored for 7 days), B (oil obtained from olives stored for 15 days) and C (oil obtained from olives stored for 30 days).

<sup>a</sup> Means ± SD of three replicates.

-Means followed by the same small letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ), comparing, between the same type of microorganisms, of the same type of container and of the same type of mill.

-Means followed by the same big letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ), comparing, between two type of container of the same type of mill.

-Means followed by the same symbol:\* are significantly different ( $p < 0.05$ ), comparing, between the same container of two type of mill.

***-Mesophilic and psychrotrophic bacteria***

Mesophilic bacteria were demonstrated after 3 months storage in all groups of olive oil produced in two type of mill: Granite mill and wood mill (Table III.9 and Figure III.6). After 6 months storage, number of these bacteria decreased significantly ( $p < 0.05$ ). Considering the type of container and mill, there are no significant difference in all samples in PET and Glass bottles from Granite and Wood mills.

Psychrotrophic bacteria were observed at 3 months in olive oil samples (Table III.9 and Figure III.7), and demonstrated a significant reduction between three and six months storage in all type of containers. But difference between these types of containers and mill was not detected in all samples.

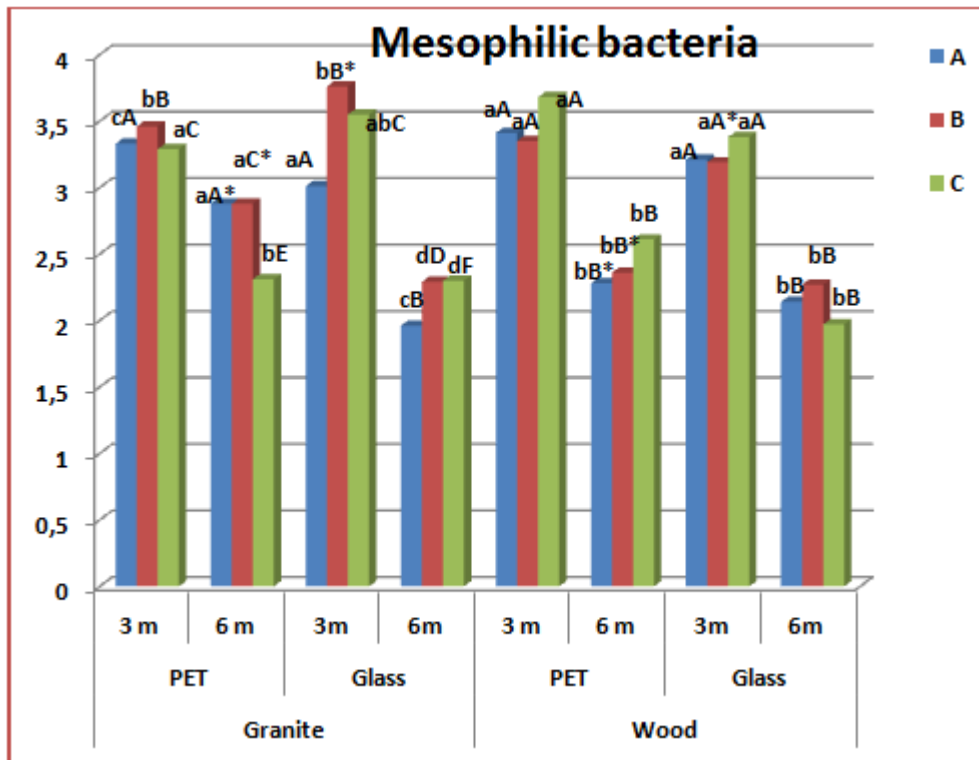


Figure III.6. Evolution of mesophilic bacteria during olive oil storage.

**Note:** A (oil obtained from olives stored for 7 days), B (oil obtained from olives stored for 15 days) and C (oil obtained from olives stored for 30 days).

<sup>a</sup> Means  $\pm$  SD of three replicates.

-Means followed by the same small letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ), comparing, between the same type of microorganisms, of the same type of container and of the same type of mill.

-Means followed by the same big letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ), comparing, between two type of container of the same type of mill.

-Means followed by the same symbol:\* are significantly different ( $p < 0.05$ ), comparing, between the same container of two type of mill.

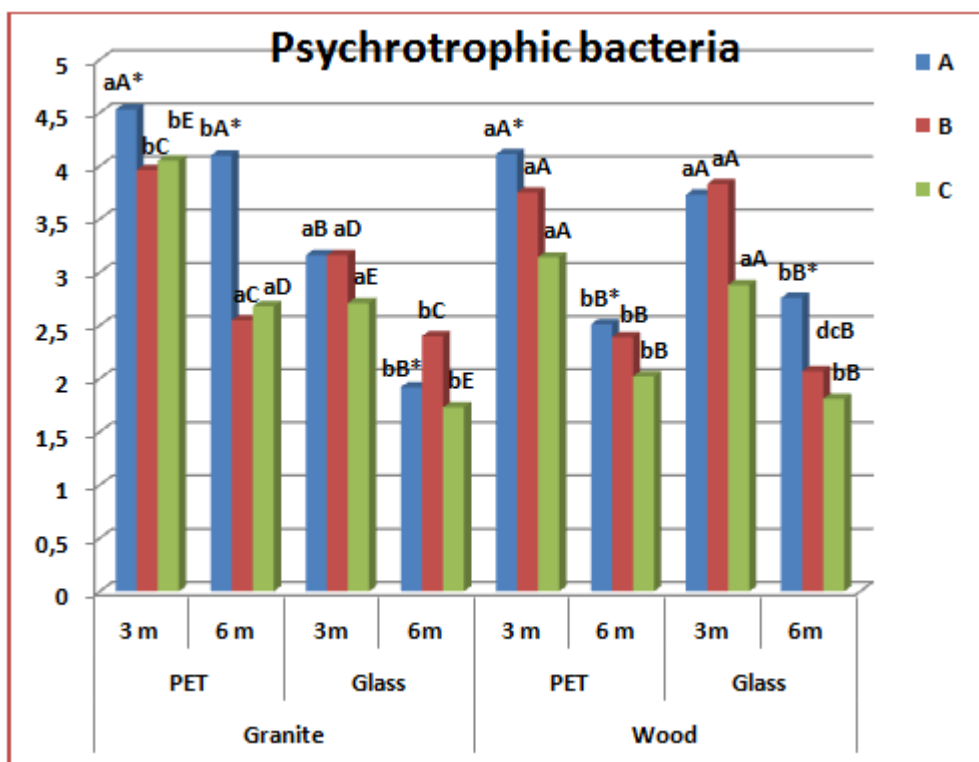


Figure III.7. Evolution of psychrotrophic bacteria during olive oil storage.

**Note:** A (oil obtained from olives stored for 7 days), B (oil obtained from olives stored for 15 days) and C (oil obtained from olives stored for 30 days).

<sup>a</sup> Means  $\pm$  SD of three replicates.

-Means followed by the same small letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ), comparing, between the same type of microorganisms, of the same type of container and of the same type of mill.

-Means followed by the same big letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ), comparing, between two type of container of the same type of mill.

-Means followed by the same symbol:\* are significantly different ( $p < 0.05$ ), comparing, between the same container of two type of mill.

Olive oil has been found to be the most suitable carbon source for mesophilic and psychrotrophic bacteria to induce lipase (Shafei and Abd-Elsalam, 2005; Zhen-Qian and Chun-Yun, 2009; Liu et al., 2011). Psychrotrophic bacteria showed a high catalytic activity of lipases (Mayordomo et al., 2000; Rashid et al., 2001; Lee et al., 2003; Zhang and Zeng, 2006; Yang et al., 2008; Park et al., 2009). Mesophilic bacteria are also indicated in causing long-chain fatty acids



(LCFA) degradation (Roy et al., 1986; Lorowitz et al., 1989; Jackson et al., 1999; Lalman and Bagley, 2001; Pereira et al., 2002, 2004; Zhang et al., 2004; Shigematsu et al., 2006; Becker, 2010; Valladão et al., 2011; Gonçalves et al., 2012). Furthermore bacteria and fungi have been shown in production of enzymes to hydrolyze triglycerides (Ciafardini et al., 2006; Ertuğrul et al., 2007; Zullo and Ciafardini, 2008) and phenolic components (Ciafardini et al., 1994; Marsilio et al., 1996; Marsilio and Lanza, 1998; Ciafardini and Zullo, 2000; Ciafardini and Zullo, 2002; Rodríguez et al., 2008b; Rodríguez et al., 2008c; Landete et al., 2010).

Additionally, bacteria have been implicated in foodborne diseases (McLauchlin et al., 2004; Codex, 2009 ; Orsi et al., 2011; Pires et al., 2012; Quesada-Gómez et al., 2013; Martín-Belloso et al., 2014; Chaves and Brashears, 2014; Powell, 2014). The changes in microorganisms with storage can be explained by a reduction of nutrients and/or accumulation of products not favourable for bacterial growth.

It should be emphasized that the olive oil obtained in traditional Moroccan olive mills is not filtrated. Thus, the olive oil obtained is a trouble product, as a result of water-in-oil emulsion. The presence of water leads to microbial growth and production of enzymes using oil as substrate. During storage of oil, the two lipid and aqueous phases are subject to separation by decantation. This process leads to dehumidification of oil, and reduces consequently the microbial activity in oil. However, this process is too long and it usually occurs at ambient temperature, where the oil is stored, conducting to rapid olive oil deterioration.

The decrease of bacteria during storage indicated bacterial growth inhibition or death. This may be due to the reduction of humidity in oil (water-oil-emulsion), due to the decantation during storage. Furthermore, several investigations showed inhibitory effect of lipids, affecting the metabolism of microorganisms (Lalman and Bagley, 2002; Pereira et al., 2004; Templer et al., 2006; Cirne et al., 2007; Palatsi et al., 2011; Valladão et., 2011). The inhibitory effect is commonly attributed to long-chain fatty acids (LCFA), derived from the

hydrolysis step (Lalman and Bagley, 2002; Cirne et al., 2007; Battimelli et al., 2010; Zhang et al., 2011).

The main olive oil hydrolysis product, oleic acid, causes a significant growth-inhibitory action and cytotoxic effect of bacteria (Becker, 2010). LCFA are generally known for their antimicrobial action, against bacteria and yeasts (Becker, 2010). The indicated inhibition is explained as a consequence of the passive uptake of the un-dissociated form of the fatty acid, which disturbs the transmembrane proton gradient and there by affects ATPase activity (Becker, 2010). On the other hand, effects of different phenolic compound on bacteria growth have been studied by several authors. Brines from non alkali-treated green olives were tested for their antimicrobial properties against bacteria (Ruíz-Barba et al., 1990), isolated from traditional homemade olive brines (Rozès and Peres 1998). Hydroxytyrosol and oleuropein had the most potent antimicrobial activity amongst olive oil phenols against different harmful bacteria of the intestinal microbiota (Medina et al., 2006; Bubonja-Sonje et al., 2011). The phenolic, oleocanthal has also been found to escape hydrolysis under stomach-simulated conditions and aid in inhibiting the growth of bacteria, which have been associated with peptic ulcer and gastric cancer development (Romero et al., 2007). Besides, it has been shown that virgin olive oil in mayonnaise and salad significantly reduced the counts of inoculated food borne pathogens bacteria (Medina et al., 2007).

Other effects that may contribute to bacterial growth inhibition or death include cell lysis, inhibition of enzyme activity, impairment of nutrient uptake and the generation of toxic peroxidation and autooxidation products (Desbois and Smith, 2010; Valladão et al., 2011).

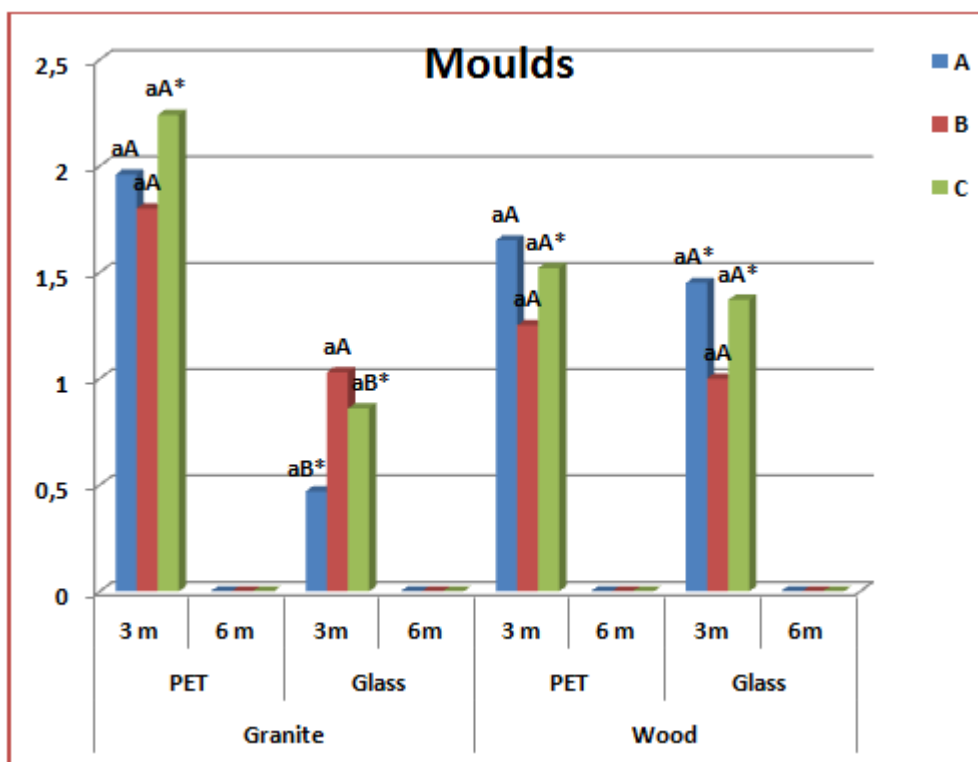
### ***-Mould and yeast***

Presence of moulds was indicated in all olive oil samples at 3 months storage (Table III.9 and Figure III.8).

The occurrence of toxigenic moulds in olives processed by the non controlled traditional method is possible and olives are among the commodities with high risk of mycotoxin contamination (Zinedine et al., 2009).

Moulds are able to produce several types of Mycotoxins (Tantaoui-Elaraki et al., 1994; Eaton and Gallagher, 1994; Abarca et al., 2003; Bennett and Klich, 2003). Due to its unavoidable and unpredictable nature, mycotoxin contamination presents a unique challenge to food safety (Stoev, 2013). And, that usually enter the body via ingestion of contaminated foods, but inhalation of toxigenic spores and direct dermal contact are also important routes (Zinedine et al., 2009). These substances constitute a potential risk for human and animal health. The chemical and biological properties of the mycotoxins are varied and their toxic effects are extremely variable. These effects are carcinogenicity, genotoxicity, teratogenicity, nephrotoxicity, hepatotoxicity, immunotoxicity and others (Gelderblom et al., 1992; Bucci et al., 1998; Howard et al., 2001; Conkova et al., 2003; Van Waes et al., 2005; Missmer et al., 2006; Stoev, 2007; Stoev, 2008; Zinedine et al., 2009; Stoev et al., 2010a, 2010b).

The dynamic mould population in the olive oil samples after three months storage was completely eliminated after 6 months storage in all oil groups, possibly due to the exhaustion of available substrates or/ and to the inhibitory effect of olive oil components and dehumidification of water-oil-emulsion by decantation during storage (Table III.9 and Figure III.8).



**Figure III.8** Evolution of moulds during olive oil storage.

**Note:** A (oil obtained from olives stored for 7 days), B (oil obtained from olives stored for 15 days) and C (oil obtained from olives stored for 30 days).

<sup>a</sup> Means  $\pm$  SD of three replicates.

-Means followed by the same small letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ), comparing, between the same type of microorganisms, of the same type of container and of the same type of mill.

-Means followed by the same big letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ), comparing, between two type of container of the same type of mill.

-Means followed by the same symbol:\* are significantly different ( $p < 0.05$ ), comparing, between the same container of two type of mill.

Different works described the importance of mould and yeast in lipase production (Belhaj-Ben Romdhane et al., 2010; Contesini et al., 2010; Yoshida et al., 2011; Sathish Yadav et al., 2011). Moreover, the fungal growth in olives was associated with mycotoxin production (Eltem, 1996; Leontopoulos et al., 2003) and hence its presence in the processing environment showed a potential health risk and should be avoided (Hondrodinou et al., 2011).

In fact, yeasts were found to coexist with bacteria and mould after 3 months storage (Table III.9 and Figure III.9). Content of yeasts did not change significantly in all groups, comparing between two types of container; PET and Glass, and two types of mill; Wood and Granite. The low change in yeasts contents may be due to their sporulation leading to resistance in dehumidified olive oil.

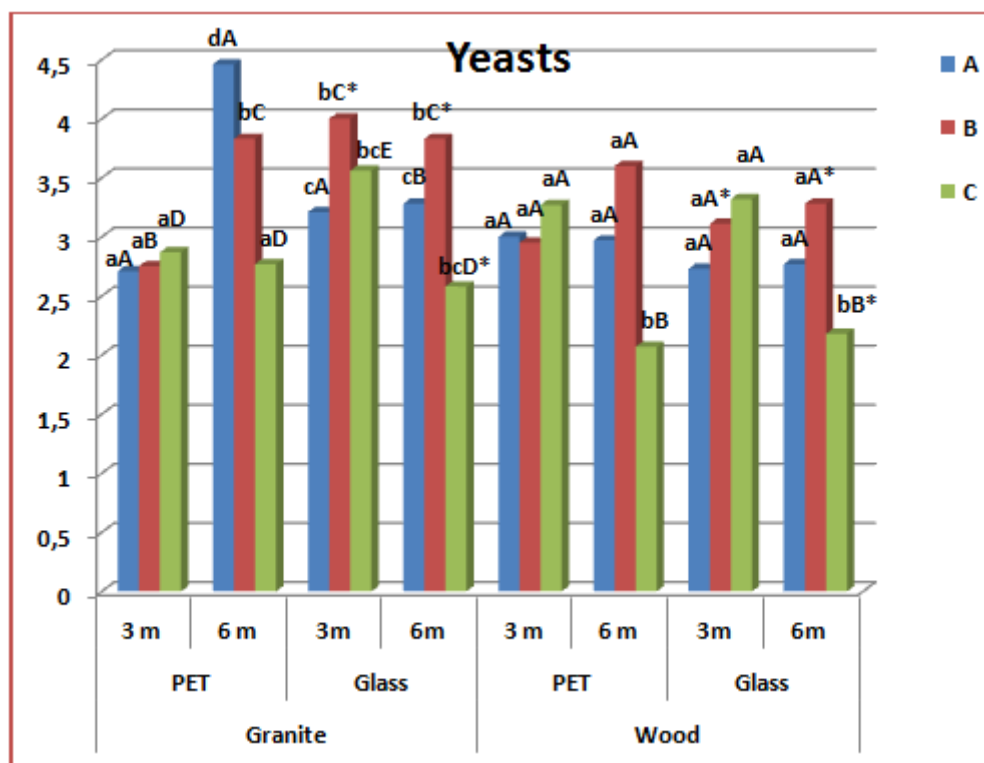


Figure III.9. Evolution of yeasts during olive oil storage.

**Note:** A (oil obtained from olives stored for 7 days), B (oil obtained from olives stored for 15 days) and C (oil obtained from olives stored for 30 days).

<sup>a</sup> Means  $\pm$  SD of three replicates.

-Means followed by the same small letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ), comparing, between the same type of microorganisms, of the same type of container and of the same type of mill.

-Means followed by the same big letter are not significantly different ( $p > 0.05$ ), comparing, between two type of container of the same type of mill.

-Means followed by the same symbol:\* are significantly different ( $p < 0.05$ ), comparing, between the same container of two type of mill.

The absence of moulds would be result a limited competition for nutrients between the other three kinds of microorganisms, in favour of yeasts. Besides, species of yeasts in table olives could be destructive for the rest of the bacterial flora (Hernandez et al., 2008).

Several strains of yeasts with lipolytic activities were isolated from extra virgin olive oil (Ciafardini and Zullo, 2002; Ciafardini et al., 2004; Ciafardini et al., 2006 a; Zullo and Ciafardini, 2008; Zullo et al., 2010).

Furthermore, some human pathogen species of yeasts which have been indicated in fungaemia, lesion of the skin, human vaginitis (De Bernardis et al., 1990) or endocarditis (Weems, 1992) were found in commercial extra virgin olive oil (Zullo and Ciafardini, 2008; Koidis et al., 2008). Human opportunistic pathogenic forms of yeasts which are the most widespread species found in immunodepressed hospital patients were also found in commercial extra virgin olive oil (Zullo et al., 2010).

Nevertheless, olive oil produced in traditional oil mill in Morocco is to be considered a particular habitat containing various forms of microorganisms. Because oil produced is rich of water, a water-oil-emulsion not filtrated, and microorganisms became of a long storage of olive fruits before milling.

The existence of microorganisms and water in olive oil may increase the deterioration of it subsequent quality and put the human health in risk. Although, surveys show that microbial contamination is one of the major concerns from a consumer point of view (Ergönül, 2013).

The consumer could be exposed to risks of possible toxic substances produced by bacteria or/and fungi. The production of oil with microorganisms is due to the fact that some food safety and quality standards such as the Good Hygiene Practices (GHPs) and the Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) system are not applied and performed in some Moroccan traditional olive oil mills.

GHPs is recommended to assure hygiene and safety of food (FAO/WHO, 2009; Ababio and Lovatt, 2015) and need to be regulated and enforced to strengthen the sector of olive oil production, to control hygiene for avoiding or reducing growth of microorganisms during all stage oil production; from harvest, transport and storage of olives to its crushing and putting oil in containers.

HACCP system is considered as the reference method for food safety management of choice worldwide (Martín-Belloso et al., 2014; Motarjemi, 2014), and its reported that only integrated approach to food safety, which includes systematic identification and assessment of hazards in foods and various means to control them, could resolve various existing problems in this field (Stoev, 2013). Therefore, HACCP is also of a particular importance to improve the olive oil safety assurance in olive oil produced in traditional mills in Morocco.

### **3. ANALISIS FISICOQUÍMICOS DE ACEITE DE OLIVA PRODUCIDO EN ALMAZARAS TRADICIONALES EN MARRUECOS.**

#### **3.1 MATERIALES Y MÉTODOS**

##### ***Parámetros de calidad estudiados***

Los parámetros de calidad: grado de acidez, expresado en porcentaje de ácido oleico (%), el índice de peróxidos (PV), expresado en milliequivalentes de oxígeno activo por Kg de aceite (meq O<sub>2</sub>/Kg), y los coeficientes de extinción K232 y K270 calculados a partir de la absorbencia a 232 y 270 nm respectivamente, han sido determinados según los métodos establecidos por la Comunidad Europea, Regulación de la Comisión (CEE) N° 2568/91 y subsecuente Comunidad Europea, Regulación de la Comisión (UE) N° 61/2011 de 24 de enero de 2011(Tabla III.10).

##### ***Aparatos y materiales de laboratorio***

- Balanza analítica con precisión de décimas de miligramo Mettler AE200
- Pipeta de 10 y 25 ml
- Erlenmeyer de 250 ml
- Probeta de 100ml
- Bureta de 50 ml
- Vasos de precipitado de 500 ml
- Matraces aforados de 10 con tapones de vidrio
- Cubetas de cuarzo
- Material de vidrio de calidad contrastada, necesaria para volumetría
- Espectrofotómetro para medidas de extinción en el ultravioleta, modelo BOECO S-22 Germany.



Material y métodos

Categoría	Ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES) y ésteres etílicos de los ácidos grasos (FAEEs)	Acidez (%) <sup>(1)</sup>	Índice de peróxidos mEq O <sub>2</sub> /kg <sup>(1)</sup>	Ceras mg/kg <sup>(**)</sup>	Monopalmitato de 2-glicerilo (%)	Estigmastadieno mg/kg <sup>(1)</sup>	Diferencia ECN42 (HPLC) y ECN42 (cálculo teórico)	K <sub>232</sub> (%)	K <sub>270</sub> (%)	Delta-K (%)	Evaluación organoléptica Mediana del defecto (Md) (%)	Evaluación organoléptica Mediana del atributo frutado (Mf) (%)
1. Aceite de oliva virgen extra	Σ FAMES + FAEEs ≤ 75 mg/kg o 75 mg/kg < Σ FAMES + FAEEs ≤ 150 mg/kg y (FAEEs/FAMES) ≤ 1,5	≤ 0,8	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,50	≤ 0,22	≤ 0,01	Md = 0	Mf > 0
2. Aceite de oliva virgen	—	≤ 2,0	≤ 20	≤ 250	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,10	≤ 0,2	≤ 2,60	≤ 0,25	≤ 0,01	Md ≤ 2,5	Mf > 0
3. Aceite de oliva lampante	—	> 2,0	—	≤ 300 <sup>(1)</sup>	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 si % ácido palmítico total > 14 %	≤ 0,50	≤ 0,3	—	—	—	Md > 2,5 <sup>(2)</sup>	—
4. Aceite de oliva refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	≤ 350	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,1 si % ácido palmítico total > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 1,10	≤ 0,16	—	—
5. Aceite de oliva (compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes)	—	≤ 1,0	≤ 15	≤ 350	≤ 0,9 si % ácido palmítico total ≤ 14 % ≤ 1,0 si % ácido palmítico total > 14 %	—	≤ 0,3	—	≤ 0,90	≤ 0,15	—	—
6. Aceite de orujo de oliva bruto	—	—	—	> 350 <sup>(1)</sup>	≤ 1,4	—	≤ 0,6	—	—	—	—	—
7. Aceite de orujo de oliva refinado	—	≤ 0,3	≤ 5	> 350	≤ 1,4	—	≤ 0,5	—	≤ 2,00	≤ 0,20	—	—
8. Aceite de orujo de oliva	—	≤ 1,0	≤ 15	> 350	≤ 1,2	—	≤ 0,5	—	≤ 1,70	≤ 0,18	—	—

(<sup>1</sup>) Suma de isómeros que podrían separarse (o no) mediante columna capilar.  
(<sup>2</sup>) O cuando la mediana de los defectos es inferior o igual a 3,5 y la mediana del atributo frutado es igual a 0.  
(<sup>3</sup>) Los aceites con un contenido en ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de oliva lampante si los alcoholes alifáticos totales son inferiores o iguales a 350 mg/kg o si el porcentaje de eritrodil y uvaol es inferior o igual a 3,5.  
(<sup>4</sup>) Los aceites con un contenido en ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de orujo de oliva crudo si los alcoholes alifáticos totales son superiores a 350 mg/kg y si el porcentaje de eritrodil y uvaol es superior a 3,5.

Tabla III.10. Características de aceite de oliva según la Regulación de la Comisión (UE) Nº 61/2011.

## Material y métodos

Categoría	Contenido de ácidos (%)						Sumas de los isómeros trans-oleicos (%)	Sumas de los isómeros translinoleicos + translinoleicos (%)	Composición de los esteroides						Esteroides totales (mg/kg)	Eritrodiol y uvaol (%) (**)
	Mirístico (%)	Linoléico (%)	Araquídico (%)	Eico-sa-noico (%)	Behénico (%)	Lignocérico (%)			Colesterol (%)	Brasicasterol (%)	Campesterol (%)	Estigmasterol (%)	Betasitosterol (%) (†)	Delta-7-estigmas-tenol (%)		
1. Aceite de oliva virgen extra	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
2. Aceite de oliva virgen	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,05	≤ 0,05	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
3. Aceite de oliva lampante	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,10	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5 (*)
4. Aceite de oliva refinado	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
5. Aceite de oliva (compuesto de aceites de oliva refinados y de aceites de oliva vírgenes)	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,2	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,30	≤ 0,5	≤ 0,1	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 000	≤ 4,5
6. Aceite de orujo de oliva bruto	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,20	≤ 0,10	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	—	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 2 500	> 4,5 (*)
7. Aceite de orujo de oliva refinado	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 800	> 4,5
8. Aceite de orujo de oliva	≤ 0,05	≤ 1,0	≤ 0,6	≤ 0,4	≤ 0,3	≤ 0,2	≤ 0,40	≤ 0,35	≤ 0,5	≤ 0,2	≤ 4,0	< Camp.	≥ 93,0	≤ 0,5	≥ 1 600	> 4,5

(†) Contenido de otros ácidos grasos (%): palmítico: 7,5 - 20,0; palmitoleico: 0,3 - 3,5; heptadecanoico: ≤ 0,3; heptadecenoico: ≤ 0,3; esteárico: 0,5 - 5,0; oleico: 55,0 - 83,0; linoleico: 3,5 - 21,0.

(‡) Suma de: delta-5,23-estigmastadienol + cleroesterol + beta-sitosterol + sitostanol + delta-5-avenasterol + delta-5,24-estigmastadienol.

(§) Los aceites con un contenido en ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de oliva lampante si el contenido de alcoholes alifáticos totales es inferior o igual a 350 mg/kg o si el porcentaje de eritrodiol y uvaol es inferior o igual a 3,5.

(¶) Los aceites con un contenido en ceras comprendido entre 300 mg/kg y 350 mg/kg se consideran aceite de orujo de oliva bruto si el contenido de alcoholes alifáticos totales es superior a 350 mg/kg y si el porcentaje de eritrodiol y uvaol es superior a 3,5.

Notas:

a) Los resultados de los análisis deben expresarse indicando el mismo número de decimales que el previsto para cada característica.  
La última cifra expresada deberá redondearse hacia arriba si la cifra siguiente es superior a 4.

b) Es suficiente con que una sola de las características no se ajuste a los valores indicados para que el aceite cambie de categoría o se declare no conforme en cuanto a su pureza.

c) Las características indicadas con un asterisco (\*), relativas a la calidad del aceite, implican lo siguiente:  
— en el caso del aceite de oliva lampante, pueden no respetarse simultáneamente los límites correspondientes;  
— en el caso de los aceites de oliva vírgenes, el incumplimiento de al menos uno de estos límites supondrá un cambio de categoría, aunque seguirán clasificándose en una de las categorías de los aceites de oliva vírgenes.

d) Las características indicadas con dos asteriscos (\*\*), relativas a la calidad del aceite, implican que, en el caso de todos los aceites de orujo de oliva, pueden no respetarse simultáneamente los límites correspondientes.»

**Tabla III.10. (Continuación). Características de aceite de oliva según la Regulación de la Comisión (UE) N° 61/2011.**

### **3.1.1. Determinación del grado de acidez.**

#### **Fundamento**

El método para medir el grado de acidez o porcentaje de ácidos grasos libres, expresado en ácido oleico consiste en la valoración para una volumetría de la disolución del aceite en una mezcla de disolventes orgánicos: El éter dietílico y el etanol mediante una solución etanólica de hidróxido potásico usando una solución de fenolftaleína (1%) como indicador.

#### **Reactivos**

<b>Reactivos</b>	<b>Proveedor</b>
Éter dietílico	Panreac
Etanol 96%	Panreac
Fenolftaleína	Panreac
Hidróxido potásico	Panreac

#### **Preparación de los reactivos**

- Disolución alcohólica de fenolftaleína 1 %; se pesó 1 g de fenolftaleína y se diluyó con 100 ml de alcohol etílico al 96 %.
- Mezcla de éter dietílico y etanol (1:1); para cada muestra, al momento del análisis, se mezclaron 25 ml de éter con 25 ml de alcohol y 3 ó 4 gotas de fenolftaleína (el éter dietílico es muy inflamable y puede formar peróxidos explosivos; debe utilizarse con

precaución). La mezcla se neutralizó añadiendo gota a gota solución de KOH 0,1N hasta aparición de un color rosa tenue.

- Solución acuosa de hidróxido de potasio 0,1 N; se pesó con precisión de 0,001 g la cantidad necesaria de hidróxido de potasio.

El KOH se disolvió en un vaso de precipitado con una cantidad mínima de agua destilada y después, se pasó la disolución a un matraz aforado y se enrazó al volumen final deseado.

### **Procedimiento**

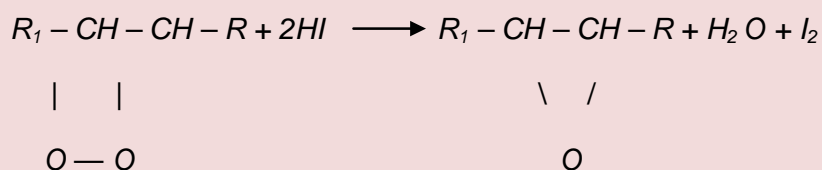
En un Erlenmeyer tarado se pesaron 10 g de aceite con precisión al cg. Se vertieron los 50 ml de mezcla alcohol/ éter en el matraz con aceite y se agitó hasta la disolución total del aceite en la mezcla. A continuación, y sin dejar de agitar se valoró el contenido con la disolución de KOH 0.1 N hasta el viraje, indicado por aparición del color rosa que débil (que debe persistir al menos durante 10 s)

El resultado se expresó como porcentaje de ácido oleico.

#### **3.1.2. Determinación del índice de peróxidos.**

### **Fundamento**

El aceite se disuelve en cloroformo y la adición de ácido glacial proporciona la acidez necesaria para la reacción base. Los peróxidos son productos de la oxidación de grasa. Se originan por oxidación de ácidos grasos con dobles enlaces, y su existencia en una muestra provoca la oxidación del complejo yodo-potásico (KI) en medio ácido acuerdo con la siguiente reacción (Fennema, 2000):



El  $I_2$  liberado es proporcional a los peróxidos existentes y se valora con  $S_2O_3^{2-}$ . El  $I_2$  forma con el almidón un complejo azul oscuro que desaparece al pasar éste a  $I^-$  indicando así el punto final de la valoración.

### Reactivos

Reactivos	Proveedor
Cloroformo	Panreac
Ácido acético glacial	Panreac
Yoduro potásico	Panreac
Tiosulfato sódico	Panreac
Almidón	Panreac

### Preparación de los reactivos

- Disolución de almidón al 1 %; se mezclaron 5 g de almidón soluble con 0,01 g de  $HgI_2$  (como estabilizante) y se disolvieron con 30 ml de agua destilada. Esta solución se agregó a 500 ml de agua destilada hirviendo, manteniendo la ebullición durante 3 min. la solución preparada de esta manera se conserva durante largo tiempo.
- Solución saturada de yoduro potásico; se disolvió una cantidad de 10 g de KI en agua destilada recién hervida y se aforó a 100 ml.

- Disolución de tiosulfato sódico 0,01 N; se pesó la cantidad calculada de tiosulfato sódico ( $S_2O_3Na_2 \cdot 5H_2O$ ) y se disolvió en agua destilada completando hasta 1 litro en un matraz aforado.

### **Procedimiento**

En un Erlenmeyer, previamente tarado se pesaron 5 gramos de aceite con precisión al cg, se agregan 30 ml de una mezcla de 3 volúmenes de ácido acético (corrosivo, debe manejar con cuidado) y un volumen de cloroformo (inflamable, debe manejar con cuidado) (22.5 ml de ácido acético y 7.5 ml de cloroformo), se agito suavemente hasta total disolución de la muestra, después se adiciono 1 ml de la solución saturada de yoduro potásico. Se cierre el matraz, y se mantiene en agitación durante un minuto, imprimiéndole un suave movimiento de rotación, conservándolo después en la oscuridad durante 5 minutos. Al cabo de este tiempo se agregaron 75 ml de agua destellada y 1 ml de solución de almidón al 1%, se agito vigorosamente, y se valora el yodo liberado con disolución de tiosulfato de 0.01 N, hasta desaparición del color del complejo yodo-almidón. Paralelamente se efectuó una prueba en blanco.

El índice de peróxidos se expresó en miliequivalentes (meq) de oxígeno activo por Kg de aceite.

#### **3.1.3. Determinación de la absorbancia en el Ultravioleta (K232 y K270).**

### **Fundamento**

La determinación espectrofotométrica en la zona ultravioleta informa sobre la calidad de una materia grasa; su estado de conservación y las modificaciones inducidas durante los procesos de su producción.

Los ácidos grasos poliinsaturados son muy sensibles a la oxidación, induciendo este efecto a otros ácidos grasos. Aparecen primero los hidroperóxidos, menos estables, que absorben a una longitud de onda cerca de 232 nm y después a un estado avanzado de oxidación aparecen las cetonas y diacetonas con una absorbancia cerca de 270 nm. Los nuevos sistemas de dobles enlaces; los dienos absorben, aproximadamente, a 232 nm y los trienos absorben a 270 nm. Ambos parámetros informaron del estado oxidativo; K232 de oxidación primaria y K270 de oxidación secundaria.

### **Procedimiento**

En un matraz aforado de 10 ml y tarado se pesaron 40 mg de aceite, se disolvió la muestra en ciclohexano UV-IR y se llenó hasta el enrase.

Se llenó una cubeta de vidrio (Quartz) de 1 cm, de la solución obtenida y se midió la extinción a 270 nm y a 232 nm usando el ciclohexano UV-IR como referencia. Cuando la lectura de la absorbancia en 270 nm y 232 nm no ha sido comprendida entre los valores 0,1 y 0,8, se repitió la medida como se realizó diluciones. Las extinciones específicas o coeficientes de extinción a las diversas longitudes de onda se calcularon según la siguiente expresión:

$$E_{1cm}^{\lambda} \% \lambda = \frac{A_{\lambda}}{c e}$$

En donde:

$E_{1cm}^{\lambda} \% \lambda$ :	Extinción específica a la longitud de onda
$A_{\lambda}$ :	Absorbancia leída en el espectrofotómetro.
$c$ :	Concentración de la disolución en g/ 100 ml
$e$ :	Espesor de la cubeta (cm).

### **Análisis estadísticos**

Los resultados obtenidos han sido expresados como medias y desviaciones estándares. Para determinar la influencia de tiempo de almacenamiento, de tipo de almazara y de envase, se han usado los análisis, one-way ANOVA, el test Kruskal–Wallis y el procedimiento de Fisher; Least Significant Difference (LSD), para discriminar entre las medias de variables cuando ha sido necesario. Los test Kolmogorov–Smirnov y Bartlett han sido usados para examinar la distribución normal de variables y la homogénea de varianzas. También ha sido utilizado el test de Wilcoxon. Los análisis estadísticos han sido realizados usando SPSS 20.0 y Statgraphic Plus 4.1 software.

Diferencias de  $p < 0.05$  han sido consideradas significantes.



### **3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los parámetros de calidad: grado de acidez, índice de peróxidos y absorbancia en el Ultravioleta (K270 y K232) de las muestras de aceite de oliva de la variedad Picholine marroquí, procedentes de dos tipos de almazaras tradicionales: almazara de madera (Wood mill) y almazara de granito (granite mill), y envasados en botellas de plástico (PET) y de cristal (Glass) han sido indicados en la tabla III.11. .

#### **3.2.1. Grado de acidez.**

La cantidad de ácidos grasos libres resultantes de la degradación de triglicéridos se considera un índice muy importante para la valoración de un aceite de oliva y su clasificación comercial (Reglamento (UE) N° 61/2011 de la Comisión, 2011).

La acidez o el grado de acidez de los aceites estudiados, expresado en porcentaje de ácido oleico, a los 3 meses de almacenamiento del aceite (Tabla III.11 y Figura III.10) presenta sus valores más bajo de  $0,61 \pm 0,11$  % a  $0,90 \pm 0,26$  % en los aceites del grupo A (aceites obtenidos de aceitunas almacenadas durante 7 días), seguidos de los valores del grupo B (aceites obtenidos de aceitunas almacenadas durante 15 días) de  $1,36 \pm 0,39$  % a  $1,80 \pm 0,65$  % y los valores más altos de  $2,75 \pm 0,89$  % a  $4,26 \pm 0,84$  % han sido indicados en los aceites del grupo C (aceites obtenidos de aceitunas almacenadas durante 30 días). La diferencia ha sido significativa entre los dos grupos A y C ( $p < 0.05$ ). Estos valores son superiores a los encontrados por Essiari et al. (2014) y Haddam et al. (2014) en aceite de oliva de la misma variedad Picholine marroquí, producidos por sistema continuo.

Molino/ Envase	Grupos de muestras	Acidez( % ácido oleico) <sup>a</sup>		Índice de peróxidos (meq O <sub>2</sub> / Kg) <sup>a</sup>	
		3 meses	6 meses	3 meses	6 meses
Granito/ PET (n=78)	A	0,64 ± 0,21 c A*	0,77 ± 0,24 b D*	3,35 ± 1,04 a A	7,56 ± 3,34 c C
	B	1,36 ± 0,39 c B	1,51 ± 0,40 b E*	3,71 ± 1,78 a A*	8,43 ± 3,09 c D
	C	4,19 ± 3,88 a C	4,70 ± 4,07 d F*	7,26 ± 5,27 b B	13,79 ± 8,26 d E
Granito/ Vidrio (n=60)	A	0,61 ± 0,11 a A	0,77 ± 0,11 d D	3,34 ± 1,05 a A	7,14 ± 2,62 c C
	B	1,33 ± 0,22 b B	1,68 ± 0,39 e E	3,61 ± 0,83 a A	8,23 ± 1,85 d D
	C	4,15 ± 0,83 c C*	4,88 ± 0,80 f F*	7,17 ± 2,80 b B*	13,32 ± 4,99 e F*
Madera/ PET (n=36)	A	0,90 ± 0,26 a A*	1,60 ± 0,92 d A*	3,49 ± 0,73 a A	7,04 ± 1,56 c A
	B	1,80 ± 0,65 b C	3,73 ± 1,02 e C*	5,37 ± 1,30 b B*	9,76 ± 2,45 d B
	C	4,26 ± 0,84 c D	5,61 ± 1,35 f E*	6,72 ± 1,58 c D	13,70 ± 3,13 e D
Madera/ Vidrio (n=36)	A	0,62 ± 0,20 a B	0,95 ± 0,37 d B	3,17 ± 1,32 a A	5,96 ± 2,68 d A
	B	1,44 ± 0,41 b C	2,09 ± 0,76 e D	3,87 ± 1,18 b C	7,14 ± 2,14 e B
	C	2,75 ± 0,89 c E*	3,47 ± 0,75 f F*	4,34 ± 1,19 c E*	9,27 ± 2,36 f E*

**Tabla III.11.** Evolución de acidez y índice de peróxidos de aceites de oliva obtenidos en molinos de aceite tradicional marroquí, durante 3 y 6 meses de almacenamiento.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

<sup>a</sup> Promedio ± SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de parámetro, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

Los ácidos grasos libres son resultados de la degradación o hidrólisis de los triglicéridos, bajo la acción de enzimas naturales o lipasas, que actúan en una interfase donde hay presencia de agua o de sustratos emulsionados (Villeneuve et al., 2000). Es un fenómeno conocido como la activación

interfacial (Schmidt et al., 1998). Sin embargo, bajo ciertas condiciones, las lipasas también han sido capaces de catalizar reacciones de síntesis (Carvalho et al., 2006) en medios no acuosos (Costas et al., 2004; Silva et al., 2005; Sun et al., 2009).

La hidrólisis de los triglicéridos del aceite de oliva puede comenzar cuando los frutos están todavía en el árbol, por lipasas endógenas propias del fruto (Kiritsakis and Markakis, 1978). Estas lipasas relacionadas con la degradación de los triglicéridos a nivel de las aceitunas se han mostrado presentes en diferentes estados de maduración (desde color verde hasta morado o negro), con un nivel bajo de actividad y que se reduce más con la maduración (Panzanaro et al., 2010).

Un aumento del grado de acidez indica una hidrólisis importante de los triglicéridos es decir una alta producción de lipasas o enzimas degradantes de los triglicéridos. Este tipo de enzimas está ampliamente extendido en la naturaleza, y se ha encontrado en animales, plantas y microorganismos (Wooley et al., 1994).

La degradación de los triglicéridos podría tener lugar desde las etapas de recolección y transporte, como encontraron Karabagias et al. (2013), donde aceitunas de la variedad Lianolia en la zona de Kerkyra en Grecia, por causa de la gran altura de los olivos se recolectaron en sacos de plástico y aunque han sido molturados entre los 24 y 48 horas en almazaras equipadas de sistema continuo, presentaron acidez de 4.71 % (Karabagias et al., 2013).

El almacenamiento de los frutos en medio ambiente puestas directamente en contacto con el suelo y metidas en gran cantidad (50 Kg) y en sacos de plástico podría aumentar la humedad y el calor que puede ser producido por la actividad enzimática catabólica del fruto (Ibar Albiñana, 2002), aumentar la alteración de los frutos y favorecer el medio para el desarrollo de diversos microorganismos producidos de lipasas.

En el mundo microbiano; las lipasas están ampliamente distribuidas en bacterias (Shafei y Abd-Elsalam, 2005; Zhen-Qian y Chun-Yun, 2009; Liu et al., 2011), mohos y levaduras (Belhaj-Ben Romdhane et al, 2010; Contesini et al., 2010; Yoshida, et al., 2011; Sathish Yadav et al, 2011; Valladão et al., 2011).

Todos estos tipos de microorganismos degradantes de los triglicéridos, desde, bacterias mesófilas hasta psicrotíficas, mohos y levaduras han sido encontrados por nosotros en todas las muestras de aceitunas estudiadas (Tabla III.9). Y además, las aceitunas que han sido almacenadas durante más tiempo, 30 días, han estado más en contacto con los indicados microorganismos y por lo tanto a partir de aquellos se obtuvieron los aceites del grupo C, con el nivel de ácidos grasos libres más alto. Cuando más se almacenan las aceitunas es cuando más se encuentran bajo las acciones de enzimas producidas por microorganismos.

En este tipo de almazaras las aceitunas se ponen a molturar sin lavado ni eliminación de los frutos alterados, lo que indica que la producción de lipasas podría seguir presente durante la molturación, que en este caso es un proceso muy lento y que puede durar hasta 12 horas o más, para poder llegar a terminar de extraer el aceite a partir de una cantidad de aceitunas de alrededor de 400 Kg. La pasta de aceitunas durante este proceso se encuentra, además, expuesta a todos posibles microorganismos procedentes del ambiente, del material usado o del personal.

Por otro lado, en las almazaras objeto de este estudio, el aceite de oliva se separa del agua de vegetación por una simple decantación. Este sistema de decantación dejar pasar parte de este agua y favorece la presencia de microorganismos productores de lipasas en el aceite (Ciafardini and Zullo, 2002). La presencia de agua en el aceite o emulsión de agua-aceite (Koidis et al., 2008), favorece el crecimiento de los microorganismos y la producción de lipasas (Yoshida et al., 2011).

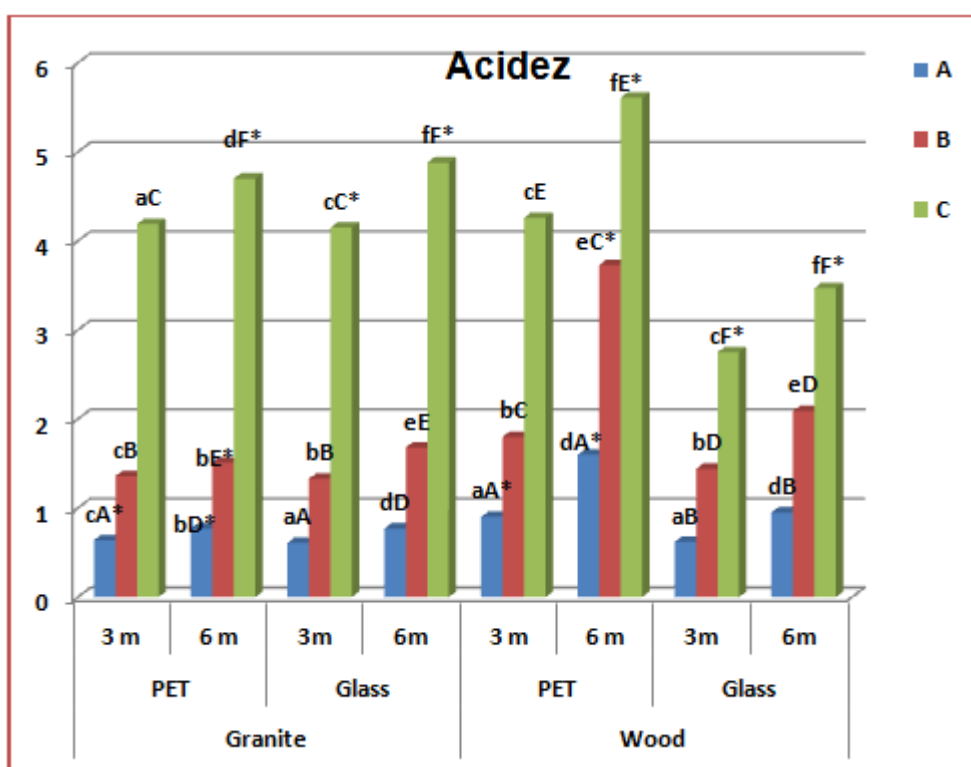
Efectivamente, todos tipos de microorganismos; bacterias mesófilas y psicrotroficas, mohos y levaduras que han sido encontrados en las aceitunas durante los diferentes periodos de su almacenamiento han sido indicados en sus correspondientes aceites a los tres meses de almacenamiento (Tabla III.8 y Tabla III.9).

A los 6 meses de almacenamiento (Tabla III.11 y Figura III.10) se noto un significativo aumento del grado de acidez en todos los grupos, los valores de acidez igual, han mostrado diferencias significativas entre los aceites del grupo A y C ( $p < 0.05$ ). De acuerdo con recientes estudios, el aumento de del grado de acidez acompaña el almacenamiento del aceite de oliva (Gómez-Alonso et al., 2007; Samaniego-Sánchez et al., 2012; Ben-Hassine et al., 2013).

Los valores del grado de acidez no presentaron diferencias significativas entre los aceites envasados en PET y en cristal para los grupos procedentes de almazara de granito. Mientras, que en la almazara de madera los aceites en cristal mostraron valores más reducidos que en los de PET, con una diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ). En este caso se puede decir que el envase en plástico ha sido muy favorable para la producción de enzimas degradantes de los triglicéridos de aceites producidos en almazara de madera.

Comparando entre los dos tipos de almazaras, los aceites procedentes de almazara de madera y envasados en PET mostraron un aumento significativo de acidez en las muestras de grupo A (a los 3 y a los 6 meses) y las de grupos B y C a los 6 meses. Mientras que, los aceites envasados en cristal mostraron un crecimiento importante de acidez en los aceites de grupo C procedentes de almazara de granito. Un aumento importante del grado de acidez informa sobre una actividad enzimática muy importante de los microorganismos producidos de lipasas degradantes de los triglicéridos. El nivel de liberación de los ácidos grasos o de la degradación de los triglicéridos depende de la presencia y del desarrollo de los microorganismos producidos de lipasas, y que deben estar relacionados en gran parte con los manejos y manipulaciones efectuados en cada tipo de almazara durante los procesos de extracción del aceite.

Tanto en los aceites procedentes de almazara de granito como en los aceites procedentes de almazara de madera, el grado de acidez para todos los aceites que proceden de aceitunas almacenadas durante 30 días (Grupo C) se ha encontrado por encima de los límites permitidos en la *Regulación de la Comisión (UE) Nº 61/2011*.



**Figure III.10.** Evolución del grado de acidez de aceites procedentes de una almazara de granito y de madera y envasados en PET y vidrio.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

<sup>a</sup> Promedio  $\pm$  SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de parámetro, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

### **3.2.2. Índice de peróxidos.**

El índice de peróxidos permite de evaluar el estado de una materia grasa e informa sobre su oxidación o rancidez, que representa el principal factor de degradación de los aceites comestibles, puede tener lugar durante su producción o su almacenamiento (Kiritsakis et al., 1998) y se considera como un parámetro principal que afecta a su calidad.

El índice de peróxidos expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de aceite, a los 3 meses de almacenamiento del aceite (Tabla III.11 y Figura III.11) presento valores más bajos de  $3,17 \pm 1,32$  a  $3,49 \pm 0,73$  meq  $O_2$ /kg en los aceites del grupo A (aceites obtenidos de aceitunas almacenadas durante 7 días), seguidos de los valores del grupo B (aceites obtenidos de aceitunas almacenadas durante 15 días) de  $3,61 \pm 0,83$  a  $5,37 \pm 1,30$  meq  $O_2$ /kg y los valores más altos de  $4,34 \pm 1,19$  a  $7,26 \pm 5,27$  meq  $O_2$ /kg han sido indicados en los aceites del grupo C ( aceites obtenidos de aceitunas almacenadas durante 30 días). La diferencia ha sido estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los dos grupos A y C. Estos valores son superiores a los encontrados en aceites de oliva de la misma variedad Picholine marroquí, producidos en almazaras con sistema continuo (Haddam et al, 2014).

La importante diferencia de índice de peróxidos entre los aceites de grupos A y C nos hace llegar a la conclusión que la oxidación ha tenido lugar, en gran parte durante almacenamiento de las aceitunas. Las aceitunas han sido almacenadas al aire libre y puestas en sacos de plástico, que normalmente, facilitan la transmisión de aire y luz, (principales factores de oxidación). Asimismo, el largo tiempo de molturación permitió que la pasta de las aceitunas entrara en contacto con la luz y oxígeno durante más tiempo. Todas estas condiciones seguidas durante el procesamiento de los aceites pueden ser las causantes de estos altos valores obtenidos en el Índice de peróxidos de las muestras analizadas.

La presencia de ácidos grasos libre también, ha tenido mucha influencia en la oxidación de los aceites, tal y como recogen Paradiso et al. (2010) y Waraho et al. (2011), que encontraron como concentraciones de 0.5 a 1% de ácido oleico provocaron la formación de concentraciones significativamente más alta de hidroperóxido. López-López et al. (2009) pusieron de manifiesto cómo, en todo momento de producción del aceite, el ácido graso necesario para activar el fenómeno de oxidación podría estar fácilmente disponible, a causa de la hidrólisis del triacilglicerol producido por enzimas lipolíticas, de los frutos o de la microflora ambiental. En el caso de nuestro estudio, los microorganismos producidos de lipasas, están presentes tanto en las aceitunas como en el aceite (Tabla III.8 y Tabla III.9).

A los 6 meses de almacenamiento (Tabla III.11 y Figura III.11) se noto un significativo aumento del índice de peróxidos en todos los grupos. Los valores de los aceites del grupo C igual han mostrado diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) con los valores de los aceites del grupo A. Resultados similares a recientes estudios que mostraron que el índice de peróxidos aumenta con el tiempo de almacenamiento del aceite de oliva (Dabbou et al., 2011; Rababah et al., 2011; Samaniego-Sánchez et al., 2012; Ben-Hassine et al., 2013).

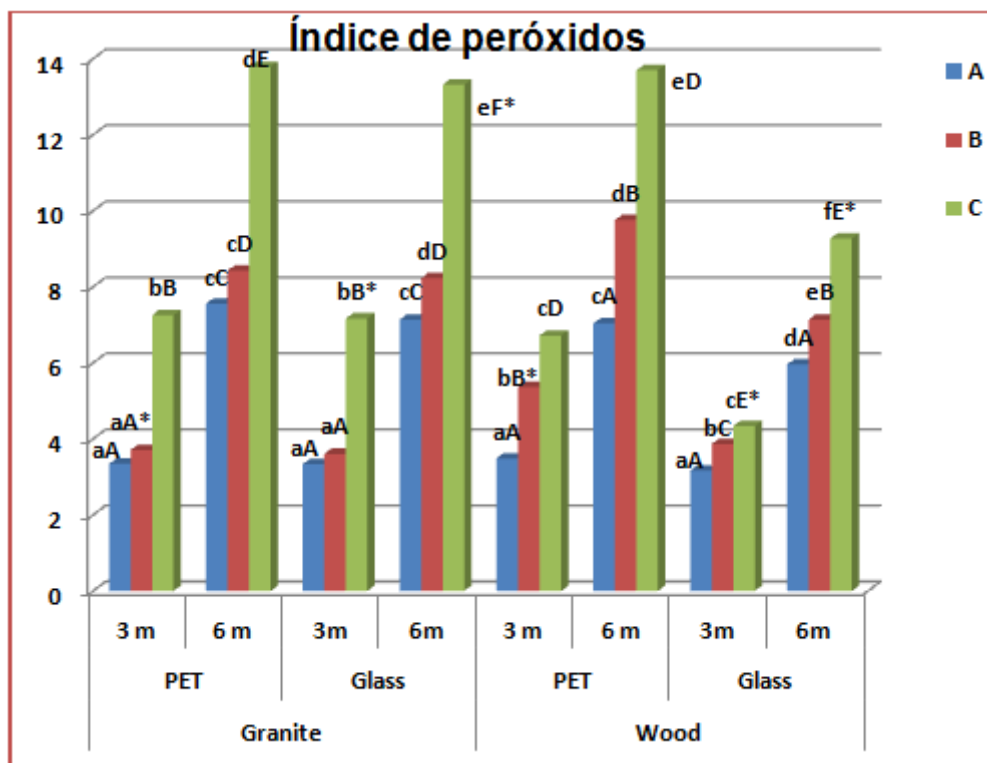
Los valores del índice de peroxidos se encontraron más reducidos en los aceites envasados en cristal que en los envasados en PET, con una diferencia significativa a los 3 meses entre los aceites de los grupos B y C obtenidos en almazara de madera, y a los 6 meses la diferencia se mostró muy importante entre los aceites de los grupos C procedentes de ambas almazaras. Los aceites envasados en cristal se han encontrado más protegidos de oxidación que los en PET, resultados concordantes con los encontrados en estudios anteriores (Samaniego-Sánchez et al., 2012).

Comparando entre los dos tipos de almazaras, los aceites del grupo B contenidos en PET y procedentes de almazara de madera presentaron valores de índice de peróxidos a los 3 meses más altos que los del mismo grupo en el mismo envase y obtenidos en almazara de granito. Mientras que los aceites del



grupo C en cristal y procedentes de almazara de granito mostraron valores de índice de peróxidos más importantes que los aceites del mismo envase y producidos en almazara de madera.

La diferencia en el nivel de índice de peróxidos entre los dos tipos de almazaras pudiera estar relacionado sobre todo con tiempo de molturación, durante el cual la pasta de las aceitunas se encontraba expuesta al oxígeno y a la luz, dos principales factores que juegan a favor de la oxidación.



**Figura III.11.** Evolución del Índice de peróxidos de aceites procedentes de una almazara de granito y de madera y envasados en PET y vidrio.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

<sup>a</sup> Promedio  $\pm$  SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de parámetro, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

### 3.2.3. Absorbancia en el Ultravioleta.

La absorbancia en el ultravioleta permite evaluar el estado de conservación del aceite, informando de la presencia o la ausencia de productos de oxidación secundaria en el mismo producto. Los hidroperóxidos de los

primeros estadios de la oxidación absorben a 232 nm, mientras que los productos de la oxidación secundaria absorben a 270 nm. Se determina la absorbancia a 232 nm y corresponde al coeficiente de absorbancia K232 y a 270 nm y corresponde al coeficiente K270.

### **-K232**

Los valores de coeficiente de absorbancia K232 determinados en las muestras de aceite almacenadas a los 3 y 6 meses se encuentran recogidas en la Tabla III.12 y en la Figura III.12.

En todas las muestras analizadas, el K232 aumenta a medida que aumenta el tiempo de almacenamiento del aceite, tanto en los obtenidos en almazaras de granito como en los obtenidos en las almazaras de madera. Los menores valores se presentaron en las muestras del grupo A (aceites procedentes de aceitunas almacenadas durante 7 días antes de su molturación) a los 3 y a los 6 meses de almacenamiento tanto en PET como en vidrio. Por el contrario, los mayores valores se han encontrado para las muestras del grupo C (aceites procedentes de aceitunas con un almacenamiento de 30 días), existiendo diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) entre ambos grupos.

Molino/ Envase	Grupos de muestras	K232 <sup>a</sup>		K270 <sup>a</sup>	
		3 meses	6 meses	3 meses	6 meses
Granito/ PET (n=78)	A	1,95 ± 0,35 bA	2,47 ± 0,55 dA	0,11 ± 0,03 aA*	0,21 ± 0,05 cD
	B	2,13 ± 0,16 bC*	2,52 ± 0,39 dB*	0,13 ± 0,04 aB*	0,22 ± 0,06 cD*
	C	2,60 ± 1,02 aD*	3,33 ± 1,68 cD*	0,21 ± 0,12 bC*	0,32 ± 0,12 dF*
Granito/ Vidrio (n=60)	A	1,66 ± 0,43 aB	2,46 ± 0,32 dA	0,11 ± 0,04 aA	0,20 ± 0,04 cE
	B	2,02 ± 0,52 bC	2,86 ± 0,44 eC	0,13 ± 0,02 aB*	0,21 ± 0,02 cE*
	C	2,49 ± 0,66 cE	3,21 ± 0,70 fE	0,21 ± 0,01 bC	0,31 ± 0,06 dG
Madera/ PET (n=36)	A	1,87 ± 0,03 aA	2,66 ± 0,23 dA	0,18 ± 0,03 aA*	0,23 ± 0,03 dA
	B	2,69 ± 0,38 bC*	3,76 ± 0,47 eC*	0,24 ± 0,02 bC*	0,31 ± 0,05 eC*
	C	4,23 ± 0,80 cE*	5,53 ± 1,01 fE*	0,35 ± 0,06 cE*	0,47 ± 0,07 fE*
Madera/ Vidrio (n=36)	A	1,50 ± 0,22 aB	1,90 ± 0,27 dB	0,13 ± 0,05 aB	0,17 ± 0,04 cB
	B	2,18 ± 0,14 bD	2,69 ± 0,24 eD	0,19 ± 0,03 bD*	0,24 ± 0,03 dD*
	C	2,88 ± 0,54 cF	3,58 ± 0,53 fF	0,20 ± 0,05 bF	0,31 ± 0,08 eF

**Tabla III.12.** Evolución de la absorbancia en el Ultravioleta para aceites procedentes de almazara de granito y de madera y envasados en PET y vidrio.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

<sup>a</sup> Promedio ± SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de parámetro, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

La absorbancia en 232 nm indica un inicial estado de oxidación y formación de conjugaciones dienos. En relación con fenómeno oxidativo y con el fin de evaluar la actividad de pro-oxidante de los triglicéridos en ausencia de cualquier posible interferencia, Gomes et al. (2008, 2011) emplearon un aceite

purificado; libre de compuestos antioxidantes y pro-oxidante. Los resultados de aquellos trabajos mostraron la presencia de una acción pro-oxidante tanto en el aceite de oliva purificado como en su correspondiente aceite sin purificación, es decir que el tiempo de inducción de oxidación disminuyó con el aumento de las concentraciones de triglicéridos oxidados. Bilancia et al. (2007) mostraron que las cantidades de triglicéridos oxidados, detectados en el aceite de oliva virgen durante el almacenamiento fueron significativos y inversamente proporcionales a los tiempos de inducción de la oxidación.

La separación del aceite por una simple decantación y la falta de filtración han dejado de pasar el agua de vegetación con el aceite. En la superficie de las interfaces de agua-aceite se mostro la capacidad de concentración de la molécula de los ácidos grasos (Choe, 2008), gracias a la combinación de grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, ya que la misma molécula de estos componentes contiene una cola de hidrocarburo hidrofóbica y una cabeza de ácido carboxílico hidrofílica. La concentración de los ácidos grasos en la superficie de las gotas de emulsiones, atraen los metales de transición prooxidantes que promueven la oxidación (Waraho et al., 2009). Trabajos realizados por Waraho et al. (2011), mostraron que, en emulsiones de agua-aceite, la autooxidación de los ácidos grasos provocó la formación de concentraciones significativamente altas de hidroperóxido.

De acuerdo con recientes estudios los valores de K232 aumentan con el tiempo de almacenamiento del aceite de oliva (Dabbou et al., 2011; Rababah et al., 2011; Samaniego-Sánchez et al., 2012; Ben-Hassine et al., 2013; Mancebo-Campos et al., 2014).

Los valores de K232 han sido más reducidos en los aceites en botellas de cristal que en los en botellas PET. El envasado de aceite en plástico acelera entonces la auto-oxidación del aceite.

Comparando entre los dos tipos de almazaras, los grupos B y C envasados en PET y procedentes de almazara de madera presentaron niveles de K232 superiores a los aceites de los mismos grupos en el mismo envase y obtenidos en almazara de granito.

Esta diferencia en K232 entre las dos almazaras podría ser resultante de las reacciones de auto-oxidación que han tenido de las aceitunas y de su pasta durante la extracción del aceite, causados por las manipulaciones practicadas en cada almazara.

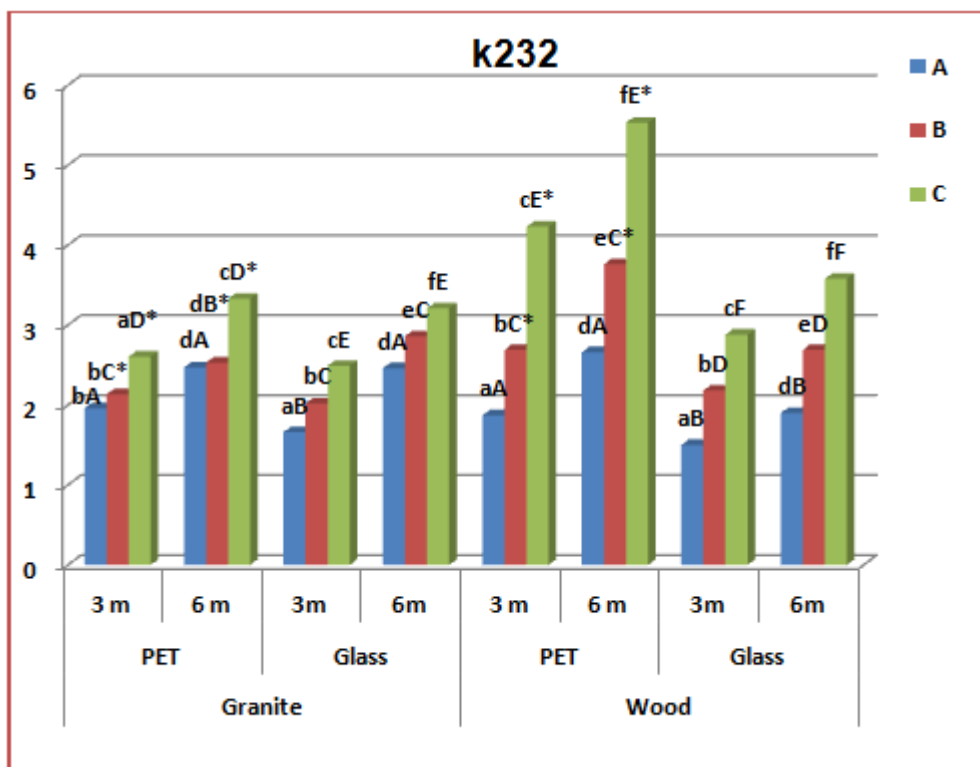


Figure III.12. Evolución del K232 en aceites procedentes de una almazara de granito y de madera y envasados en PET y vidrio.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

<sup>a</sup> Promedio  $\pm$  SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de parámetro, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

### **-K270**

Los valores de coeficiente de absorbancia, K270 encontrados en las muestras de aceite, a los 3 y 6 meses de almacenamiento, están recogidos en la Tabla III.12 y en la Figura III.13.

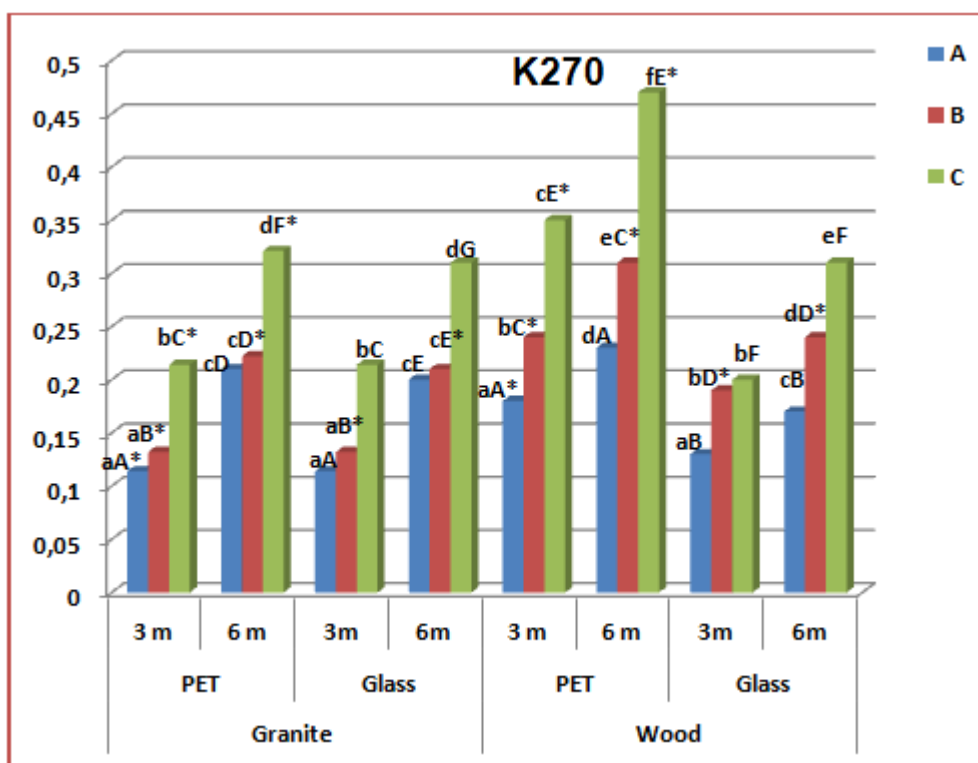
Para el K270 se sigue la misma dinámica que para el K232; se ha indicado un aumento del valor de K270 con el aumento del tiempo de almacenamiento de las aceitunas como de sus aceites, con diferencia significativas, ( $p < 0.05$ ) entre los grupos A y C. Todo manejo incontrolado practicado durante la producción del aceite como es el almacenamiento de las aceitunas al aire libre, el largo tiempo de molturación y la separación del aceite por una simple decantación puede conducir al aumento de oxidación, de auto-oxidación del aceite y a la formación de productos de la oxidación secundaria, que absorban a 270 nm como las cetonas insaturadas y dicetonas (Ollé, 2002; Jeantet et al., 2006). Y de ahí, la propagación de la oxidación lipídica que empieza con la reacción inmediatamente del radical formado con otro lípido que se encuentra cerca de él, incrementando los mecanismos de oxidación que provocan la rancidez del aceite (Vacca et al., 2006).

En nuestro caso, el largo tiempo de exposición de las aceitunas antes de su molturación así como la falta de un control higiénico y de las condiciones ambientales durante su almacenamiento, estarían contribuyendo a la aparición de compuestos de oxidación incluso antes del proceso de obtención de los aceites.

Los valores de K270 han sido más reducidos en los aceites envasados en cristal que en los aceites envasados en PET con una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los aceites obtenidos en almazara de madera. El envasado en plástico, entonces, ha ayudado más a la auto-oxidación de aceites producidos en almazara de madera.

Comparando entre los dos tipos de almazaras, los aceites procedentes de almazara de madera y envasados en PET mostraron un aumento significativo

de K270 en todos los grupos a los 3 meses y en los grupos B y C a los 6 meses. Mientras que, los aceites envasados en cristal y obtenidos en la misma almazara mostraron un aumento importante de K270 en los aceites de grupo B. Estos cambios de K270 entre las dos almazaras deben estar relacionados en gran parte con los manejos y manipulaciones efectuados en cada tipo de almazara durante los procesos de extracción del aceite.



**Figure III.13.** Evolución del K270 en aceites procedentes de una almazara de granito y de madera y envasados en PET y vidrio.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

<sup>a</sup> Promedio  $\pm$  SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de parámetro, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.



## **4. DETERMINACIÓN DEL PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS DE ACEITE DE OLIVA PRODUCIDO EN ALMAZARAS TRADICIONALES EN MARRUECOS.**

### **4.1. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### ***Perfil de ácidos grasos estudiados***

El perfil de los ácidos grasos se llevó a cabo por determinación del porcentaje de los correspondientes esteres metílicos, mediante cromatografía de gases, según los métodos establecidos por la Comunidad Europea, Regulación de la Comisión (CEE) N° 2568/91 y subsecuente Comunidad Europea, Regulación de la Comisión (UE) N° 61/2011 de 24 de enero de 2011. Se trata de transformar los ácidos grasos del aceite en estrés metílicos, componentes volátiles, que al pasar a través de una columna de cromatografía de gases se separan en función de sus números de carbono según el tiempo de retención. Los esteres metílicos con menos átomos de carbono son los primeros que aparecen registrados.

#### **APARATOS Y MATERIALES DE LABORATORIO**

- Balanza de precisión
- vasos de precipitado de 2 litros
- Matraces aforados de 1 litro
- Matraz de fondo plano de 50 ml cuello largo y boca esmerilada
- Refrigerante
- Pipetas graduadas de 5 y de 6 ml
- Embudo
- Pipeta aforada de 5 ml
- Mechero, trípode y rejilla
- Instalaciones de nitrógeno, hidrógeno y aire.
- Ordenador equipado con un registrador Star 800.
- Microjeringa de 10 µl, Hamilton
- Cromatógrafo de gases Perkin-Elmer Autosystem.

## Reactivos

Reactivos	Proveedor
Metilato sódico	Panreac
Metanol absoluto	Panreac
Ácido sulfúrico	Panreac
Hexano	Panreac
Cloruro de sodio	Panreac
Patrones de ácidos grasos	Sigma

### Preparación de los esteres metílicos de los ácidos grasos. Ver Figura III.4.

En matraz de 50 ml, a fondo plano, cuello largo y boca esmerilada, y previamente tarado, se pesaron 0.3 g de aceite. Se añadieron a continuación 6 ml de metilato sódico (0.2 N) (el metilato sodico se prepara con mucho cuidado al ser muy inflamable en presencia de agua. Su dilución en metanol se realiza dentro de una campana). Se metieron 3 o 4 perlas para regular la ebullición y se colocó el matraz al refrigerante, se hiervó hasta obtención de una sola fase, como mínimo 5 minutos. Se interrumpió la calefacción y se agregaron al matraz 6 ml de ácido sulfúrico en metanol (4%). (Esta etapa se realiza con mucho atención por la facilidad de inflamación del ácido sulfúrico), se devolvió a calentar, manteniendo en ebullición durante 5 minutos. Se enfrió y a continuación se agregaron 5 ml de hexano y después, se adicionó disolución acuosa saturada de NaCl en cantidad suficiente para situar la capa de hexano en el cuello del matraz. (Esta metilación en caliente debe realizar en campana extractora y con mucho cuidado; (Esta metilación en caliente debe realizar en campana extractora y con mucho cuidado; el montaje del experimento debe estar bien aislado de todo tipo de reactivo y material: pipetas, matraz, papel,... contaminado con reactivos y particularmente los mismos reactivos usados durante esta misma etapa).



**Figura III.14.** Montaje para metilación de ácidos grasos

Se dejó reposar el contenido del matraz hasta que se mostró bien separada la disolución en dos fases (5 a 7 min al menos). La fase situada en el alto del matraz (en el cuello) corresponde a la disoluciones que contienen los esteres metílicos, se ha puesto en viales de vidrio, que se guardaron en congelador de bajo de 20°C, esperando su inyección en cromatografía.

### **Condiciones cromatográficas**

El programa de temperaturas empleado para la separación de los ésteres metílicos fue el siguiente: 60 °C (T1) durante 3 minutos, rampa de 5 °C/min, 170 °C (T2) durante 9 minutos, rampa de 10 °C/min y 230 °C (T3) durante 5 minutos. Temperatura del inyector: 230 °C y temperatura del detector: 250 °C.

- Gas portador: hidrógeno.
- Presión del flujo: 25 ml/min.
- Cantidad inyectada: 1µl de muestra con esteres metílicos en la cabeza de columna cromatográfica.
- Columna cromatográfica. SP-2560 (100 m x 0,25 µm film x 0,20 d.i.; SUPELCO, USA).
- Detector de ionización de llama (FID).

**Identificación y evaluación de los ácidos grasos.**

La identificación de cada uno de los picos correspondientes a los ácidos grasos se efectuó en función de tiempo de retención, que es único para cada compuesto, dadas unas determinadas condiciones; mismo gas portador, rampa de temperatura y flujo. Y como patrón de referencia, han sido usados esteres metílicos de pureza cromatográfica, analizados en las mismas condiciones, y en las cuales los tiempos de retención han sido ulteriormente determinados.

El perfil de los ácidos grasos ha sido expresado como el porcentaje de los principales esteres metílicos (Dabbou et al., 2010), relativo al área total de los ácidos grasos presentes en una muestras analizada de aceite de oliva

$$p_i = \frac{A_i}{\Sigma A} \times 100$$

En donde:

- $p_i$ : Porcentaje de ácidos graso i.
- $A_i$ : área del pico correspondiente al ácido graso i.
- $\Sigma A$ : suma de las áreas de todos los picos.

## **4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

Los principales ácidos grasos insaturados identificados vienen recogidos en la Tabla III.13 y en la III.14 se recoge las diferentes relaciones existentes entre ellos. En cuanto a los ácidos grasos saturados analizados, aparecen recogidos en la Tabla III.15. Estos ácidos grasos han sido determinados en las muestras de aceite de oliva de la variedad Picholine marroquí, procedentes de dos tipos de almazaras tradicionales: almazara de madera y almazara de granito y envasados en botellas de plástico (PET) y de vidrio.

### **4.2.1 Ácidos grasos insaturados**

El ácido oleico es el ácido graso insaturado más predominante del aceite de oliva, y gracias a su cantidad le confiere su originalidad y sus propiedades saludables. A los 3 meses de almacenamiento del aceite (Tabla III.13 y Figura III.14), el ácido oleico presentó valores más altos en los aceites del grupo A (aceites obtenidos de aceitunas que han sido almacenadas durante 7 días), de  $73,14 \pm 1,3$  a  $76,02 \pm 1,3$  %, seguidos de los aceites del grupo B (aceites obtenidos de aceitunas que han sido almacenadas durante 15 días), de  $71,87 \pm 2,11$  a  $73,64 \pm 2,23$  % y los del grupo C (aceites obtenidos de aceitunas que han sido almacenadas durante 30 días), de  $70,75 \pm 1,46$  a  $71,36 \pm 2,48$  %. La diferencia entre los grupos A y C ha sido significativa ( $p < 0.05$ ). Aceites de la Picholine marroquí producidos por sistema continuo, mostraron cantidades más altas de ácido oleico, de 76,71 a 76,80 % (Essiari et al., 2014).

Molino/ Envase	Grupo de muestra	Palmitoleico <sup>a</sup>		Margaroleico <sup>a</sup>		Oleico <sup>a</sup>	
		3 meses	6 meses	3 meses	6 meses	3 meses	6 meses
Granito/ PET (n=78)	A	0,66±0,18 a A	0,65±0,19 a A	0,12±0,08 a A	0,11±0,07 a A	74,38±1,65 a A	72,31±1,72 d A
	B	0,65±0,11 a b C	0,64±0,11 a b C	0,07±0,15 a b B	0,06±0,14 a b B	72,69±2,24 b C*	71,05±2,39 e C
	C	0,57±0,12 c b E	0,54±0,12 c E	0,05±0,05 c b D	0,04±0,05 c b D	70,75±1,46 c E*	69,27±1,47 f E*
Granito /Vidrio (n=60)	A	0,56±0,06 a B*	0,55±0,06 a B*	0,10±0,12 a A	0,09±0,11 a A	76,02±1,31 a B*	74,03±1,36 d B
	B	0,54±0,14 a D	0,52±0,13 a D*	0,07±0,05 a C	0,06±0,05 a C	73,64±2,23 b D*	71,41±2,25 e D*
	C	0,46±0,10 b F	0,45±0,10 b F	0,07±0,04 a E	0,06±0,04 a E*	71,36±2,48 c F*	70,75±2,81 e F*
Madera/ PET (n=36)	A	0,65±0,15 a A	0,63±0,17 a A	0,08±0,07 a A	0,08±0,07 a A	73,14±1,32 a A	71,72±1,32 d A
	B	0,57±0,11 a B	0,55±0,12 a B	0,07±0,07 a c B	0,05±0,06 a d B	71,87±2,11 b C*	69,87±2,17 e C
	C	0,54±0,12 a C	0,51±0,12 a C	0,03±0,03 b c C	0,02±0,03 b d C	70,17±1,98 c E*	68,15±1,87 f E*
Madera/ Vidrio (n=36)	A	0,66±0,17 a A*	0,65±0,17 a A*	0,12±0,07 a A	0,12±0,07 a A	75,28±2,04 a B*	73,75±2,04 d B
	B	0,66±0,16 a B	0,64±0,19 a B*	0,10±0,19 a b	0,09±0,18 a b	73,20±2,28 b D*	71,89±2,36 e D
	C	0,55±0,12 a C	0,54±0,14 a C	0,05±0,05 b C	0,05±0,04 b C*	71,01±1,50 c F*	68,18±1,40 f F*

**Tabla III.13.** Evolución del perfil de ácidos grasos insaturados de aceite de oliva obtenido en molino de aceite tradicional marroquí durante tiempo de almacenamiento (3 y 6) meses.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

<sup>a</sup> Promedio ± SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de de ácido graso, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

Molino/ Envase	Grupo de muestra	Linoleico <sup>a</sup>		Linolénico <sup>a</sup>		Gadoleico <sup>a</sup>	
		3 meses	6 meses	3 meses	6 meses	3 meses	6 meses
Granite/ PET (n=78)	A	11,51±0,80 a A	11,21±0,77 a A	0,78±0,21 a A	0,77±0,21 a A	0,31±0,05 a A	0,30±0,07 a A
	B	11,32±1,45 a B	11,08±1,33 a B	0,69±0,29 a C	0,68±0,28 a C	0,28±0,14 a B	0,26±0,13 a B
	C	11,08±1,10 a D	11,02±1,15 a C	0,72±0,22 a E	0,71±0,22 a E	0,27±0,07 a C	0,26±0,07 a C
Granite/ Vidrio (n=60)	A	11,22±1,14 a A	11,14±1,22 a A	0,66±0,20 a B	0,64±0,20 a B	0,30±0,10 a A	0,29±0,10 a A
	B	11,11±1,61 a c C	10,93±1,50 a B	0,64±0,22 a D	0,62±0,21 a D	0,29±0,07 a B	0,28±0,07 a B
	C	10,97±1,40 b c E	10,69±1,61 a b C	0,59±0,22 a E	0,58±0,22 a E	0,30±0,07 a C	0,29±0,06 a C
Wood/ PET (n=36)	A	11,19±1,44 a A	11,06±1,04 a A	0,70±0,30 a A	0,68±0,30 a A	0,32±0,08 a A	0,31±0,07 a A
	B	11,07±1,88 a B	10,84±1,86 a B	0,64±0,32 a B	0,62±0,31 a B	0,31±0,08 a b B	0,30±0,08 a B
	C	10,96±1,30 a C	10,77±1,14 a C	0,53±0,29 a C	0,52±0,29 a C	0,27±0,08 b c C	0,26±0,08 a c C
Wood/ Vidrio (n=36)	A	11,12±1,73 a A	11,02±1,67 a A	0,76±0,28 a A	0,73±0,26 a A	0,31±0,08 a A	0,30±0,08 a A
	B	11,03±1,40 a B	10,97±1,54 a B	0,73±0,26 a B	0,72±0,26 a B	0,29±0,09 a b B	0,28±0,09 a B
	C	10,78±1,40 a C	10,63±1,34 a C	0,64±0,27 a C	0,63±0,27 a C	0,22±0,15 b C	0,21±0,15 a b C

**Tabla III.13.** (Continuación).Evolución del perfil de ácidos grasos insaturados de aceite de oliva obtenido en molino de aceite tradicional marroquí durante tiempo de almacenamiento (3 y 6) meses.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

<sup>a</sup> Promedio ± SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de de ácido graso, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

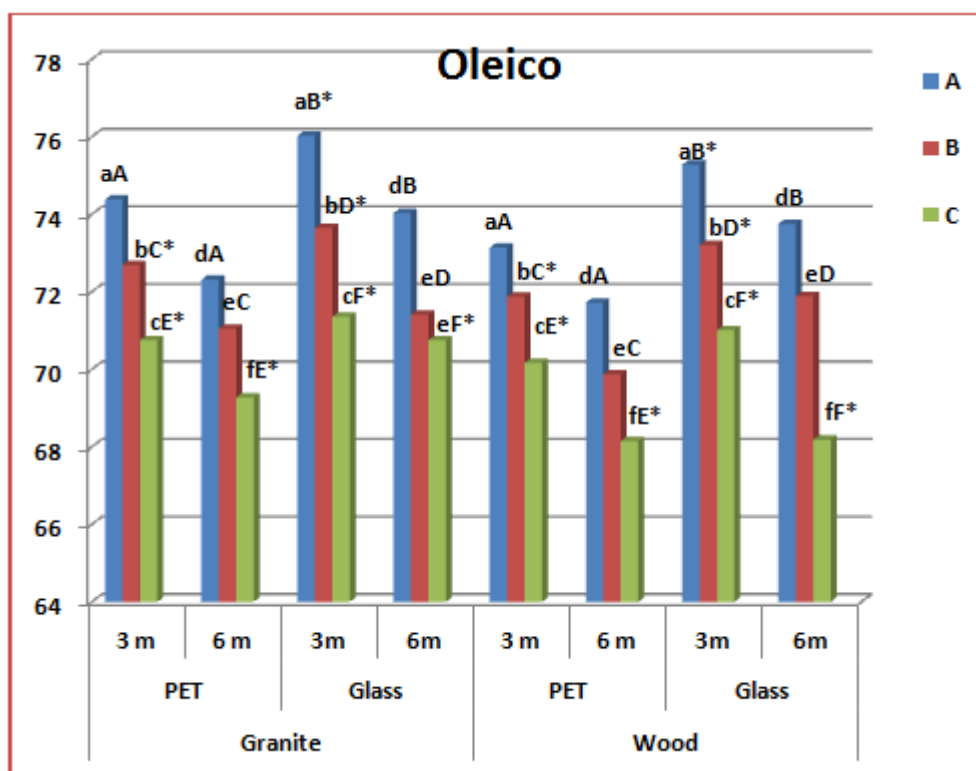
Esta reducción del porcentaje de ácido oleico puede tener origen enzimático, efecto que, lipasas han sido indicadas en la degradación de ácidos grasos (Belhaj-Ben et al., 2010; Contesini et al., 2010; Yoshida et al., 2011; Sathish Yadav et al., 2011), de cadena larga (Lalman and Bagley, 2001; Pereira et al., 2002, 2004; Becker, 2010; Valladão et al., 2011; Gonçalves et al., 2012). Así, también, actividad de lipasas muy importante, ha sido mostrada su producción

por microorganismos aislados de aceitunas y de aceite de oliva (Marquina et al., 1992; Ciafardini et al., 2006a, b; Psani and Kotzekidou, 2006; Hernández et al., 2007; Zullo and Ciafardini, 2008). De mismo, otros estudios han mostrado la degradación de ácido oleico por bacterias (Svetlitsnyi et al., 1996; Pereira et al., 2002; Zhang et al., 2004; Shigematsu et al., 2006), mohos (Valladão et al., 2011) y levaduras (Wang et al., 2011). En experimentos de cultivación de bacterias, se usó el aceite de oliva como la única fuente de carbono y energía, el crecimiento de bacterias se acompañó de una acumulación especialmente de ácido oleico (Becker, 2010).

En nuestro estudio, microorganismos; bacterias, mohos y levaduras han mostrado su presencia en las aceitunas como en sus correspondientes aceites (Tabla III.8 y tabla III.9). El grupo con más tiempo de almacenamiento (grupo C), ha estado más tiempo en contacto con estos microorganismos y ha tenido, entonces el nivel más reducido en el porcentaje del ácido oleico.

A los 6 meses de almacenamiento del aceite (Tabla III.13 y Figura III.14) se redujo el porcentaje del ácido oleico en todos los aceites con diferencia significativa entre los grupos A y C ( $p < 0.05$ ). Esta reducción de la cantidad del ácido oleico con el aumento de tiempo de almacenamiento del aceite concuerda con resultados de estudios anteriores (Rufián-Henares et al., 2005; Sun-Waterhouse et al., 2011).





**Figure III.14.** Evolución del ácido oleico en aceites procedentes de almazara de granito y de madera y envasados en PET y vidrio.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

<sup>a</sup> Promedio  $\pm$  SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de de ácido graso, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

Los otros ácidos grasos monoinsaturados; el palmitoleico, el margaroleico y el gadoleico (Tabla III.13) mostraron valores inferiores a 1 % en todos los aceites, y aunque sus evoluciones no han sido significativas durante almacenamiento, juntos con el ácido oleico presentaron el perfil de los ácidos grasos

monoinsaturados (AGMI), con un nivel más alto en el grupo A, de  $74,19 \pm 1,82$  a  $76,98 \pm 2,00$  %, seguido de los valores del grupo B, de  $72,82 \pm 1,40$  a  $74,54 \pm 3,26$  % y los del grupo C de  $71,01 \pm 1,66$  a  $72,19 \pm 3,35$  %, con diferencia significativa entre los grupos ( $p < 0.05$ ).

Por su parte, el segundo ácido graso insaturado en importancia después del ácido oleico es el ácido linoleico, (AGPI) y aunque ha sufrido una reducción con el almacenamiento, ésta no ha sido estadísticamente significativa. Igual comportamiento ha experimentado el ácido linolénico, (AGPI) en todos los grupos estudiados (Rufián-Henares et al., 2005).

Los valores de todos los ácidos grasos insaturados determinados en los aceites analizados han tenido valores inferiores a los límites permitidos por el Reglamento (UE) N° 61/2011.

Comparando entre los dos tipos de envases, el porcentaje en ácido oleico ha sido superior en los aceites en cristal que en los aceites en PET, con diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). El envasado en plástico favorece la degradación del ácido oleico no solo por efecto enzimático sino también por el enranciamiento químico mayor que sufren los aceites envasados en PET dada la mayor permeabilidad de este material al oxígeno que el vidrio.

Los valores del ácido palmitoleico de los aceites en cristal han sido superiores a los de aceites en PET, mientras que los otros ácidos grasos insaturados; margaroleico, linoleico, linolénico y gadoleico no mostraron diferencias significativas entre los dos tipos de envases.

Considerando el tipo de almazara, los niveles de ácidos grasos insaturados han sido más altos en aceites procedentes de almazara de granito que los aceites obtenidos en almazara de madera, excepto, el oleico a los 6 meses en los aceites de grupo B envasados en cristal y el palmitoleico en todos los grupos de aceite que han tenido valores superiores en los aceites producidos en almazara de madera.

La diferencia obtenida entre los aceites de los dos tipos de almazaras se puede explicar por los manejos practicados en cada almazara durante los procesos de extracción del aceite. Entones, los aceites que han tenido menos cantidades en ácidos grasos insaturados son los aceites que han recibido más lipasas producidas por microorganismos.

En cuanto a la relación oleico / linoléico, ésta ha sido usada en diferentes estudios para examinar la estabilidad oxidativa del aceite (Krichene et al., 2010; Amaral et al., 2010). En las muestras estudiadas, dicha relación se recoge en la Tabla III.14. Se han encontrado valores de  $6,28 \pm 0,73$  a  $6,77 \pm 0,70$ , para los aceites del grupo A, siendo esta relación relativamente superior a la que presentan los aceites de los de grupos B y C, aunque sin diferencias estadísticas significativas tanto para los envasados en cristal como para los envasados en PET. Los aceites obtenidos de aceitunas con menos tiempo de almacenamiento y protegidos en botellas de cristal han tenido valores más elevados de relación oleico / linoleico, mostrando, entonces, un nivel más estables, aunque sin diferencia estadísticamente significativa.

En cuanto a la relación ácidos grasos monoinsaturados / ácidos grasos poliinsaturados, ésta sigue una dinámica parecida a la relación oleico / linoleico, sin diferencias estadísticas significativas entre los diferentes grupos.

Molino/ Envase	Grupo de muestra	Relación AGMI/AGPI		Relación Oleico/Linoleico	
		3 meses	6 meses	3 meses	6 meses
Granito/ PET (n=78)	A	6,14±0,94 a A	6,12±0,97 a A	6,46±1,04 a A	6,45±1,07 a A
	B	6,13±0,94 a A	6,12±0,97 a A	6,42±1,04 a A	6,41±1,07 a A
	C	6,07±0,82 a A	5,97±0,81 a A	6,38±0,84 a A	6,28±0,73 a A
Granito/ Vidrio (n=60)	A	6,47±0,66 a A	6,36±0,72 a A	6,77±0,70 a A	6,64±0,72 a A
	B	6,34±0,95 a A	6,25±1,01 a A	6,62±1,04 a A	6,53±1,13 a A
	C	6,24±0,79 a A	6,34±0,73 a A	6,50±0,78 a A	6,61±0,82 a A
Madera/ PET (n=36)	A	6,23±1,07 a A	6,19±1,38 a A	6,53±0,98 a A	6,48±1,34 a A
	B	6,21±1,39 a A	6,17±1,32 a A	6,49±1,38 a A	6,44±1,30 a A
	C	6,18±0,83 a A	6,10±0,76 a A	6,40±0,89 a A	6,32±0,81 a A
Madera/ Vidrio (n=36)	A	6,42±0,95 a A	6,31±0,91 a A	6,76±0,93 a A	6,63±0,70 a A
	B	6,31±0,90 a A	6,23±0,88 a A	6,63±1,07 a A	6,55±1,04 a A
	C	6,28±0,97 a A	6,12±0,66 a A	6,58±1,00 a A	6,41±0,73 a A

**Tabla III.14.** Relación entre los diferentes ácidos grasos insaturados en aceites de oliva obtenidos en molino de aceite tradicional marroquí durante tiempo de almacenamiento (3 y 6) meses

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

a Promedio ± SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de ácido graso, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

#### **4.2.2 Ácidos grasos saturados.**

El ácido palmítico ha presentado el perfil más alto de los ácidos grasos saturados (Figura III.15 y Figura III.14), a los 3 meses de almacenamiento del aceite ha tenido valores más reducidos en los aceites del grupo A, de  $9,36 \pm 1,23$  a  $11,63 \pm 1,34$  % seguidos de los valores del grupo B, de  $11,29 \pm 1,41$  a  $12,81 \pm 1,24$  % y los más altos han sido en los aceites del grupo C, de  $12,65 \pm 2,43$  a  $13,52 \pm 2,17$  %, con diferencia significativa entre los grupos A y C ( $p < 0.05$ ). Comparando con los valores referenciados por otros autores, en aceites de la misma variedad (Picholine marroquí), producidos por sistema continuo, el ácido palmítico mostró valores más bajos y alrededor de 9,6 a 10,9 % (Haddam et al., 2014) y de 9,37 a 10,88 % (Essiari et al., 2014).

Molino/ Envase	Grupo de muestra	Palmitico <sup>a</sup>		Margarico <sup>a</sup>		Estearico <sup>a</sup>	
		3 meses	6 meses	3 meses	6 meses	3 meses	6 meses
Granito/ PET (n=78)	A	10,47±1,04 a A	11,79±1,05 a A*	0,15±0,05 a A	0,16±0,04 a A	1,22±0,61 a A*	1,88±0,68 c A*
	B	11,78±0,76 b C*	12,93±0,78 a b C*	0,17±0,06 a B	0,19±0,06 a B	1,92±0,82 b B	2,16±0,89 b c B*
	C	13,52±2,17 c E*	14,89±2,13 c E*	0,19±0,06 c C	0,20±0,07 c C	2,35±0,96 b C	2,52±1,01 b C
Granito/ Vidrio (n=60)	A	9,36±1,23 a B*	10,93±1,26 c B*	0,17±0,06 a A	0,18±0,07 a A	1,15±0,35 a A	1,74±0,42 d A
	B	11,29±1,41 a D*	12,77±1,72 c D	0,19±0,02 a B	0,20±0,03 a B	1,76±0,59 b B	2,36±0,76 e B
	C	12,65±2,43 b F	13,21±2,73 d F*	0,20±0,17 a C	0,21±0,21 a C	2,79±0,85 c C*	3,36±0,85 f D*
Madera/ PET (n=36)	A	11,63±1,34 a A	12,66±1,41 c A*	0,18±0,06 a A	0,21±0,06 a A	1,61±0,47 a A*	2,21±0,43 c A*
	B	12,81±1,24 b B*	13,82±1,10 d C*	0,15±0,05 a c B	0,17±0,06 a c B	2,11±0,66 a d B	2,93±0,75 c e B*
	C	13,52±0,93 b C*	14,97±1,11 e D*	0,20±0,03 b c C	0,23±0,03 b c C	2,91±0,89 b d C	3,42±0,81 b e c C
Madera/ Vidrio (n=36)	A	10,00±1,43 a A*	11,24±1,58 a B*	0,14±0,05 a A	0,16±0,05 a A	1,26±0,26 a A	1,87±0,40 c A
	B	11,59±1,46 a b B*	12,31±1,33 a b C	0,17±0,04 a B	0,18±0,04 a B	1,84±0,77 b c B	2,27±0,75 c a B
	C	13,47±0,99 b C	14,98±1,11 c D*	0,17±0,05 a C	0,19±0,06 a C	2,33±0,52 b C*	2,89±0,84 a C*

**Tabla III.15.** Evolución del perfil de ácidos grasos saturados de aceite de oliva obtenido en molino de aceite tradicional marroquí durante tiempo de almacenamiento (3 y 6) meses.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

a Promedio ± SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de ácido graso, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

Molino/ Envase	Grupo de muestra	Araquidico <sup>a</sup>		Behenico <sup>a</sup>		Lignoceric <sup>a</sup>	
		3 meses	6 meses	3 meses	6 meses	3 meses	6 meses
Granito/ PET (n=78)	A	0,26±0,09 aA	0,27±0,09 aA	0,07±0,03 aA	0,09±0,04 aA	0,06±0,05 aA	0,07±0,05 aA
	B	0,26±0,08 aB	0,29±0,08 aB	0,10±0,12 aB	0,11±0,12 aB	0,06±0,05 aB	0,08±0,06 aB
	C	0,25±0,12 aC	0,27±0,13 aC	0,11±0,05 aC	0,12±0,05 aC	0,09±0,05 aC	0,09±0,05 aC
Granito/ Vidrio (n=60)	A	0,24±0,07 aA	0,26±0,08 aA	0,06±0,06 aA	0,07±0,06 aA	0,02±0,00 aA	0,03±0,01 aA
	B	0,23±0,07 aB	0,24±0,08 aB	0,07±0,03 aB	0,08±0,03 aB	0,05±0,05 bB	0,06±0,06 bB
	C	0,24±0,07 aC	0,25±0,07 aC	0,07±0,05 aC	0,08±0,06 aC	0,06±0,06 bC	0,07±0,06 bC
Madera/ PET (n=36)	A	0,30±0,05 aA	0,34±0,07 aA	0,08±0,05 aA	0,10±0,05 aA	0,07±0,06 aA	0,10±0,06 aA
	B	0,25±0,08 aB	0,29±0,09 aB	0,09±0,04 aB	0,11±0,04 aB	0,07±0,05 aB	0,10±0,05 aB
	C	0,26±0,08 aC	0,31±0,08 aC	0,10±0,06 aC	0,12±0,05 aC	0,09±0,05 aC	0,11±0,05 aC
Madera/ Vidrio (n=36)	A	0,19±0,09 aA	0,24±0,11 aA	0,06±0,04 aA	0,10±0,07 aA	0,04±0,04 aA	0,06±0,04 aA
	B	0,24±0,07 aB	0,28±0,08 aB	0,08±0,06 aB	0,10±0,04 aB	0,07±0,04 aB	0,10±0,03 aB
	C	0,20±0,13 aC	0,25±0,14 aC	0,09±0,05 aC	0,11±0,05 aC	0,07±0,04 aB	0,10±0,03 bC

**Tabla III.15. (Continuación)** Evolución del perfil de ácidos grasos saturados de aceite de oliva obtenido en molino de aceite tradicional marroquí durante tiempo de almacenamiento (3 y 6) meses.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

<sup>a</sup> Promedio ± SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de ácido graso, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

Estos valores mayores en el contenido en ácido palmítico en nuestras muestras pueden estar causados por la presencia de microorganismos en las aceitunas como en sus aceites. Mohos y levaduras han sido causantes de la hidrólisis de los ácidos grasos (Valladão et al., 2011; Wang et al., 2011). Así también, bacterias han sido indicadas en importantes degradaciones del ácido oleico

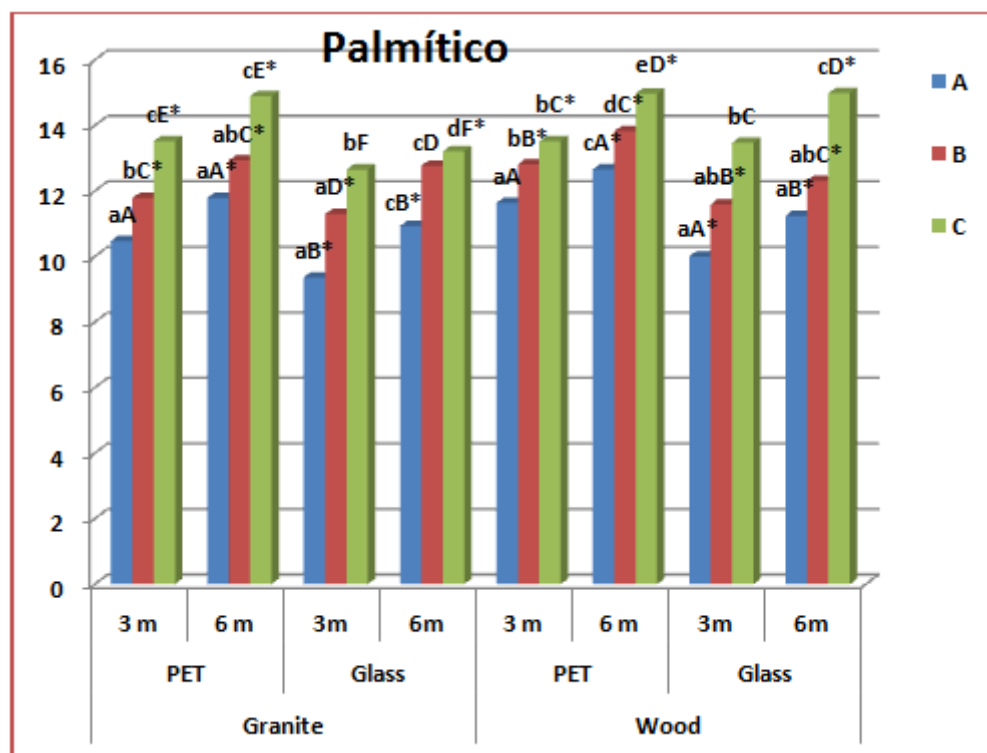
(Svetlitsnyi et al., 1996; Pereira et al., 2002; Zhang et al., 2004; Shigematsu et al., 2006). De hecho, el palmítico ha sido indicado como el primer producto formado de la hidrólisis del ácido oleico (Pereira et al., 2002 Gonçalves et al., 2012).

A los 6 meses de almacenamiento de aceite, se ha aumentado el porcentaje del ácido palmítico en todos los grupos, con diferencia estadísticamente significativa entre los grupos A y C ( $p < 0.05$ ). Este cambio del perfil de ácido palmítico con almacenamiento del aceite concuerda con estudios anteriores (Rufián-Henares, et al., 2005; Sun-Waterhouse et al., 2011).

Comparando entre el tipo de envase, los aceites en cristal han tenido porcentajes en ácido palmítico menos elevados que los aceites en PET, es por ello que podemos intuir que el envasado en cristal protege al aceite contra la hidrólisis de los ácidos grasos y el aumento del ácido palmítico.

Considerando el tipo de almazara, los aceites de los grupos A, B y C envasados en PET y producidos en almazara de madera y los aceites de los grupos B y C (a los 3 y a los 6 meses) y los del grupo A, a los 6 meses, envasados en cristal y obtenidos en la misma almazara han tenido valores en el porcentaje de palmítico superiores a los de aceites producidos en almazara de granito. Los aceites con nivel alto de palmítico muestran que han tenido hidrólisis importante de los ácidos grasos, es decir que han tenido más lipasas producidas por microorganismos. Y esto puede ser explicado por el manejo inadecuado que conduce al crecimiento de microorganismos productores de lipasas durante las etapas de extracción del aceite al no existir en dichas almazaras sistemas como PGH y APPCC que controlen en cada etapa del proceso la calidad higiénica del mismo.





**Figura III.15.** Evolución del ácido palmítico en aceites procedentes de almazara de granito y de madera y envasados en PET y vidrio.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

<sup>a</sup> Promedio  $\pm$  SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de ácido graso, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

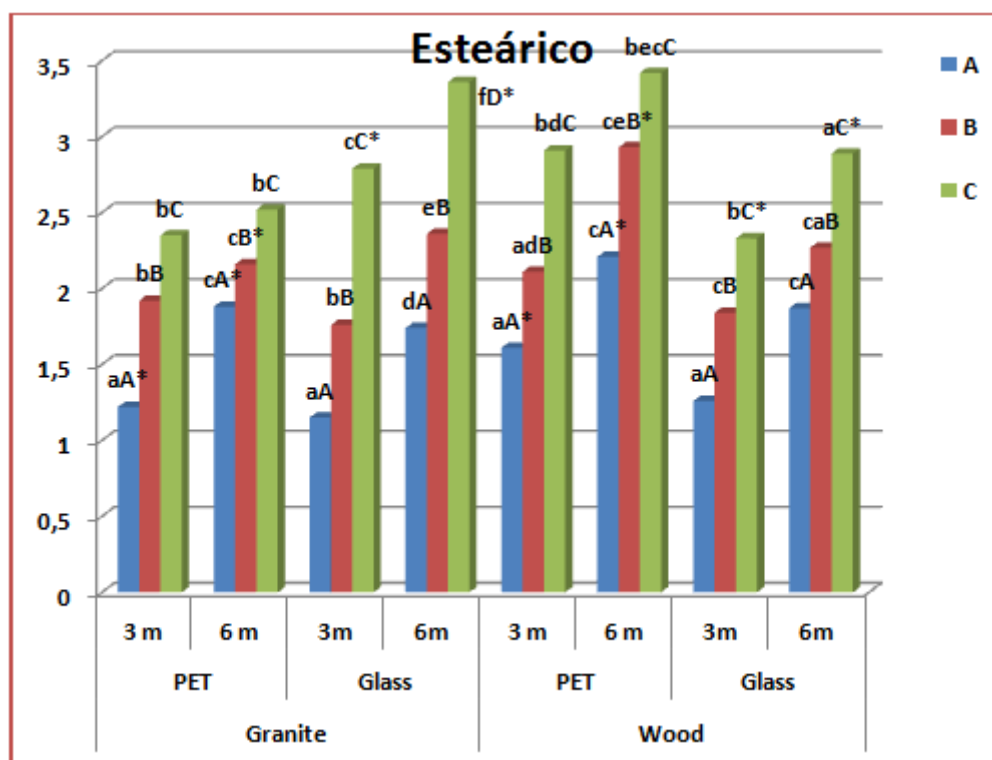
Por su parte, el ácido esteárico ha sido el segundo, en orden de importancia, después del palmítico (Tabla III.15 y Figura III.16). A los 3 meses de almacenamiento del aceite ha tenido valores de  $1,15 \pm 0,35$  a  $1,6 \pm 0,47$  % en el grupo A, de  $1,76 \pm 0,59$  a  $2,11 \pm 0,66$  % en el grupo B y de  $2,33 \pm 0,52$  a  $2,91 \pm 0,89$  % en el grupo C. El aumento del perfil de esteárico puede ser resultado de la hidrólisis de los ácidos grasos por microorganismos productores

de lipasas, tales como mohos y levaduras tal y como ponen de manifiesto Valladão et al. (2011) y Wang et al. (2011).

A los 6 meses de almacenamiento del aceite se han incrementado los valores para este ácido en los aceites estudiados y han sido de  $1,74 \pm 0,42$  a  $2,21 \pm 0,43$  % en el grupo A, de  $2,16 \pm 0,89$ , de  $2,93 \pm 0,75$  % en el grupo B y de  $2,52 \pm 1,01$  a  $3,42 \pm 0,81$  % en el grupo C. Estos resultados están de acuerdo con los de estudios anteriores (Rufián-Henares, et al., 2005; Sun-Waterhouse et al., 2011).

En relación al material de envasado utilizado, los aceites envasados en cristal no han mostrado diferencias significativas con los envasados en PET, en relación al ácido esteárico.

Considerando el tipo de almazara, los aceites del grupo A (a los 3 meses y los 6 meses) y los de grupo B a los 6 meses, envasados en PET y producidos en almazara de granito han tenido valores en esteárico más reducidos que en los aceites de los mismos grupos y envases y obtenidos en almazara de madera. Mientras que los aceites envasados en cristal y producidos en almazara de granito solo los del grupo C (a los 3 y a los 6 meses) que han mostrado valores en esteárico superiores a los mismos tipos de aceites producidos en almazara de madera, con diferencia significativa. Los aceites con nivel elevado en ácido esteárico, han recibido niveles importantes de lipasas degradantes de los ácidos grasos y causantes de la producción de este ácido graso. Hecho que es relacionado, entonces con los manejos empleados durante los procesos de extracción del aceite en cada tipo de almazara. De nuevo, podemos intuir que el manejo inadecuado existente en estas almazaras en cuanto a la falta de PGH y de APPCC, conduce a un mayor crecimiento de microorganismos productores de lipasas durante las etapas de extracción del aceite que favorecería la hidrólisis de los triglicéridos y la aparición de ácido esteárico libre.



**Figura III.15.** Evolución del ácido palmítico en aceites procedentes de almazara de granito y de madera y envasados en PET y vidrio.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

<sup>a</sup> Promedio  $\pm$  SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de ácido graso, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

El resto de los ácidos grasos saturados estudiados: el margárico, el araquídico, el behenico y lignocérico (Tabla III.15), presentaron un ligero aumento con el almacenamiento, sin diferencia significativa. Y juntos con el ácido palmítico y el ácido esteárico formaron el perfil de los ácidos saturados (AGS) (Tabla III.14) y presentaron a los 3 meses valores más bajos en el grupo A ( $11,00 \pm 1,02$  a  $13,87 \pm 1,53$  %), seguidos de los del grupo B ( $13,59 \pm 1,27$  a  $15,48 \pm 1,20$  %)

y por último, los del grupo C ( $16,01 \pm 1,72$  a  $17,08 \pm 0,94$  %), existiendo diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los grupos A y C, tanto entre los aceites procedentes de almazara de granito como en los procedentes de almazara de madera. Este porcentaje de ácidos grasos saturados (AGS) ha sido más bajo en aceites de oliva de la misma variedad (Picholine marroquí) producidos por procesos continuos, de  $12,1 \pm 0,4$  a  $13,4 \pm 0,5$  % (Haddam et al., 2014).

A los 6 meses de almacenamiento del aceite se ha aumentado el porcentaje de los AGS, y ha sido de  $13,21 \pm 1,7$  a  $15,62 \pm 1,50$  % en el grupo A, de  $15,24 \pm 1,19$  a  $17,42 \pm 0,98$  % en el grupo B y de  $17,18 \pm 1,68$  a  $19,16 \pm 0,79$  % en el grupo C, con diferencias significativas. El aumento del perfil de los ácidos grasos saturados con el almacenamiento de aceite concuerda con resultados de estudios anteriores (Sun-Waterhouse et al., 2011).

Los aceites envasados en cristal han tenido una reducción significativa en ácidos grasos saturados que los aceites en PET. El envasado en cristal, entonces, protege los aceites contra la degradación enzimática.

Los aceites de los grupos A y B (a los 3 y 6 meses) y los del grupo C a los 6 meses, en PET y producidos en almazara de granito han tenido valores más reducidos en ácidos grasos saturados que los aceites de los mismos grupos en los mismos envases y obtenidos en almazaras de madera. Igual, los aceites del grupo A, a los 3 meses y del grupo C a los 6 meses, envasados en cristal y obtenidos en almazara de granito presentaron valores en AGS más reducidos que los mismos aceites en el mismo envase y producidos en almazara de madera, con diferencias significativas. La diferencia en los ácidos grasos saturados entre las dos almazaras está relacionada con los prácticos usados en cada almazara durante la extracción del aceite. Los aceites con más porcentaje de ácidos grasos saturados son los aceites que han tenido lipasas importantes conduciendo al aumento de la cantidad de este tipo de ácidos grasos, es decir que han recibido un crecimiento importante de microorganismos productores de este tipo de lipasas.

En cuanto a la relación ácidos grasos insaturados / ácidos grasos saturados (AGI / AGS), los mayores valores se han obtenido en las muestras del grupo A (Tabla III.16), independientemente del tipo de almazara y del material de envasado, existiendo diferencias estadísticas significativas entre los grupos A y C ( $p < 0.05$ ).

Molino/ Envase	Grupo de muestra	Relación AGI/AGS	
		3 meses	6 meses
Granito/ PET (n=78)	A	7,17±0,55 a A *	5,98±0,49 d A
	B	5,99±0,53 b C *	5,31±0,49 e C *
	C	5,05±0,76 c E	4,52±0,66 f D
Granito/ Vidrio (n=60)	A	8,07±0,75 a B *	6,56±0,62 d B
	B	6,34±0,84 b D	5,33±0,73 e C
	C	5,23±1,53 c E	4,82±0,96 f D
Madera/ PET (n=36)	A	6,20±0,80 a A *	5,40±0,70 a A
	B	5,46±0,32 b C *	4,72±0,25 b C *
	C	4,83±0,31 c E	4,18±0,20 c E
Madera/ Vidrio (n=36)	A	7,54±0,71 a B *	6,28±0,41 d B
	B	6,14±0,74 b D	5,55±0,49 e D
	C	5,09±0,80 c F	4,33±0,68 f E

**Tabla III.16.** Relación ácidos grasos insaturados / ácidos grasos saturados en aceites de oliva obtenidos en molino de aceite tradicional marroquí durante tiempo de almacenamiento (3 y 6) meses

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

<sup>a</sup> Promedio ± SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de ácido graso, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

A los 6 meses de almacenamiento se ha reducido el ratio insaturados saturados en todos los grupos, con diferencia estadísticamente significativa entre los grupos A y C ( $p < 0.05$ ). Resultados conformes con los encontrados en estudios realizados por Sun-Waterhouse et al. (2011).

El aumento del contenido de los ácidos grasos saturados y la reducción de los ácidos grasos insaturados produce una disminución en el valor de la relación AGI / AGS, al incrementarse la hidrólisis de los ácidos grasos por lipasas microbianas que existen en las aceitunas como en sus propios aceites, como ya recogimos en apartados anteriores. Bacterias han sido indicadas en la degradación de ácidos grasos insaturados (Svetlitsnyi et al., 1996; Pereira et al., 2002; Zhang et al., 2004; Shigematsu et al., 2006), así mismo, mohos (Valladão et al., 2011) y levaduras (Wang et al., 2011) han sido causantes de la hidrólisis de los ácidos grasos insaturados y de la reducción de la relación AGS / AGS.

Por su parte, otros autores como Lalman y Bagley (2001) y Decker et al. (2008) indicaron la formación del ácido palmítico como resultado de hidrólisis del ácido oleico.

Los aceites en cristal han mostrado valores de ratio insaturado saturados más elevado que los aceites en PET. El envasado en plástico favorece entonces la alteración del ratio insaturado saturado del aceite de oliva y como consecuencia reduce la estabilidad oxidativa del aceite.

Los aceites de los grupos A (en cristal y en PET), obtenidos en almazara de granito han mostrado valores en ratio insaturado saturado superiores a los de los aceites del mismo grupo producidos en almazara de madera, con diferencias significativas. Esta diferencia debe estar relacionada con los manejos practicados durante la extracción del aceite, los aceites con valores reducidos de ratio insaturado saturado han recibido entonces más enzimas degradantes de los ácidos grasos insaturados y aumentantes de los ácidos grasos saturados. Es decir que han tenido crecimiento más importante de microorganismos productores de estos tipos de enzimas o lipasas.

En resumen, la degradación de los ácidos grasos del aceite de oliva y los cambios en sus perfiles lipídicos pueden estar causados por lipasas producidas por bacterias mesófilas y psicrótróficas, mohos y levaduras, que han sido encontradas tanto en las aceitunas objeto de estudio como en sus correspondientes aceites. Sin embargo, aunque el mecanismo de degradación de los ácidos grasos todavía no está claro (Sousa, 2006), los triglicéridos son hidrolizados por lipasas dando lugar a un aumento de ácidos grasos libres de cadena larga y glicerol. Y, después de un transporte pasivo o activo hacia la célula (DiRusso et al., 1999) del microorganismo, estos ácidos grasos serán degradados por enzimas, conduciendo a la producción de acetil-CoA, que será usado por el microorganismo para su metabolismo, respiración y generación de energía) (Becker, 2010). La degradación de los ácidos grasos insaturados y la influencia sobre la relación AGI /AGS pueden causar cambios en las propiedades físicas de membranas del microorganismo y como consecuencia alterarse sus funciones (Wang et al., 2011). Todos estos efectos pueden, a su vez, ayudar más a un aumento de peroxidación toxica y auto-oxidación de productos (Desbois et al., 2010; Valladão et al., 2011).



## **5. ESTUDIO DEL CONTENIDO EN POLIFENOLES TOTALES Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL ACEITE DE OLIVA PRODUCIDO EN ALMAZARAS TRADICIONALES EN MARRUECOS**

### **5.1. MATERIAL Y MÉTODOS**

#### ***Contenido en fenoles totales y métodos de capacidad antioxidante estudiados***

El contenido en fenoles totales, expresado en  $\mu\text{g}$  ácido gálico por g de aceite y la capacidad antioxidante, determinada por los cuatro métodos: DPPH, ABTS, FRAP y DMPD, y expresada en  $\mu\text{M/g}$  de aceite, se realizaron en extractos de aceite en metanol al 80% y se determinaron por medidas espectrofotométrica.

#### **. APARATOS Y MATERIALES DE LABORATORIO**

- Balanza analítica con precisión de décimas de miligramo Mettler AE200
- Agitador Vibromatic Cleaver Scientific Ltd
- pH-metro Basic, 20 + CRISON
- Matraces aforados de 10, 25, 50 y 100 ml.
- Tubos de centrifuga de 50 ml de capacidad y con tapas
- Tubos desechables de 3 y 5 ml
- Micropipetas de 5-10, 20 -200  $\mu\text{L}$ ; 100-1000 y 1000-5000  $\mu\text{L}$
- Pipetas graduadas de 10 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Eppendorf<sup>®</sup>
- Centrífuga Universal 320 Ilettich
- Espectrofotómetro: Model Perkin Elmer Lambda 25; UV/Vis Spectrometer

### ***Extracción en metanol al 80 %***

La extracción de los compuestos antioxidantes de las muestras de aceite se realizó en metanol. La concentración de las soluciones metanólica es un factor importante que ha motivado el estudio de los rendimientos de extracción y ha llevado a la conclusión de que los extractos al 80% optimizan esta operación respecto a los de 60 y 100%, con esta proporción; metanol/ agua (80:20 v/v) (Segura-Carretero et al., 2010).

En el aceite de oliva se recomienda dividir el volumen total de la mezcla en más de una etapa de extracción, siendo suficientes 2 para obtener el mayor rendimiento. (Montedoro et al., 1992, Samaniego, 2006).

### **Procedimiento**

El procedimiento se basó en el recomendado por Montedoro et al. (1992) con algunas modificaciones realizadas a la metodología original.

En un tubo de centrífuga de 50 ml con tapa y protegido de la luz, han sido diluidos 10 g aceite en metanol al 80% (1:1 p/v), la mezcla se agitó durante 60mn a 200 rpm y después se puso a centrifugar a 8000rpm durante 15mn, a temperatura ambiente. El sobrenadante se recuperó con una pipeta Pasteur en un matraz aforado de 25 ml protegido de la luz. El procedimiento de extracción y separación se repitió dos veces. Finalmente, se combinaron las fracciones recuperadas y el volumen se ajustó a 25 ml con metanol al 80%. Se almacenaron alícuotas de 7 ml de los extractos metanólicos a bajo de 20°C hasta el momento del análisis.

### 5.1.1. Determinación del Contenido en Polifenoles Totales (IPT)

**Patrón de referencia:** Acido Gálico. Sigma (Madrid- España)

#### Reactivos

Nombre	Proveedor
Reactivo de Folin-Ciocalteu	Merck (Darmstadt, Alemania)
Carbonato Sódico	Panreac (Barcelona, España)

#### Fundamento

El método se basa en el carácter reductor de los polifenoles. Se emplea como reactivo una mezcla de ácido fosfotúngstico ( $H_3PW_{12}O_{40}$ ) y ácido fosfomolibdico ( $H_3PMo_{12}O_{40}$ ) en medio básico, que se reduce al oxidar los compuestos fenólicos, originando óxidos azules de tungsteno ( $W_8O_{23}$ ) y molibdeno ( $MO_8O_{23}$ ). La absorbencia del color azul desarrollado es máxima en torno a los 725 nm, proporcional a la concentración total de polifenoles y se expresa como índice de Folin- Ciocalteu. Se trata la muestra con el reactivo de Folin-Ciocalteu en presencia de  $Na_2CO_3$ . El contenido de fenoles totales se medio en los extractos metanólicos de los aceites usando una modificación del método de Folin-Ciocalteu propuesto por Singleton et al. (1999).

#### Preparación de los reactivos

-Disolución patrón: 17.6 mg de ácido gálico se disolvieron en 17.6 ml de agua miliQ para obtener una solución madre de 1g/l.

-Disolución de carbonato sódico al 10 % (p/v): Se disolvieron 50 g de carbonato sódico en 500 ml de agua en ebullición, se enfrió a temperatura ambiente y se

filtró. Se preparó con antelación para evitar que la turbidez interfiriera con la lectura.

-Recta de calibrado: A partir de la solución madre, de ácido gálico de 1g/l se tomaron volúmenes de 5, 10, 25 y 50  $\mu$ l, que fueron depositados en matraces aforados de 10 ml; en seguida, se diluyeron en 2.5 ml de agua bidistilada y se añadieron 0.5 ml de reactivo de Folin- Ciocalteau. La mezcla se dejó reaccionar en oscuridad durante 5 mn.

Finalmente se añadió 2 ml de solución de carbonato de sodio al 10% y se incubo a temperatura ambiente durante 90 mn en oscuridad antes de hacer la lectura a 700 nm usando agua bidistilada como blanco. Las concentraciones resultantes de las diluciones descritas fueron de 0, 0.5, 1, 2.5, y 5  $\mu$ g/ml respectivamente (Figura III.17).

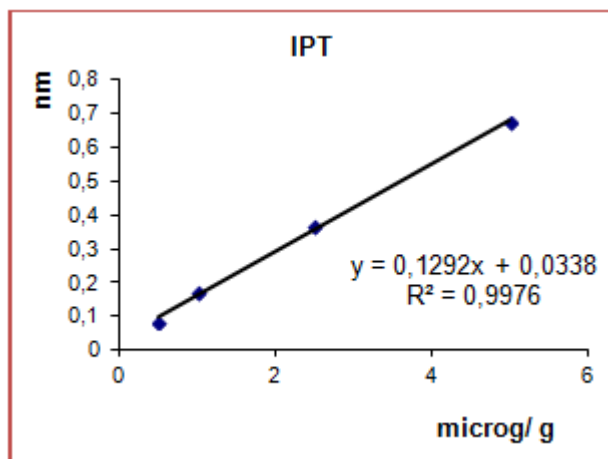


Figura III.17. Recta de calibrado del ácido gálico.

### Medida del contenido de fenoles totales

Paralelamente a la preparación de la curva patrón, se diluyó una alícuota del extracto metabólico (200  $\mu$ l) en 10 ml de metanol, se mezcló el volumen del extracto con 2.5 ml de agua bidistilada y se ha hecho reaccionar con 0.5 de reactivo de Folin-Ciocalteu durante 5mn a temperatura ambiente y aislada de la luz. En seguida, se agregaron 2 ml de carbonato de sodio al 10%; se ajusto el volumen con agua bidistilada y se agitó manualmente hasta conseguir la homogeneidad. La muestra se incubó durante 90 min en la oscuridad a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación, se midió la absorbencia a 700 nm usando agua bidistilada como blanco y ácido gálico como estándar.

El contenido de fenoles totales fue reportado como microgramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de muestra de aceite ( $\mu$ g /g) que fue calculado por interpolación a partir de la curva estándar de ácido gálico (Figura III.17).

### 5.1.2. Estudio de la capacidad antioxidante

**Estándar de referencia:** Trolox (ácido 6-hidroxi-2, 5, 7, 8-tetrametilcromano-2-carboxílico. (Aldrich, Alemania).

#### Reactivos

	Nombre	Proveedor
<b>DPPH</b>	1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH)	Aldrich
	Metanol para HPLC	Panreac
<b>ABTS</b>	Sal diamónica del Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS)	Sigma
	Persulfato potásico	Panreac
	Etanol	Panreac
<b>FRAP</b>	TPTZ (2,4,6-tris (2-piridil)-S-triazina) FRAP	Fluka-
	HCL	Sigma
	Cloruro ferrico 6 idrato	Panreac
	Acetato di sodio anidro	Panreac
<b>DMPD</b>	DMPD	Sigma
	HCL	Panreac
	Cloruro ferrico 6 idrato	Panreac
	Acetato de sodio anidro	Panreac

#### Expresión de los resultados

Los ensayos que evalúan la capacidad antioxidante, y emplean el valor de capacidad antioxidante equivalente al Trolox (TEAC) al expresar sus resultados se basan en la habilidad de las moléculas antioxidantes para captar un radical

(Pellegrini et al., 2003). En los métodos DPPH, ABTS, FRAP y DMPD la capacidad antioxidante se expresó como porcentaje de inhibición y a partir de este dato se calculó la TEAC, que se define como la concentración de Trolox que tiene la misma actividad antioxidante que una concentración de 1 mM de la sustancia a ensayar (Pellegrini et al., 1999; 2001). El Trolox es un análogo hidrosoluble de la vitamina E, se usa como estándar antioxidante por ser soluble en fases acuosas y orgánicas (Arnao et al., 2001a).

Para cada método, se determinó la curva de calibrado, representando distintas concentraciones de Trolox frente a las variaciones de absorbancia del radical correspondiente.

El valor Trolox de los extractos de la muestra se calculó una vez que se consiguió el estado de equilibrio en la reacción de DPPH, ABTS, FRAP y DMPD. Estableciendo en primer lugar, el porcentaje de inhibición de la absorbancia con la ecuación (1a), aplicada a los métodos DPPH, ABTS y DMPD y la ecuación (1b) correspondiente al método FRAP. El valor del porcentaje de inhibición se interpoló en las curvas de calibración respectivas para obtener la cantidad de antioxidante (Trolox) que provoca una inhibición equivalente a la de la muestra problema. Con la ecuación (2) se calculó la capacidad antioxidante como TEAC; y enseguida la capacidad antioxidante total de la muestra de aceite.

$$(1a) \% \text{ Inhibición} = \frac{Abs_i - Abs_f}{Abs_i} \times 100$$

$$(1b) \% \text{ Inhibición} = \frac{Abs_f - Abs_i}{Abs_f} \times 100$$

$$(2) CA = \text{Inhibición} \times f d \times 1000$$

En donde:

*Inhibición*: Inhibición de la oxidación del radical (%).

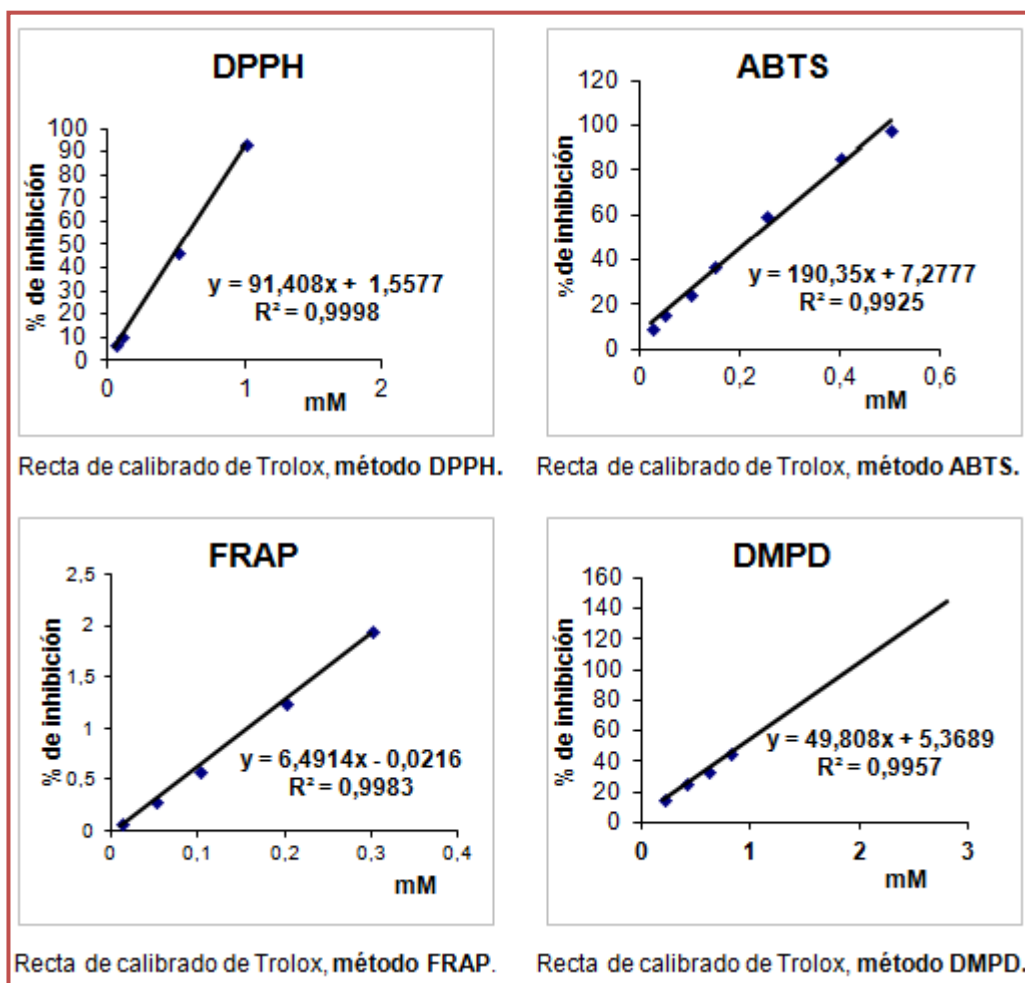
*Abs<sub>i</sub>*: Absorbancia inicial del radical.

*Abs<sub>f</sub>*: Absorbancia final del radical.

*CA*: Capacidad antioxidante, TEAC en mmol Trolox/l o μM/g de aceite.

El valor TEAC se expresó en mmol Trolox/l (Figura III. 18) y la capacidad antioxidante total (CA) en μM Eq. Trolox/ g de aceite.





**Figura III.18.** Curva de calibrado, representando distintas concentraciones de Trolox frente a las variaciones de absorbancia del radical correspondiente.

### **-Método DPPH (1,1- difenil-2- picrilhidrazil)**

Se evaluó la actividad antioxidante de las muestras, usando el radical DPPH (1,1- difenil-2-picrilhidrazil) disuelto en solución metanólica, según el método descrito por Brand-Williams et al. (1995), con algunas modificaciones. Se evaluó la actividad antioxidante total de muestra o patrón mediando la disminución de la absorbancia del radical a 515 nm. Esta reducción es proporcional a los compuestos antioxidantes que contienen la muestra o patrón empleado (Brand-Williams et al., 1995).

**- Método del ABTS (Ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico))**

La actividad antioxidante de una sustancia se puede medir como la habilidad de capturar el radical sintético ABTS<sup>•+</sup>, compuesto cromóforo, muy estable, soluble en agua y con máximo de absorción a 734 nm. Se ha seguido el método descrito por Pellegrini et al., (1999). Se forma el radical en ausencia de la muestra a analizar hasta obtener una absorbancia estable. Al añadir la sustancia antioxidante la concentración del radical disminuye y se puede medir el descenso de absorbancia producido.

Se emplea un ensayo de “post- adicción”; el radical se genera en ausencia de la muestra a analizar hasta obtener una absorbancia estable, para evitar que los componentes de la misma muestra puedan reaccionar con los reactivos, lo que puede conllevar a una sobreestimación en la capacidad antioxidante (Prior et al., 2005).

**-Método de FRAP (2,4,6-tripiridil-s-triazina)**

El método de FRAP evalúa la habilidad de antioxidante a reducir el complejo  $Fe^{3+}$  - TPTZ a la forma  $Fe^{2+}$  - TPTZ, de máxima absorción a 593 nm. El mecanismo reductor férrico del poder antioxidante (FRAP) se baso en la transferencia de electrones en lugar de la transferencia de un átomo de hidrógeno (Prior et al., 2005). La reacción FRAP se realizo en medio ácido; a un pH de 3,6 para mantener la solubilidad del hierro, y reducir el potencial de ionización que impulsa la transferencia de un átomo de hidrógeno y aumenta el potencial redox.

**-Método DMPD (dihidrocloruro de 4-ammino-N,N-dimetil fenilenediamina)**

El método DMPD Se ha seguido el método descrito por Fogliano et al. (1999). El método se baso en la utilización del cromógeno dihidrocloruro 4-ammino-N, N-dimetil fenilenediamina que presenta absorbancia espectrofotométrica en el visible. En medio acido y en presencia de oxidante se forma el radical catiónico

DMPD<sup>•+</sup>, es estable, presenta un color rosa muy intenso y presenta un pico máximo de absorbancia a 505 nm. La presencia de un antioxidante produce la transferencia de un átomo de hidrogeno al radical lo que provoca una decoloración de la solución proporcional a la concentración del antioxidante.

## **5.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

El aceite de oliva es considerado un alimento altamente saludable, gracias a sus ácidos grasos insaturados (principalmente el ácido oleico) y su fracción del insaponificable especialmente rica en compuestos con actividad antioxidante (Franco et al., 2014; Mancebo-Campos et al., 2014), como tocoferoles, carotenoides, escualeno y particularmente componentes fenólicos (Oliveras-López et al., 2014).

Por otro lado, los componentes fenólicos del aceite de oliva han mostrado contribuir altamente a la estabilidad del aceite frente a las reacciones de oxidación o enranciamiento químico, por lo que la determinación de su cantidad se ha considerado un parámetro importante en la evaluación de la calidad de este alimento (Montedoro, 2002).

### **5.2.1. Contenido en Polifenoles Totales (IPT)**

La cantidad total de polifenoles determinada en las muestras de aceite de oliva de la variedad Picholine marroquí, procedentes de dos tipos de almazaras tradicionales: almazara de madera y almazara de granito y envasados en botellas de plástico (PET) y de vidrio ha sido recogida, en la Tabla III.17 así como en la Figura III.18.

Almazara/ Envase	Grupos de muestra	IPT ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>a</sup>	
		3 meses	6 meses
Granito/ PET (n=78)	A	100,42±38,79 a A*	75,03±33,32 b G*
	B	78,37±22,15 c C*	56,17±22,68 d I*
	C	71,39±25,50 c E*	48,70±21,67 d K*
Granito/ Vidrio (n=60)	A	136,55±30,39 a B	118,50±35,00 d H
	B	110,81±30,08 b D	98,18±30,29 b J
	C	92,71±24,37 c F	79,87±27,83 c L
Madera/ PET (n=36)	A	134,57±40,29 a A*	110,53±29,09 d E*
	B	105,10±42,97 b B*	73,48±50,01 b F*
	C	66,05±17,41 c C*	43,23±18,42 c G*
Madera/ Vidrio (n=36)	A	150,63±34,55 a A	130,72±26,13 a E
	B	128,34±36,55 a b B	105,57±29,82 b F
	C	98,25±24,44 d D	81,11±20,89 d H

**Tabla III.17.** Evolución en el Contenido en Polifenoles Totales (IPT) ( $\mu\text{g/g}$ ) de aceites de oliva obtenidos en molino de aceite tradicional en Marruecos durante tiempo de almacenamiento (3 y 6) meses.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

a Promedio  $\pm$  SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el contenido en polifenoles totales del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

Los valores de la cantidad de fenoles totales de las muestras analizadas a los 3 meses de almacenamiento de aceite han sido más altos en los aceites de grupo A (aceites obtenidos de aceitunas que han sido almacenadas durante 7 días), de  $100,42 \pm 38,79$  a  $150,63 \pm 34,55$   $\mu\text{g} / \text{g}$ , seguidos de los valores de aceite de grupo B (aceites obtenidos de aceitunas que han sido almacenadas durante 15 días), de  $78,37 \pm 22,15$  a  $128,34 \pm 36,55$   $\mu\text{g} / \text{g}$  y los valores más bajos han sido indicados en las muestras de grupo C (aceites obtenidos de aceitunas que han sido almacenadas durante 30 días), de  $66,05 \pm 17,41$ , a  $98,25 \pm 24,44$   $\mu\text{g} / \text{g}$ , con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los grupos A y C. Aceites de la misma variedad: Picholine marroquí, producidos por sistema continuo, han tenido valores superiores en fenoles totales, de  $313,0 \pm 5,00$  a  $478,3 \pm 3,00$   $\mu\text{g} / \text{g}$  (Haddam et al., 2014) y en otros estudios, en una clasificación de 25 variedades del Banco de Germoplasma Mundial de Córdoba en función de su contenido en fenoles totales, los aceites de la misma variedad han mostrado cantidad de 450 a 600  $\mu\text{g} / \text{g}$  y se han considerado niveles altos (Uceda et al., 2005).

Esta reducción en el Contenido en Polifenoles Totales en los aceites estudiados podría ser consecuencia de las reacciones de hidrolisis y oxidación que han tenido las aceitunas durante su almacenamiento; etapa durante lo cual las aceitunas han sido almacenadas al aire libre. El largo tiempo de almacenamiento de estos frutos y la exposición prolongada al oxígeno y a la luz; dos factores importantes que han sido indicados en degradación excesiva de los componentes fenólicos (Cicerale et al., 2011). Lo que puede explicar la reducción significativa ( $p < 0.05$ ), en el contenido de polifenoles totales en los aceites del grupo C, obtenidos de aceitunas que han sido almacenadas durante más tiempos. Por otro lado la extracción de este tipo de aceite en las almazaras tradicionales marroquíes estudiadas, se realizaba lentamente, y es el caso practicado en almazaras tradicionales en Marruecos, donde el tiempo de obtención del mismo (entre molturación y prensado) puede durar alrededor de 12 horas, tiempo durante favorece aún más el contacto de la pasta de las aceitunas con la luz, el  $\text{O}_2$  y las reacciones enzimáticas de hidrólisis. Todos estos factores, como han citado numerosos autores, entre ellos García et al. (2001), Servili et al. (2008) y García-Rodríguez et al. (2011) pueden conducir al

aumento de reacciones de óxido- reducción endógenas y exógenas así como al aumento de radicales libres por la oxidación de los ácidos grasos, que podrían promover la aparición de reacciones de oxidación secundarias que llevarían a una mayor oxidación de la fracción fenólica.

Igualmente, diferentes autores señalaron degradaciones importantes de polifenoles por bacteria (Ramos-Cormenzana et al., 1996; Lamia and Moktar, 2003; McNamara et al., 2008; Rodríguez et al., 2008a; Rodríguez et al., 2008b; Landete et al., 2010), mohos (Fadil et al., 2003; Kapellakis et al., 2008) y levaduras (Ciafardini and Zullo, 2002; Zullo et al., 2010).

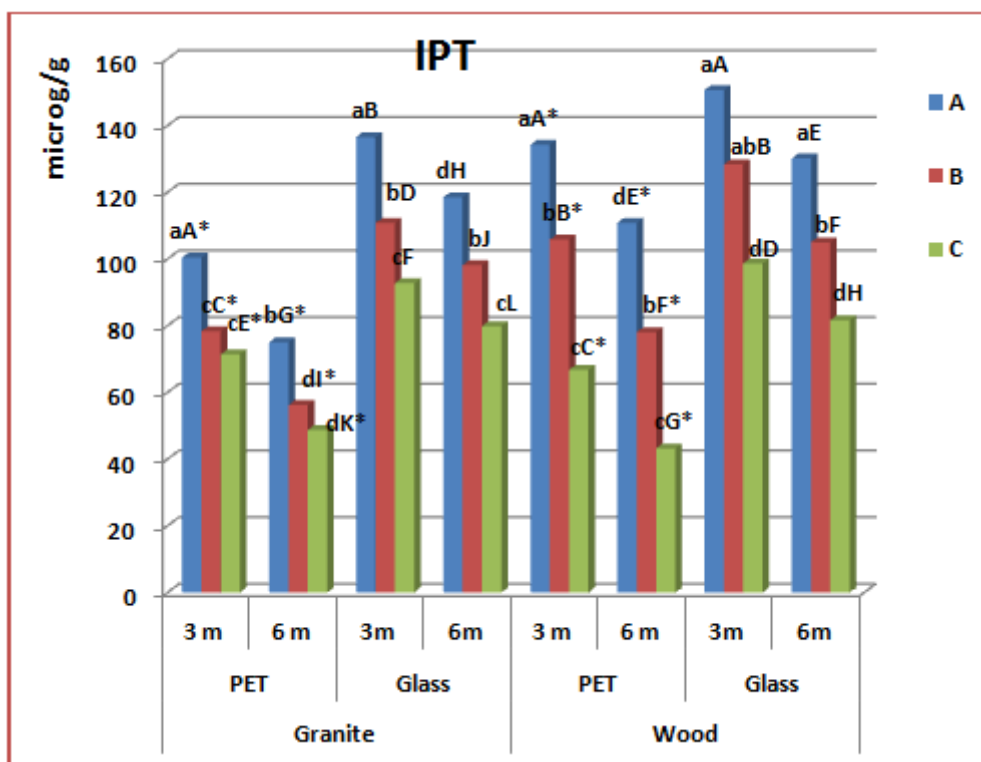
En nuestro caso, tanto en las aceitunas como en los aceites estudiados, hemos cuantificado (como ya vimos en el capítulo III.2) una cantidad importante de bacterias, mohos y levaduras capaces de haber podido llevar a cabo estas reacciones enzimáticas de oxidación que han provocado una reducción importante en el Contenido Fenólico Total de los aceites.

A los 6 meses de almacenamiento se ha reducido la cantidad de polifenoles totales en todos los aceites, y ha sido de  $75,03 \pm 33,32$  a  $130,72 \pm 26,13$   $\mu\text{g/g}$  en el grupo A, de  $56,17 \pm 22,68$  a  $105,57 \pm 29,82$   $\mu\text{g/g}$  en el grupo B y de  $43,23 \pm 18,42$  a  $81,11 \pm 20,89$   $\mu\text{g/g}$  en el grupo C, la reducción ha sido significativa entre los grupos A y C ( $p < 0.05$ ). Este cambio en el Contenido en Fenoles Totales con almacenamiento se concuerda con los resultados de varios estudios (Rastrelli et al., 2002; Morello, 2004; Lavelli et al., 2006; Gomez-Alonso et al., 2007; Baiano et al., 2009; Lerma-Garcia et al., 2009; Stefanoudaki et al., 2010; Dabbou et al., 2011; Cicerale et al., 2011; Samaniego-Sánchez et al., 2012; Ben-Hassine et al., 2013).

El material de envasado (Figura III.18), también juega un papel importante a la hora de prevenir frente a la oxidación, en este caso promovida por el oxígeno y la luz, ya que en los aceites envasados en vidrio, y en todos los casos, los valores de IPT han sido superiores a los envasados en PET.

Comparando entre los dos tipos de almazaras, los aceites de los grupos A y B procedentes de almazara de madera han tenido valores más altos en fenoles totales que los aceites de los mismos grupos obtenidos en almazara de granito. Mientras que en los aceites del grupo A la cantidad de estos componentes ha sido más elevada en los aceites producidos en almazara de granito que en los obtenidos en almazara de madera. Esta diferencia entre los aceites de las dos almazaras depende entonces, de los manejos practicados en cada almazara; es decir los aceites que han tenidos los fenoles más reducidos han tenido más contacto con los factores alterantes de estos compuestos, como el O<sub>2</sub>, la luz y/o los microorganismos, durante la extracción del aceite.





**Figura III.18.** Evolución en el IPT ( $\mu\text{g/g}$ ) en aceites de oliva obtenidos en molino de aceite tradicional en Marruecos durante tiempo de almacenamiento (3 y 6 meses).

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

a Promedio  $\pm$  SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el contenido en polifenoles totales del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

### 5.2.2. Determinación de la capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante total determinada por los cuatro métodos; DPPH, ABTS, FRAP y DMPD en las muestras de aceite de oliva de la variedad Picholine marroquí, procedentes de dos tipos de almazaras tradicionales: almazara de madera y almazara de granito y envasados en botellas de plástico (PET) y de vidrio ha sido recogida en la Tabla III.18.

Almazara/ Envase	Grupos de muestra	DPPH (microM/g) <sup>a</sup>		ABTS (microM/g) <sup>a</sup>	
		3 meses	6 meses	3 meses	6 meses
Granito/ PET (n=78)	A	0,36±0,26 a A*	0,23±0,15 b G*	0,71±0,37 a A	0,23±0,09 b D*
	B	0,21±0,11 c C*	0,14±0,07 d I*	0,42±0,06 c B	0,18±0,02 d F*
	C	0,16±0,10 c E*	0,13±0,17 d K*	0,41±0,21 c C*	0,17±0,06 d H
Granito/ Vidrio (n=60)	A	0,89±0,30 a B	0,73±0,29 a H	0,74±0,25 a A	0,33±0,15 d E*
	B	0,58±0,30 b D	0,47±0,32 b J	0,52±0,21 b c B	0,25±0,08 d G
	C	0,47±0,23 b F	0,30±0,13 c L	0,42±0,19 c C	0,21±0,06 e H
Madera/ PET (n=36)	A	0,73±0,26 a A*	0,43±0,21 d E*	0,48±0,25 a A	0,35±0,14 d D*
	B	0,52±0,25 b B*	0,30±0,09 b F*	0,35±0,12 b B	0,26±0,08 d e b E*
	C	0,32±0,13 c C*	0,23±0,06 c G*	0,23±0,07 c C*	0,18±0,034 e F
Madera/ Vidrio (n=36)	A	0,89±0,31 a A	0,60±0,26 d E	0,56±0,25 a A	0,44±0,15 a D*
	B	0,71±0,37 a b B	0,47±0,29 e F	0,49±0,17 a B	0,34±0,19 c a E
	C	0,51±0,20 b D	0,38±0,18 b H	0,30±0,11 d C	0,22±0,05 d G

**Tabla III.18.** Evolución de la Capacidad Antioxidante total de aceites de oliva obtenidos en molino de aceite tradicional en Marruecos durante tiempo de almacenamiento (3 y 6) meses.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

a Promedio ± SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de variable, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

Almazara/ Envase	Grupos de muestra	FRAP (microM/g) <sup>a</sup>		DMPD (microM/g) <sup>a</sup>	
		3 meses	6 meses	3 meses	6 meses
Granito/ PET (n=78)	A	11,56±6,82 a A	5,45±3,14 b D	11,18±3,13 a A	7,61±4,09 b E
	B	11,28±3,54 a B	4,45±2,29 c F*	0,88±0,41 c B*	0,57±0,63 d G*
	C	11,18±6,54 a C*	4,29±2,48 c H	0,43±0,23 c D*	0,51±0,53 d I
Granito/ Vidrio (n=60)	A	11,95±2,38 a A	6,84±1,48 b E*	12,64±5,55 a A	8,56±3,71 c F
	B	11,45±1,98 a B	5,07±1,07 c G*	1,07±0,39 b C	0,82±0,45 d H
	C	11,22±1,59 a C*	4,90±1,44 c I*	0,75±0,30 b D	0,65±0,24 d J
Madera/ PET (n=36)	A	10,75±1,06 a A	4,30±1,19 c A	10,31±3,33 a A	7,28±3,66 c D
	B	9,45±1,27 b C	3,03±0,79 d B*	1,06±0,58 b B*	0,76±0,48 b E*
	C	8,91±1,39 b E*	2,90±0,95 d C	0,68±0,95 b c*	0,51±0,26 b F
Madera/ Vidrio (n=36)	A	11,64±0,97 a B	4,42±1,06 c A*	10,74±1,25 a A	8,86±2,07 b D
	B	10,21±1,55 b D	3,44±0,84 d B*	1,13±0,59 c B	0,79±0,47 c E
	C	9,89±0,88 b E*	3,19±0,82 d C*	0,72±0,27 c C	0,56±0,22 c F

**Tabla III.18. (Continuación)** Evolución de la Capacidad Antioxidante total de aceites de oliva obtenidos en molino de aceite tradicional en Marruecos durante tiempo de almacenamiento (3 y 6) meses.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

a Promedio ± SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de variable, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

La Capacidad Antioxidante de aceite es un parámetro importante que determina su calidad y su valor nutricional (Christodouleas et al., 2015). En el aceite de oliva el efecto antioxidante es atribuido a sus componentes minoritarios (la llamada “fracción del insaponificable”). La concentración y composición de estos compuestos puede atacar a los radicales libres y actuar reduciendo o inhibiendo la propagación de la oxidación lipídica (Bendini et al., 2007; Franco et al., 2014).

	<b>IPT3</b>	<b>DPPH</b>	<b>ABTS</b>	<b>FRAP</b>	<b>DMPD</b>
<b>IPT3</b>		0,6067 <sup>r</sup>	0,1699 <sup>r</sup>	0,0739 <sup>r</sup>	0,2340 <sup>r</sup>
		0,0000 <sup>P</sup>	0,0005 <sup>P</sup>	0,1307 <sup>P</sup>	0,0000 <sup>P</sup>
<b>DPPH</b>	0,6067 <sup>r</sup>		0,2961 <sup>r</sup>	0,2177 <sup>r</sup>	0,3822 <sup>r</sup>
	0,0000 <sup>P</sup>		0,0000 <sup>P</sup>	0,0000 <sup>P</sup>	0,0000 <sup>P</sup>
<b>ABTS</b>	0,1699 <sup>r</sup>	0,2961 <sup>r</sup>		0,5391 <sup>r</sup>	0,4640 <sup>r</sup>
	0,0005 <sup>P</sup>	0,0000 <sup>P</sup>		0,0000 <sup>P</sup>	0,0000 <sup>P</sup>
<b>FRAP</b>	0,0739 <sup>r</sup>	0,2177 <sup>r</sup>	0,5391 <sup>r</sup>		0,2194 <sup>r</sup>
	0,1307 <sup>P</sup>	0,0000 <sup>P</sup>	0,0000 <sup>P</sup>		0,0000 <sup>P</sup>
<b>DMPD</b>	0,2340 <sup>r</sup>	0,3822 <sup>r</sup>	0,4640 <sup>r</sup>	0,2194 <sup>r</sup>	
	0,0000 <sup>P</sup>	0,0000 <sup>P</sup>	0,0000 <sup>P</sup>	0,0000 <sup>P</sup>	

**Tabla III.19.** Correlaciones de IPT y capacidad antioxidante mostrados en muestras de aceite de oliva estudiadas. r: Correlación; p < 0.05: diferencia significativa.

### **-DPPH**

El método DPPH ha sido usado ampliamente por una gran variedad de autores para dar una estimación general de capacidad antioxidante aceitunas (Fernandez-Orozco et al., 2011; Hassanzadeh et al., 2014), y en aceites de oliva (Nakbi et al., 2010; Franco et al., 2014; Kalogeropoulos et al., 2014; Mancebo-Campos et al., 2014; Christodouleas et al., 2015; Koidis and Boskou, 2015).

La capacidad antioxidante medida por el método DPPH, a los 3 meses de almacenamiento del aceite (Tabla III.18 y Figura III.19) presento valores más altos en los aceites de grupo A, de  $0,36 \pm 0,26$  a  $0,89 \pm 0,31$   $\mu\text{M/g}$ , seguidos

de los valores de aceites de grupo B, de  $0,21 \pm 0,11$  a  $0,71 \pm 0,37$   $\mu\text{M/g}$  y los valores más reducidos han sido indicados en los aceites de grupo C, de  $0,16 \pm 0,10$  a  $0,51 \pm 0,20$   $\mu\text{M/g}$ , con diferencia significativa entre los grupos A y C ( $p < 0.05$ ).

La contribución de los fenoles del aceite de oliva al efecto antioxidante es un hecho ampliamente estudiado y conocido. Lo que explica la relación lineal positiva y significativa ( $r = 0,61$ ) entre el contenido de fenoles totales (IPT), determinado por el método de Folin-Ciocalteu y la capacidad antioxidante obtenida por el ensayo DPPH, examinando el coeficiente de correlación de Pearson (Tabla III.19).

La reducción en la Capacidad Antioxidante (CA) mostrada por los aceites del grupo C podría estar relacionada con una mayor hidrólisis de fenoles glucosídicos por enzimas  $\beta$ -glucosidasas, que son enzimas con origen tanto endógeno, existentes en las aceitunas (Botía et al., 2001) como exógeno, de microorganismos: bacterias y levaduras (Ciafardini et al., 1994; Marsilio et al., 1996; Marsilio and Lanza, 1998; Ciafardini and Zullo, 2000; Ciafardini and Zullo, 2002; Landete et al., 2010). Durante su almacenamiento, las aceitunas (almacenadas a la intemperie y en sacos de 50 Kg) han sido expuestas a sufrir un mayor daño mecánico por compresión y un crecimiento importante de microorganismos, lo que favorecería el ataque de las  $\beta$ -glucosidasas hacia fenoles, como el hidroxitirosol y la oleuropeína, por los cuales tienen una gran afinidad (Romero-Segura et al., 2009). Estos fenoles juegan un papel muy importante en la composición del perfil fenólico del aceite de oliva y por tanto en su CA, y son importantes inhibidores de la peroxidación lipídica (Kalogeropoulos et al., 2014).

En aceites a granel, componentes menores pueden actuar como antioxidantes mientras que otros pueden ser pro oxidantes (Choe, 2008). Es lo que sucede con los tocoferoles, naturales antioxidantes en aceite de oliva particularmente el alfa-tocoferol, que puede formar radical tocoferol, perdiendo su potencial antioxidante y actuando como pro-oxidante, aumentando el efecto de oxidación

y participando en reacciones de propagación de oxidación por abstracción de hidrogeno, en forma de hidroperóxido (Mancebo-Campos et al., 2014).

Además de radicales libres que son los principales oxidantes de los fenoles en productos de vegetales, existen enzimas de actividad oxido-reductasa tales como polifenol peroxidasa (PX) y oxidasa (PO) (García-Rodríguez et al., 2011), que se consideran enzimas relacionadas con la oxidación de fenoles, tanto en procesos fisiológicos asociados con la madurez del fruto como en cualquier forma de manipulación que implica el daño o la fractura del tejido del fruto (Pourcel et al., 2006).

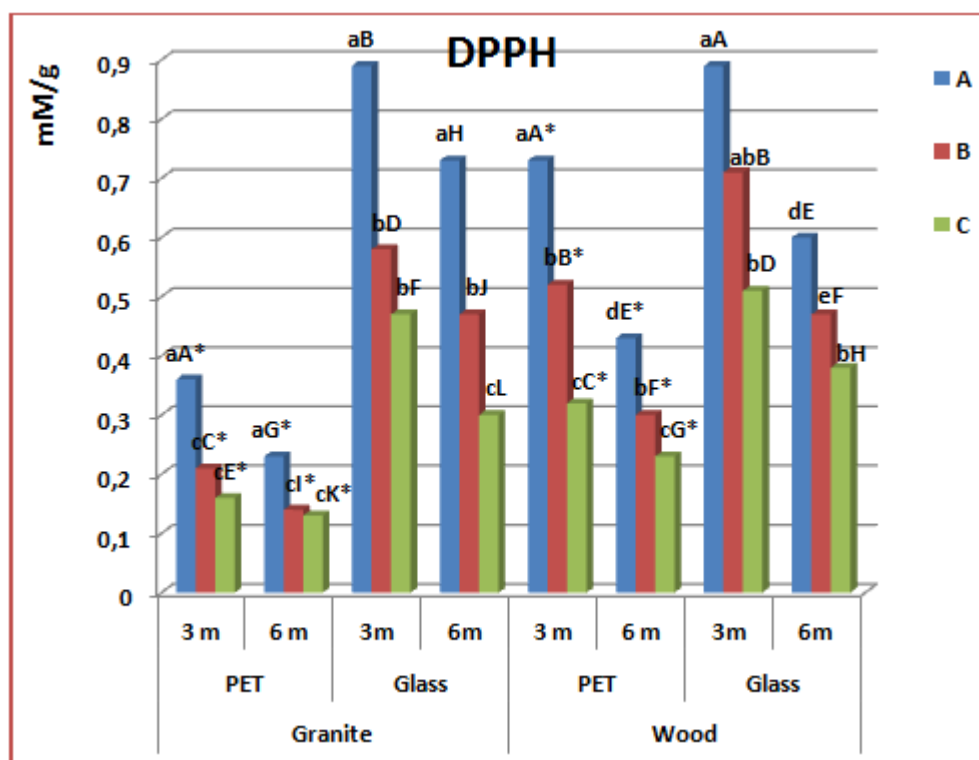
La auto-oxidación de fenoles causada por el daño de tejido del fruto más la exposición prolonga al oxígeno y la oxidación de los ácidos grasos aumentan la formación de  $H_2O_2$ , que puede ser usado por enzimas como la peroxidasa (PX) para realzar la oxidación de compuestos fenolicos (Takahama and Oniki 2000). Las actividades de PX y PO demostradas en etapas de maduración, son capaces de oxidar tanto principales compuestos fenólicos encontrado en el fruto del olivo, como compuestos fenólicos que surgen durante el proceso de obtener el aceite, sobre todo aquellos derivados de hidroxitirosol (García-Rodríguez et al., 2011).

A los 6 meses se ha reducido la capacidad antioxidante determinada por el método DPPH en todos los grupos de aceite, con diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los grupos A y C. Este cambio con almacenamiento, de la capacidad antioxidante determinada por el ensayo DPPH en aceite de oliva ha sido indicado por varios autores (Mancebo-Campos et al., 2014; Koidis and Boskou, 2015).

En los aceites envasados en cristal (Figura III.19), la capacidad antioxidante determinada por el método DPPH ha tenido valores más superiores que en los aceites en PET. El tipo de envase influye en la capacidad antioxidante determinada por este método y por ello, el envasado de aceite de oliva en

cristal protege sus componentes antioxidantes, capaces de reducir o eliminar el radical DPPH<sup>•</sup> más que el envasado en plástico.

El tipo de almazara no ha tenido influencia importante en la capacidad antioxidante determinada por el método DPPH, aunque los aceites envasados en PET y producidos en almazara de granito han mostrado valores de capacidad antioxidante inferiores ( $p < 0.05$ ) a los aceites de mismos grupos procedentes de almazara de madera. Esta diferencia entre los aceites de las dos almazaras están más bien relacionadas con diferentes manejos operacionales realizados durante la extracción del aceite en cada almazara.



**Figura III.19.** Evolución en la capacidad antioxidante determinada por el método DPPH de aceites de oliva obtenidos en molino de aceite tradicional en Marruecos durante tiempo de almacenamiento (3 y 6) meses.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

a Promedio  $\pm$  SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de variable, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.



## **-ABTS**

En relación al método ABTS, éste ha sido usado en diferentes trabajos para determinar la capacidad antioxidante en aceite de oliva (Nakbi et al., 2010; Samaniego-Sánchez et al., 2012; Anwar et al., 2013, Koidis and Boskou, 2015).

El radical catiónico  $ABTS^{•+}$  es soluble tanto en solventes acuosos como en orgánicos, con este método se puede medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica, y puede ser neutralizado por reducción directa a través de la transferencia de electrones o por eliminación radical a través de la transferencia de un átomo de hidrógeno (Cerretani and Bendini, 2010). Este método es uno de los más aplicados, al considerarse un método de elevada sensibilidad, práctico, rápido y muy estable pero tiene un inconveniente y es que en las reacciones con componentes donantes de átomo de hidrogeno, el radical  $ABTS^{•+}$  puede ser reducido por componentes con grupos-OH que no contribuyen significativamente al efecto antioxidante (Cerretani and Bendini, 2010).

Los valores de la capacidad antioxidante determinada por el ensayo ABTS (Tabla III.18 y Figura III.20) a los 3 meses han sido más altos en los aceites de grupo A, de  $0,48 \pm 0,25$  a  $0,74 \pm 0,25$   $\mu M/ g$ , seguidos por los valores de aceites de grupo B, de  $0,35 \pm 0,12$  a  $0,52 \pm 0,21$   $\mu M/ g$ , y los ~~as~~ reducidos han sido mostrados en los aceites de grupo C, de  $0,23 \pm 0,07$  a  $0,42 \pm 0,19$   $\mu M/ g$ , con diferencia significativa entre los aceites de grupos A y C.

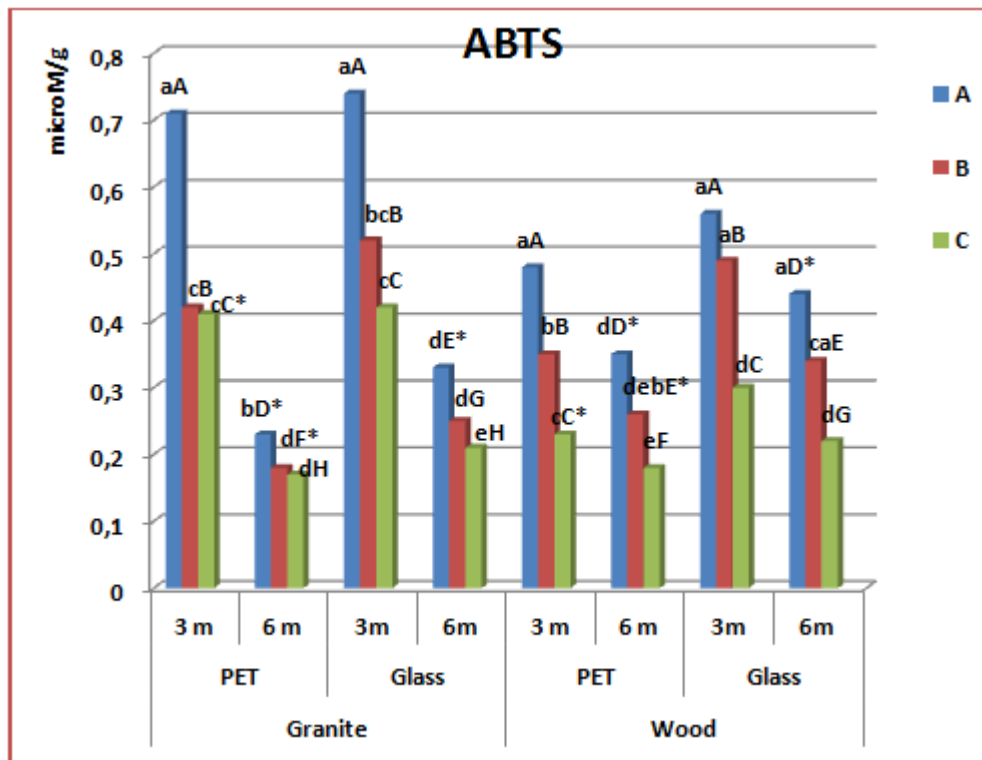
La correlación positiva y significativa ( $r = 0,17$ ) entre la cantidad de fenoles totales y el método ABTS (Tabla III.19) muestra que compuestos antioxidantes fenolicos han participado en la reducción del radical  $ABTS^{•+}$ . Sin embargo, los valores encontrados por este método no se consideran resultantes por completo del efecto de los componentes antioxidantes, dado que el  $ABTS^{•+}$  puede reaccionar con componentes con grupos hidroxilo que no contribuyen significativamente al efecto antioxidante (Cerretani and Bendini, 2010).

No obstante, el método ABTS correlaciona positivamente y significativamente con el método DPPH, con valores de  $r = 0,29$ . De hecho, los menores valores encontrados en la CA por el método ABTS, sobre todo en los aceites del grupo C, (procedentes de aceitunas con más tiempo de almacenamiento ,30 días), podría deberse a que los componentes antioxidantes capaces de reducir el radical ABTS\*\* han sufrido una fuerte degradación con el avance del tiempo de almacenamiento de las aceitunas.

A los 6 meses de almacenamiento, los valores de ABTS se han encontrado más reducido en todos los grupos de aceite con diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los grupos A y C. La reducción de la capacidad antioxidante determinada por el método ABTS con almacenamiento de aceite de oliva concuerda con los encontrados por Samaniego-Sánchez et al. (2012).

Los aceites en PET han mostrado valores de ABTS más reducidos que en cristal. El envasado en cristal protege los componentes antioxidantes responsables de depuración del radical ABTS más que el envasado en plástico.

Considerando el tipo de almazara, los aceites de grupo C envasados en PET y producidos en almazara de granito presentaron a los 3 meses valores en ABTS más superiores que los mismos aceites obtenidos en almazara de madera, mientras que en los aceites de grupos A y B, a los 6 meses y precedentes de almazara de granito los valores de ABTS se han encontrado más reducidos que los valores de los mismos aceites obtenidos en almazara de madera. La diferencia entre los valores de ABTS de aceites producidos en las dos almazaras depende de las manipulaciones o manejo practicados durante la extracción del aceite en cada almazara.



**Figura III.20.** Evolución en la capacidad antioxidante determinada por el método ABTS (micro M/g) de aceites de oliva obtenidos en molino de aceite tradicional en Marruecos durante tiempo de almacenamiento (3 y 6) meses.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

a Promedio  $\pm$  SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de variable, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

### **-FRAP**

Por su parte, el método FRAP (Figura III.21) también ha sido empleado para medir la actividad antioxidante a nivel de aceite de oliva (Ozgen et al., 2006; Kalogeropoulos et al., 2014). La reacción FRAP se realiza a pH ácido de 3,6 para mantener la solubilidad del hierro, por lo que la reacción a un pH bajo se reduce el potencial de ionización que impulsa la transferencia de un átomo de hidrógeno y aumenta el potencial redox, que es el mecanismo de reacción dominante. El FRAP reacciona con muestras lipofílicas como hidrofílicas. Durante estas reacciones se reduce el complejo de hierro  $Fe^{3+}$  al complejo de  $Fe^{2+}$ , y se mide la absorbancia de complejo coloreado con  $Fe^{2+}$ . El FRAP no puede detectar componentes que actúan con radicales por transferencia de hidrogeno (Cerretani and Bendini, 2010).

Por el método FRAP, los mayores valores de CA se han encontrado en las muestras del grupo A y los menores valores en las muestras del grupo C, sin que existan sin embargo diferencias estadísticas significativas entre estos grupos. Esto puede indicar que la disminución de los componentes antioxidantes capaces de reducir el  $Fe^{3+}$  ha tenido lugar durante el almacenamiento de las aceitunas.

A los 6 meses de almacenamiento de los aceites, se han reducido los valores de FRAP siendo de  $4,30 \pm 1,19$  a  $6,84 \pm 1,48$   $\mu M/g$  en los aceites del grupo A;  $3,03 \pm 0,79$  a  $5,07 \pm 1,07$   $\mu M/g$  en los aceites del grupo B, y  $2,90 \pm 0,95$  a  $4,90 \pm 1,44$   $\mu M/g$  en los aceites del grupo C. Esta reducción estadísticamente significativa entre los 3 y los 6 meses de almacenamiento, lo que demuestra que las reacciones de reducción de los componentes antioxidantes han sido más fuertes después del proceso de extracción del aceite.

La correlación de Pearson entre el método FRAP y la cantidad total de fenoles (IPT) ( $r = 0,07$ ) (Tabla III.19), ha sido positiva y no significativa, indica que los fenoles presentes en estos aceites no han tenido efectos significativos en la reducción del  $Fe^{3+}$ . Esto puede explicar la fuerte reducción en los aceites, de

los fenoles antioxidantes capaces de transmitir electrones para la reducción del  $\text{Fe}^{3+}$ , ya que durante los procesos de extracción de estos aceites, no se practicó por parte de ninguna de las almazaras, la etapa de limpieza ni de lavado de las aceitunas a fin de eliminar restos de tierras y otros agentes contaminantes con trazas de metales.

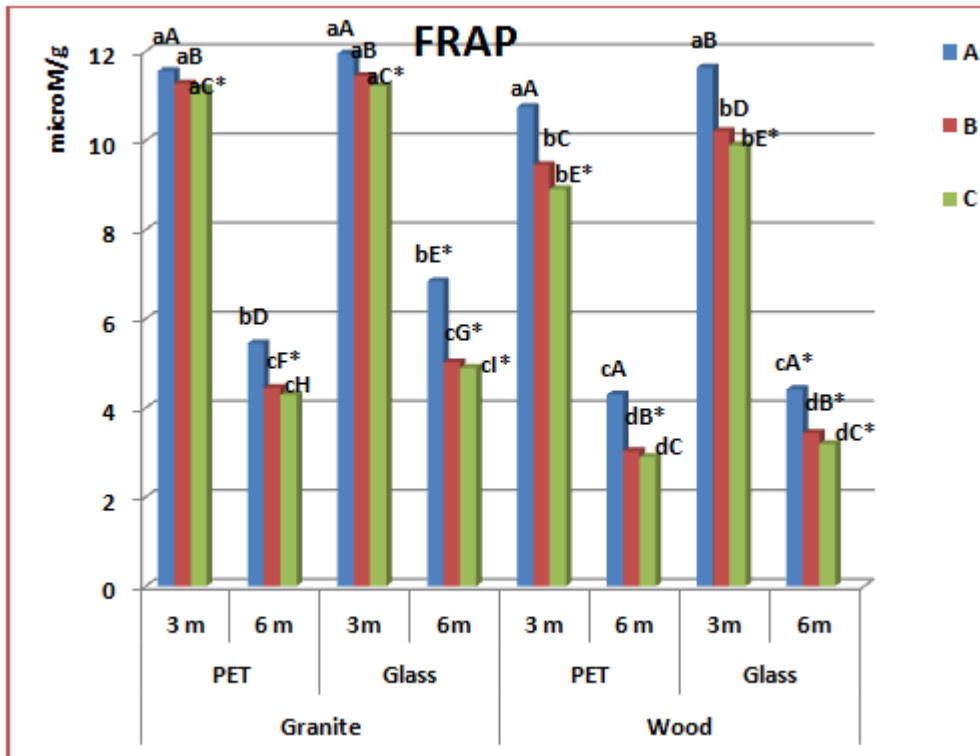
Los aceites han sido separados después de una simple decantación y sin filtración, hecho que conduce a almacenamiento de agua de vegetación con el aceite (Ciafardini and Zullo, 2002) y la formación de emulsiones de agua-aceite, donde se concentran los hidroperóxidos de lípidos por aumento de los ácidos grasos libres (Waraho et al., 2011). Estas emulsiones igualmente, atraen los metales de transición que promueven la oxidación (Waraho et al., 2009) y que pueden causar la formación de radicales libres y oxidación de los lípidos (Gülçin et al., 2010).

La correlación positiva y significativa entre el FRAP y los dos métodos: DPPH y ABTS con valores  $r = 0,22$  y  $r = 0,54$ , respectivamente, muestra que mecanismos de reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  como de los radicales  $\text{DPPH}^{\bullet}$  y  $\text{ABTS}^{2+}$  han sido parecidos, tal vez con más tendencia con el método ABTS, donde la correlación ha sido más importante ( $r = 0,54$ ).

En cuanto al sistema de envasado, los aceites en cristal han tenido valores en FRAP ligeramente superiores a los aceites en PET, sin diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0.05$ ), por tanto el envasado en cristal conserva mejor los compuestos antioxidantes capaces de reducir el  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  que el envasado en PET.

Comparando entre las dos almazaras, los aceites de grupo C (en cristal y en PET) a los 3 meses y los aceites de grupo B en PET a los 6 meses y los aceites de grupos A, B y C en cristal y a los 6 meses, y producidos en almazara de granito han tenido valores en FRAP más superiores que los mismos aceites producidos en almazara de madera. Esta diferencia entre los aceites está relacionada sobre todo con los manejos aplicados durante la extracción del aceite en cada almazara. Los aceites de grupos con valores más

reducidos de FRAP indican que, durante su extracción, la pasta de aceitunas ha sido más tiempo en contacto con factores alterantes de los componentes antioxidantes, responsables de la reducción de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ .



**Figura III.21.** Evolución en la capacidad antioxidante determinada por el método FRAP (micro M/g) de aceites de oliva obtenidos en molino de aceite tradicional en Marruecos durante tiempo de almacenamiento (3 y 6) meses.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

a Promedio  $\pm$  SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de variable, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

### **-DMPD**

Por su parte el método DMPD ha sido aplicado para determinar la capacidad antioxidante en aceite de oliva (El haouhay et al., 2014).

El ensayo DMPD solo reacciona con muestras disueltas en medio acuoso. La presencia de un antioxidante produce la transferencia de un átomo de hidrogeno al radical catiónico DMPD<sup>•+</sup>, lo que provoca una decoloración de la solución proporcional a la concentración del antioxidante.

Los valores de la capacidad antioxidante determinada por el método DMPD a los 3 meses (Tabla III.18 y Figura III.22), han sido más elevados en los aceites de grupo A y los más bajos han sido encontrados en los aceites de grupo C, con diferencia significativa entre ambos grupos ( $p < 0.05$ ).

La relación lineal entre el método DMPD y el contenido de fenoles totales ha sido positiva y significativa ( $r = 0.23$ ) (Tabla III.19), lo que explica la existencia de compuestos fenólicos entre los componentes antioxidantes que han causado la captación del radical catiónico DMPD<sup>•+</sup> transmitiéndole átomos de hidrogeno.

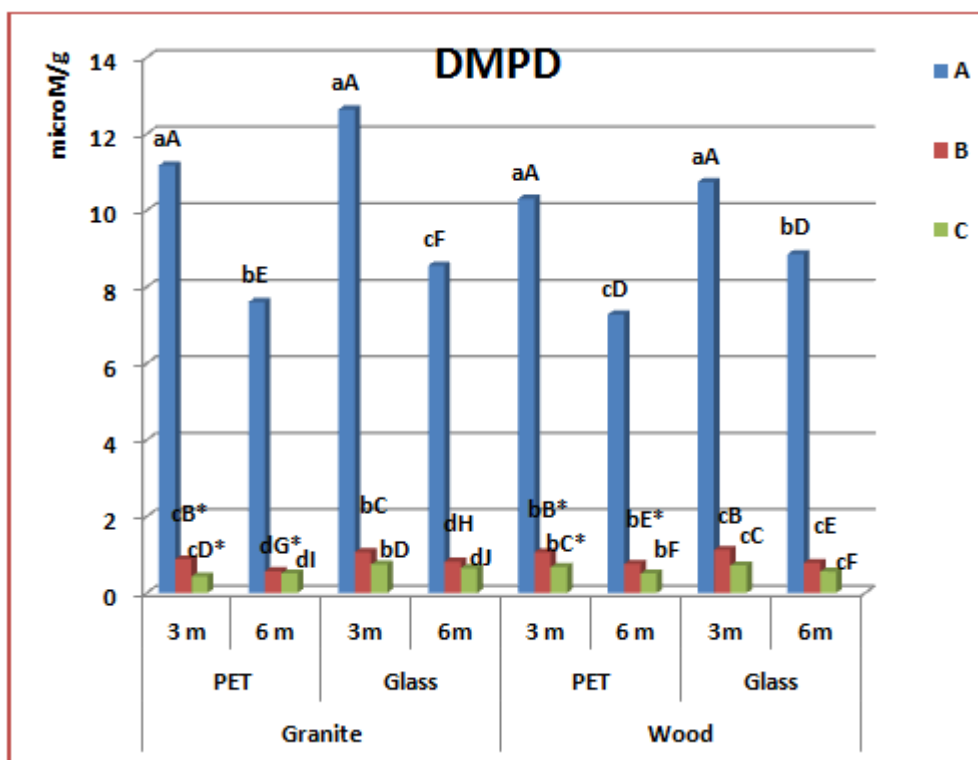
La capacidad de transferencia de átomo de hidrogeno para la captación del radical DMPD<sup>•+</sup> ha sido atribuida a compuestos antioxidantes como la Oleuropeina y el hidroxitirosol (Briante et al., 2004). La fuerte reducción de la capacidad encontrada por el método DMPD en los aceite de los grupos B y C, informaría sobre la fuerte degradación de dichos componentes antioxidantes durante el proceso de almacenamiento de las aceitunas, que puede verse favorecida por efecto de la luz y del oxigeno, factores muy importantes en la alteración de los fenoles antioxidantes (Lerma-Garcia et al., 2009; Cicerale et al., 2011). También podría ser resultante de reacciones enzimáticas, de origen endógeno (por enzimas propias de las aceitunas) o de origen exógeno producido por microorganismos (Botía et al., 2001; Ciafardini and Zullo, 2002; Landete et al., 2010).

A los 6 meses de almacenamiento se han reducido los valores de DMPD en todos los grupos y han sido de  $7,28 \pm 3,66$  a  $8,86 \pm 2,07$   $\mu\text{M}/\text{g}$  en el grupo A, de  $0,57 \pm 0,63$  a  $0,82 \pm 0,45$   $\mu\text{M}/\text{g}$  en el grupo B y de  $0,51 \pm 0,53$  a  $0,65 \pm 0,24$   $\mu\text{M}/\text{g}$  en el grupo C, mostrándose una fuerte degradación de los componentes antioxidantes con almacenamiento.

Los aceites en botellas de cristal han tenido valores de DMPD superiores a los de los aceites contenidos en botellas PET. Como en todos los casos anteriores, el envasado en vidrio protege más al aceite contra el deterioro de sus componentes antioxidantes capaces de reducir el efecto del radical DMPD\*\*.

Considerando el tipo de almazara, los aceites en PET del grupo B (a los 3 y a los 6 meses) y los del grupo C, a los 3 meses, y producidos en almazara de granito mostraron valores en DMPD inferiores a los mismos tipos de aceites obtenidos en almazara de madera. La diferencia entre los aceites de las dos almazaras depende de los manejos empleados durante la extracción de aceite. Los aceites con valores reducidos en DMPD muestran que han sido más tiempos expuestos a los fenómenos de reducción de componentes antioxidantes capaces de reducir o eliminar el efecto del radical DMPD\*\* transmitiéndole átomos de hidrogeno.





**Figura III.22.** Evolución en la capacidad antioxidante determinada por el método DMPD (micro M/g) de aceites de oliva obtenidos en molino de aceite tradicional en Marruecos durante tiempo de almacenamiento (3 y 6) meses.

**Nota:** A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas durante 30 días).

a Promedio  $\pm$  SD de tres réplicas.

-Promedios seguidos de la misma letra minúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre el mismo tipo de variable, del mismo tipo de envase y del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos de la misma letra mayúscula no difieren significativamente ( $p > 0,05$ ), comparando entre los dos tipos de envases del mismo tipo de almazara.

-Promedios seguidos del mismo símbolo: \* difieren significativamente ( $p < 0,05$ ), comparando entre los mismos envases de los dos tipos de almazaras.

La correlación entre DMPD y los otros 3 métodos ha sido positiva y significativa entre DMPD y DPPH ( $r = 0,38$ ); entre DMPD y FRAP ( $r = 0,21$ ) y entre DMPD y ABTS ( $r = 0,46$ ). La más alta correlación entre DMPD y ABTS puede ser explicada por el hecho que estos dos métodos se fundamentan en la formación de radicales catiónicos, que para ser captados dependen de antioxidantes

donadores de átomos de hidrogeno. Y el método ABTS puede ser solubilizado en medio acuoso como es el caso de DMPD. Entonces antioxidantes con mecanismos parecidos puedan actuar para captar los dos tipos de radicales, ABTS<sup>•+</sup> y DMPD<sup>•+</sup>.

No obstante, los valores reducidos de coeficiente de correlación entre los cuatro métodos indican que dichos ensayos utilizados independientemente como métodos analíticos para determinar la capacidad antioxidante total, no dan una gran estimación sobre la CA a nivel de este tipo de aceite. Efecto que, además de los posibles interacciones antagonistas o sinergistas entre compuestos antioxidantes y otros metabolitos que pueden afectar la actividad antioxidante (Odabasoglu et al., 2005; Zenil Lugo et al., 2014), este tipo de aceite ha sido producido sin ningún control y donde las aceitunas estaban expuestas a un gran número de factores prooxidantes, ya que de acuerdo a ciertos autores (Kuskoski et al., 2005), la capacidad antioxidante no solo depende de la concentración y la calidad antioxidante, sino también de su interacción con otros componentes y la metodología aplicada.

En resumen, los análisis realizados mostraron una reducción significativa del IPT y de la capacidad antioxidante total de los aceites estudiados en todos los grupos y a medida que aumentaba el periodo de almacenamiento de dichos aceites, siendo más acusado en los aceites envasados en PET y sin diferencias estadísticas significativas entre los dos tipos de almazara. Esto explica la degradación de los compuestos antioxidantes entre ellos los fenoles, enfrentándose a los efectos oxidativos, reflejados en el aumento del índice de peróxidos y en la absorbancia en el Ultravioleta (K270 y K232). El almacenamiento de las aceitunas y la extracción de su aceite en condiciones incontroladas llevan a la alteración de sus componentes antioxidantes, conduciendo al deterioro de su calidad y a la reducción de sus beneficios saludables. Hechos, que pueden también potenciar efectos negativos en la salud tras su consumo.

## **6. DETERMINACIÓN ESTADÍSTICA DE LOS VARIABLES ESTUDIADOS**

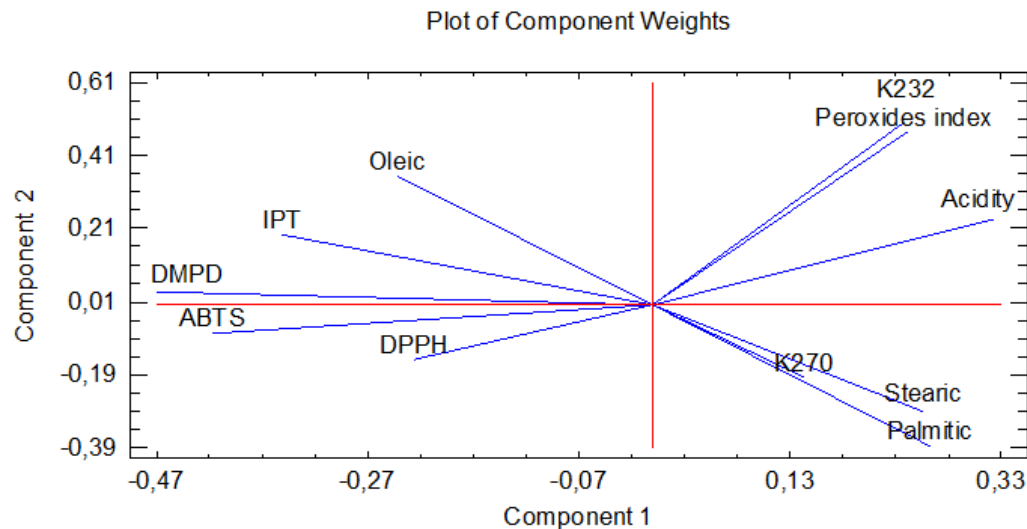
Se han analizado los resultados de los diferentes variables estudiados: el grado de acidez, el índice de peróxidos, la absorbencia en el Ultravioleta; K270 y K232, el perfil de los ácidos grasos, la cantidad de polifenoles totales (IPT) y la capacidad antioxidante, determinando Componentes Principales (PC), construyendo funciones Discriminantes (DA) y agrupando variables en Conglomerados (CA).

En el caso del perfil de los ácidos grasos hemos interesado solo a los que han tenido cambios significativos durante los tiempos de almacenamientos estudiados: el oleico, el palmítico y el esteárico.

- **Componentes Principales (PC)**

El procedimiento de Componentes Principales (Principal Components: PC) se ha determinado para extraer un número reducido de componentes principales de un conjunto de variables cuantitativas. Los componentes principales se definen como el conjunto de combinaciones lineales ortogonales de variables que tienen la máxima varianza (Orr and Scherf, 2002; Van der Werf et al., 2005).

La clasificación obtenida de las variables estudiadas viene recogida en la figura III.23.



**Figura III.23.** Principales componentes de los variables estudiados.

La combinación lineal que hemos podido destacar de los análisis de PCA ha sido indicada en la siguiente ecuación:

$$0,323016 \cdot \text{Acidity} + 0,240845 \cdot \text{Peroxides index} + 0,143195 \cdot \text{K270} + 0,236849 \cdot \text{K232} + 0,262908 \cdot \text{Palmitic} + 0,255797 \cdot \text{Stearic} - 0,241289 \cdot \text{Oleic} - 0,351586 \cdot \text{IPT} - 0,225423 \cdot \text{DPPH} - 0,416269 \cdot \text{ABTS} - 0,46965 \cdot \text{DMPD}.$$

El análisis de los valores de esta ecuación nos ha llevado a clasificar las variables en dos grandes partes: la primera parte con un impacto de variabilidad más alto, formada por el grado de acidez, porcentaje de ácido palmítico, y esteárico, índice de peróxidos, K232 y de K270, y la segunda parte formada por el porcentaje del ácido oleico, índice de polifenoles totales y análisis de la capacidad antioxidante.

Las variables de la primera parte son relacionadas con el aumento de los elementos formados como consecuencia de las reacciones de hidrólisis de los triglicéridos (acidez), del aumento del perfil de los ácidos grasos saturados (palmítico y esteárico), de oxidación y de auto-oxidación (índice de peróxidos, K232 y K 270). El grado de acidez, el palmítico y el esteárico han mostrado los valores con más impacto. En efecto, estas tres variables dependen

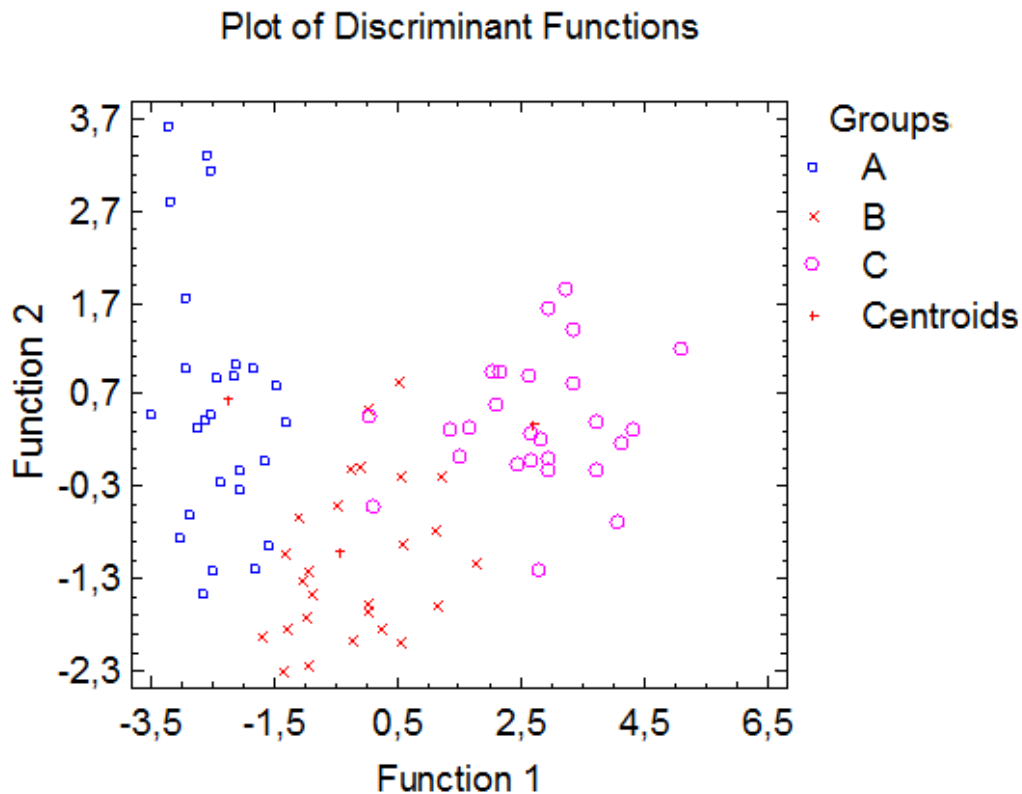
directamente de la presencia de enzimas producidas por microorganismos (bacterias mesófilas y psicrófilas, mohos y levaduras).

El ácido oleico, degradado enzimáticamente, aunque su cambio ha sido significativo con el tiempo del almacenamiento, su variabilidad ha tenido menos impacto, efecto que podría ser explicado por el hecho de que este ácido con un porcentaje más importante dentro del perfil lipídico de los aceites, la reducción que ha tenido aunque significativa no ha influido tanto a nivel del impacto de la variabilidad.

- **Análisis Discriminante (DA)**

El procedimiento de Análisis Discriminante (DA: Discriminant Analysis) ha sido realizado para ayudar a distinguir entre dos o más grupos de datos basados en un conjunto de variables cuantitativas observadas. Esto se ha hecho construyendo funciones discriminantes que son combinaciones lineales de las variables. El objetivo de tal análisis ha sido para describir los casos observados matemáticamente de una manera a fin de separarlos en grupos tan bien como sea posible.

Las 2 funciones discriminantes (Figura III.24) con valores-P menores que 0,05 son estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95,0%.



**Figura III.24.** Funciones discriminantes de los variables estudiados.

La primera función ha separado completamente el grupo A de los otros grupos B y C. La segunda función discriminante podría ayudar un poco a separar los dos grupos B y C. Según las variables estudiadas, los aceites obtenidos de aceitunas almacenadas durante menos tiempo (7 días, Grupo A) han sido significativamente separados de los aceites obtenidos de aceitunas con más tiempo de almacenamiento (15 y 30 días, Grupos B y C respectivamente). Los componentes de los aceites obtenidos de aceitunas almacenadas durante un largo tiempo (más de 7 días) se encontraron altamente alterados.

Claramente, el almacenamiento prolongado de las aceitunas ha tenido un significativo e importante influencia en la calidad de su propio aceite.

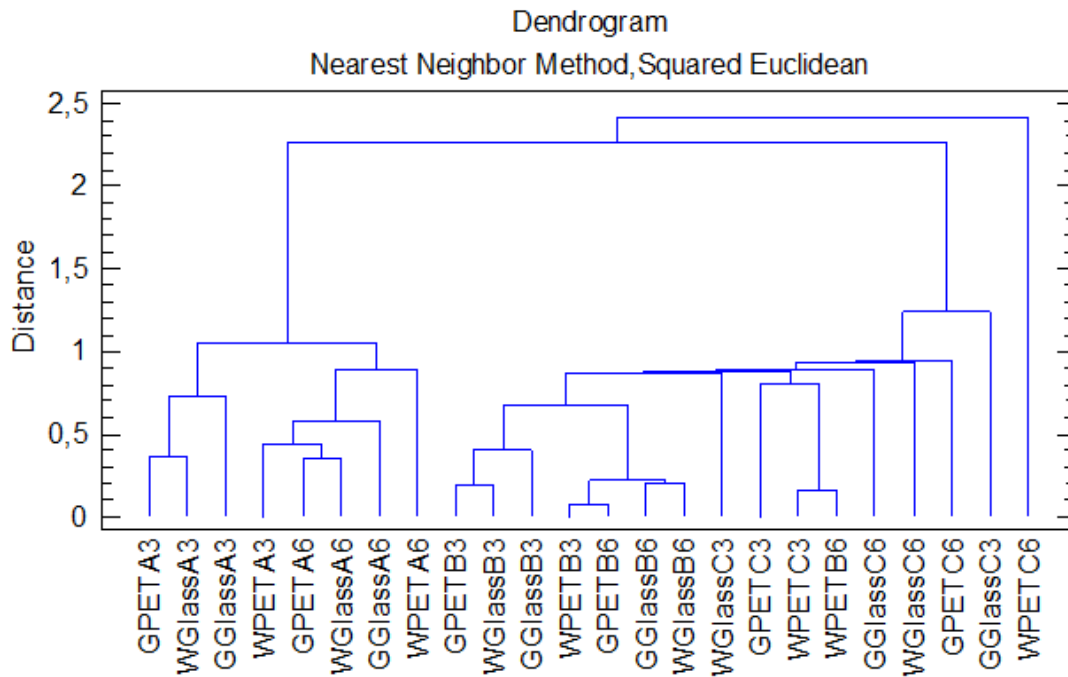
- **Análisis de Conglomerados**

El procedimiento Análisis de Conglomerados (Cluster Analysis: CA) se determinó para agrupar observaciones o variables en conglomerados basados en apariciones entre ellos.

Los n = 24 aceites estudiados: GPETA3, GPETB3, GPETC3, WPETA3, WPETB3, WPETC3, GGlassA3, GGlassB3, GGlassC3, WGlassA3, WGlassB3, WGlassC3, GPETA6, GPETB6, GPETC6, WPETA6, WPETB6, WPETC6, GGlassA6, GGlassB6, GGlassC6, WGlassA6, WGlassB6 y GlassC6, se diferencian según:

- el tipo de almazara: Granito (G) y Madera (W).
- el tipo de envase: Plástico (PET) y Cristal (Glass).
- el tiempo de almacenamiento de las aceitunas: 7 días (A), 15 días (B) y 30 días (C).
- y el tiempo de almacenamiento del aceite: 3 meses (3) y 6 meses (6).

En todos los casos, su conglomeración se determinó usando el método vecino más cercano y la distancia cuadrada Euclidiana (Figura III.25).



**Figura III.25.** Conglomerados de los variables estudiados

En el inicio, cada uno de los 24 aceites forma un conglomerado separado. Los primeros conglomerados unidos fueron aquellos que contenían aceites del grupo B en botellas PET con 3 y 6 meses de almacenamiento y procedentes de las dos almazaras: Granito (G) y Madera (W), en una distancia de aproximadamente 0,1. Después, el aceite del grupo C en PET y con 3 meses de almacenamiento fue unido al conglomerado que contiene los aceites del mismo grupo B con el mismo envase, de 6 meses de almacenamiento y provenientes de la misma almazara (W). En el tercer paso, los aceites del grupo B en cristal y en PET de los 3 meses y de los dos tipos de almazaras fueron unidos en un solo conglomerado, y este mismo conglomerado ha sido unido al conglomerado formado del aceite del grupo B en cristal con 3 meses y procedentes de almazara de granito (G). Este mismo conglomerado ha sido unido al conglomerado del aceite del grupo B en cristal con 6 meses de almacenamiento y de las almazaras G y W, en una distancia de 0,65.



A una distancia aproximadamente de 0,85 este mismo conglomerado formó un conglomerado con los aceites del grupo C procedentes de almazara de madera (W), envasados en cristal y almacenados durante 3 meses. Este mismo conglomerado se ha unido al conglomerado formado de aceites del grupo C envasados en PET, almacenados durante 3 meses y provenientes de almazara de madera (W) y al conglomerado de los aceites de los grupos B y C envasados en PET, almacenados durante 3 y 6 meses y procedentes de almazara de madera (W).

Por su parte, este último conglomerado se ha unido a conglomerados de grupos C de 6 meses envasados en cristal y en PET, y producidos en almazaras de granito y de madera. A una distancia de alrededor de 1,30 el mismo conglomerado se ha unido al conglomerado formado de aceites del grupo C envasado en cristal y producido en almazara de granito.

El conjunto de estos conglomerados constituye un grupo 2 formado de aceites de grupo B y C: GPETB3, WGlassB3, GGlassB3, WPETB3, GPETB6, GGlassB6, WGlassB6, WGlassC3, GPETC3, WPETC3, WPETB6, GGlassC6, WGlassC6, GPETC6 y GGlassC3.

Los aceites de grupos A formaron sus primeros conglomerados a una distancia cercana de 0,35, entre los aceites producidos de los dos tipos de almazaras (G y W), envasados en PET y cristal, almacenados durante 3 meses por el primer conglomerado y 6 meses por el segundo.

Este último se unió a los aceites en PET de 3 meses y procedentes de almazara de madera (W) y formaron un conglomerado con los aceites de 6 meses, envasados en cristal y provenientes de almazara de granito (G). A una distancia de 0,9 se amplió el mismo conglomerado con el aceite de 6 meses, producido en W y envasado en PET y a una distancia de 1,05 se unió a los conglomerados de aceites GPETA3, WGlassA3 y GGlassA3 y formaron el grupo 1: GPETA3, WGlassA3, GGlassA3, WPETA3, GPETA6, WGlassA6, GGlassA6 y WPETA6.

A una distancia de 2,25 se adjuntaron los dos grupos 1 y 2 en un conglomerado, que se unió al aceite de grupo C, de 6 meses, envasado en PET y producido en almazara de madera (W).

Analizando de la izquierda a la derecha del dendrograma, el grupo 1 está formado principalmente por los aceites del grupo A; los aceites almacenados durante 3 meses en primer lugar seguidos de los aceites del mismo grupo almacenados durante 6 meses. Después aparecen los aceites del grupo 2: formado por los aceites de los dos grupos restantes B y C; los del grupo B y particularmente de 3 meses en primer orden, después los de 6 meses del mismo grupo y finalmente más a la derecha, los aceites del grupo C de 3 meses de almacenamiento, seguidos de los aceites del mismo grupo de 6 meses.

La localización de los aceites del grupo B entre los aceites del grupo C (WPETB6) indica que la calidad de este tipo de aceite, según los parámetros estudiados es parecida a los del grupo C. Igual la presencia de los aceite de 3 meses (GGlassC3) entre los del mismo grupo de 6 meses muestra que estos aceites, procedentes de aceitunas que han sido almacenadas durante un largo tiempo (30 días) aunque, solo llevan 3 meses almacenados son similares a los aceites que han sido almacenados durante 6 meses.

En definitiva, el tiempo de almacenamiento de las aceitunas como del aceite ha tenido un papel muy importante en el agrupamiento de los aceites, cuando ha sido usado el método vecino más cercano. El tipo de almazara (granito o madera) como el tipo de envase usado (cristal o PET) ha sido insignificante en la clasificación de estos aceites.

Los resultados han mostrado claramente que el aceite de oliva producido de aceitunas con menos tiempo de almacenamiento (7 días) se encuentra menos afectado o alterado que los aceites obtenidos de aceitunas con más tiempo de almacenamiento (15 y 30 días). El aumento del tiempo de almacenamiento del aceite igual influye negativamente sobre su calidad.

## **IV. CONCLUSIONES**



#### **IV. CONCLUSIONES**

1. El almacenamiento de las aceitunas variedad Pecholine Marroquí en condiciones incontroladas de temperatura y humedad, y en ausencia de unas Guías de Prácticas Correctas de Higiene (GPCH) adecuadas favorece el crecimiento tanto de bacterias mesófilas y psicrotróficas como de mohos y levaduras.
2. La determinación de los principales componentes ha mostrado que las variables cuantitativas con nivel de impacto más alto son las relacionadas con las degradaciones enzimáticas, producidas tanto en las aceitunas como en los aceites, los microorganismos desarrollados en las aceitunas han tenido un gran papel en la alteración de los componentes del aceite.
3. Los parámetros de calidad; acidez, índice de peróxidos y absorbancia en el Ultravioleta han tenido un aumento significativo a lo largo del almacenamiento de los aceites, debido a los procesos de hidrólisis de los triglicéridos y del aumento de oxidación y auto-oxidación favorecidos por el crecimiento microbiano y las condiciones ambientales adversas.
4. El perfil de ácidos grasos analizados, muestra una reducción importante del ratio de ácidos grasos insaturados/ saturados, mayor en los aceites obtenidos de las aceitunas almacenadas durante más tiempo.
5. El contenido de fenoles totales y de la capacidad antioxidante total también han tenido una reducción importante con el almacenamiento, siendo el método DPPH el más idóneo al presentar la correlación más alta con el índice de polifenoles totales.
6. El material de envasado ha tenido influencia significativa en las características de las muestras, siendo el vidrio el más apropiado para la

protección del aceite. Sin embargo, el tipo de almazara (granito y madera) no ha resultado significativo en la valoración de la calidad de estos aceites.

7. La determinación de las funciones discriminantes y el análisis de los conglomerados han mostrado que el tiempo de almacenamiento de las aceitunas ha sido el más importante en la clasificación de las muestras, seguido del tiempo de almacenamiento de los aceites.

8. Finalmente, la producción de aceite de oliva en condiciones incontroladas, ha tenido una influencia negativa en las características y componentes del aceite. Lo que, no solamente conduce a la reducción de sus propiedades saludables si no que también puede perjudicar la salud del consumidor. De hecho, sistemas para garantizar la seguridad alimentaria como los Planes Generales de Higiene (GHPS) y los análisis de Peligro y Puntos de Control Crítico (HACCP), deberían estar regulados y practicados en el sector de almazaras tradicionales en Marruecos.

## **CONCLUSIONS**

1. Storage of olive fruits of Moroccan Pecholine variety in uncontrolled conditions of temperature and humidity, and lack of adequate Guide of Correct Practices of Hygiene (GPCH) favors the growth of mesophilic and psychrotrophic bacteria as moulds and yeasts.
2. Determination of component principles showed that quantitative variables with the highest level of impact were connected with enzymatic degradations, produced in olive fruits as well as in olive oils. The microorganisms that developed in the olive fruits had a big role in the alteration of the olive oil components.
3. Quality parameters; acidity, peroxide index, and Ultraviolet light absorbance had a significant increase during olive oil storage, caused by hydrolysis triglycerides and increase of oxidation and auto-oxidation caused by microbial growth and adverse ambient conditions .
4. The analyzed fatty acid profile showed an important reduction of unsaturated / saturated fatty acid ratio, the most significant reduction was shown in olive oil obtained from olive fruits stored for the longest time.
5. The total phenolic contents and total antioxidant capacity also had an important reduction with storage, the DPPH method was the most suitable, as it, presented the highest correlation with index of total polyphenols.
6. The material of the container had an important influence on the characteristics of samples; glass appears to be the most appropriate for protection of olive oils. However, type of mills (granite or wood) was no significant in the evaluation of quality of these oils.

7. Determination of discriminate functions and Cluster Analysis showed that storage time of olive fruits was the most important in the classification of samples, followed by storage time of olive oils.

8. Finally, production of olive oil in uncontrolled conditions had a negative influence on the characteristics and components of oil. What, they not only lead to the reduction of their healthy properties, but can also damage consumer health. In fact, systems to guarantee food safety such as General Hygiene Principles (GHPs) and Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) would be regulated and practiced in the sector of traditional mills in Morocco.



## **V. BIBLIOGRAFIA**



## **V. BIBLIOGRAFIA**

- Ababio, P. F., Lovatt, P. (2015). A review on food safety and food hygiene studies in Ghana *Food Control*, 47, 92-97.
- Abarca, M. L., Accensi, F., Bragulat, M. R., Castella, G., Cabañes, F. J. (2003). *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin a contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *Journal of Food Protection*, 66, 504–506.
- Abaza, L., Taamalli, W., Ben Temime, S., Daoud, D., Gutierrez, F., Zarrouk, M. (2005). Natural antioxidant composition as correlated to stability of some Tunisian virgin olive oils. *Riv. Ital. Sos. Grasse*, 82, 12–18.
- Adams, C.E. (2002). Hazard analysis and critical control point-original spin. *Food Control*, 13, 355-358.
- Ainsworth, A. E., Gillespie, K. M. (2007). Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocols*, 2, 875–877.
- Al-Kandari, D., Jukes, J. D. (2011). Incorporating HACCP into national food control systems e analyzing progress in the United Arab Emirates. *Food Control*, 22, 851-861.
- Almenier, H.A., Al Menshawy, H.H., Maher, M.M., Al Gamal, S. (2012). Oxidativestress and inflammatory bowel disease. *Front Biosci (Elite Ed)*. 4, 1335-44.
- Alves, M., Gonçalves, T., Quintas, C. (2012). Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives' Fermentations. *Food Control*, 23, 363-368.

- Amaral, J.S., Mafra, I., Oliveira, M. B. P.P., (2010). Characterization of Three Portuguese Varietal Olive Oils Based on Fatty Acids, Triacylglycerols, Phytosterols and Vitamin E Profiles: Application of Chemometrics. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. ISBN: 978-0-12-374420-3. PP: 581-589. Porto, Portugal.
- Amiot, M.J., Fleuriet, A., Macchie, J.J. (1989). Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation. *Phytochemistry*, 28, 67– 69.
- Amirante, P., Clodoveo, M. L., Tamborrino, A., Leone, A., Paice, A.G. (2010). Influence of the Crushing System: Phenol Content in Virgin Olive Oil Produced from Whole and De-stoned Pastes. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. ISBN: 978-0-12-374420-3. pp: 69-76.
- Amirante, P., Clodoveo, M. L., Leone, A., Tamborrino, A. (2012b). A new designer malaxer to improve thermal exchange enhancing virgin olive oil quality. *Acta Horticulturae*, 949, 455-462.
- Anastasiadi, M., Pratsinis, H., Kletsas, D., Skaltsounis, A., Haroutounian, S. (2010). Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evolution of the antioxidant activities of their extracts. *Food Research International*, 43, 805-813.
- Andrews, P., Bush, J. L. H. C., Joode, T. d., Groenewegen, A., Alexandre, H. (2003). Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: identification of deacetoxyligstroside aglycon as a key contributor to pungency. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 1415–1420.
- Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R. (2001). Influence of malaxation temperature and time on the quality of virgin olive oils. *Food Chemistry*, 72, 19–28.

- Angerosa, F., d'Alessandro, N., Konstantinou, P., Di Giacinto, L. (1995). GC–MS evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1802– 1807.
- Angerosa, F., Mostallino, R., Basti, C., Vito, R. (2000). Virgin olive oil odour notes: Their relationships with volatile compounds from the lipoxygenase pathway and secoiridoid compounds. *Food Chemistry*, 68, 283–287.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., Mcdonald, S., Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.*, 127, 183-198.
- Anwar, P., Bendini, A., Gulfranz, M., Qureshi, R., Valli, E., Di Lecce, G., Saqlan Naqvi, S.M., Toschi, T. (2013). characterization of olive oils obtained from wild olive trees (*Olea ferruginea* Royle) in Pakistan. *Food Research International*, 54, 1965–1971.
- Arana Molina, C. (2006). Melatonina, estrés oxidativo y osteointegración en la cavidad oral. Editor: Editorial de la Universidad de Granada Autor: Carlos Arana Molina. D. L.: Gr. 2165-20056. ISBN: 84-338-4141-6.
- Arena, E., Fallico, B., Maccarone, E. (2001). Evolución of antioxidant capacity of blood orange juices as influenced by constituents, concentration process and storage. *Food Chem.*, 74, 423-427, 2001.
- Arnao, M. B., Cano, A., Acosta, M. (2001a). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73, 239-244.
- Arnao, M. B., Cano, A., Acosta, M. (1998). Total antioxidant activity in plant material and its interest in food technology. *Recent Res. Devel. In Agricultural Food Chem.* 2, 893- 905.
- Arnao, M. B (2000). Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. *Trends Food Sci. Technol.*, 11, 419-421.

- Arroyo-López, F. N., Durán Quintana, M. C., Ruiz Barba, J. L., Querol, A., Garrido Fernández, A., (2006). Use of molecular methods for the identification of yeasts associated with table olives. *Food Microbiol* 23, 791-796.
- Arroyo-López, F. N., Querol, A., Bautista-Gallego, J., Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 189-196.
- Artajo, L.M., Romero, M. P., Tovar, M. J., Motilva, M. J. (2006). Effect of irrigation applied to olive trees (*Olea europaea* L.) on phenolic compound transfer during olive oil extraction. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 108, 19–27.
- Asehraou, A., Faid, M., Jana, M. (1992). Physico-chemical properties and the microflora of Moroccan table black olives. *Grasas y Aceites*, 43, 130–133.
- Assad S.F., Singh S., Ahmad A., Khan N., Hadi S.Y. (2001). Prooxidant and antioxidant activities of bilirubin and its metabolic precursor biliverdin: a structure-activity study. *Chemic-Biological Interactions*, 37, 59-74.
- Aubourg, S. P. (2001). Fluorescence study of the pro-oxidant effect of free fatty acids on marine lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81, 385–390.
- Baccouri, B., Ben Temime, S., Taamalli, W., Daoud, D., M'sallem, M., Zarrouk, M. (2007). Analytical characteristics of virgin olive oils from two new varieties obtained by controlled crossing on Meski variety. *J. Food Lipids*, 14, 19–34.
- Baiano, A., Gambacorta, G., Terrcone, C., Previtali, M. A., Lamacchia, C., La Notte, E. (2009). Changes in phenolic content and antioxidant activity of Italian extra-virgin olive oils during storage. *Journal of Food Science*, 74, 177–183.

- Bartolini, G., Petruccelli, R. (2002). Classification, Origin, Diffusion and History of the Olive, Food and Agriculture Organization of the United Nations, pp. 2-143, Rome, Italy.
- Battimelli, A., Torrijos, M., Moletta, R., Delgenès, J.P. (2010). Slaughterhouse fatty waste saponification to increase biogas yield. *Bioresour. Technol.*, 101, 3388–3393.
- Bandoniene, D., Murkovic, M. (2002). On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.). *J. Agric. Food Chem.* 50, 2482–2487.
- Barranco, D., Cimato, A., Florino, P., Rallo, L., Touzani, A., Castañeda, C., Sefarini, F., Trujillo, I. (2001). “Catálogo mundial de variedades de olivo”. Ed. Consejo Oleícola Internacional.
- Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Querol, A., Garrido-Fernández, A., Arroyo-López, F.N. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, 147, 89–96.
- Beardsell, D., Francis, J., Ridley, D., Robards, K. (2002). “Health promoting constituents in plants derived edibles oils”. *J. Food Lipids*, 9, 1-34.
- Becker, P. (2010). Understanding and Optimizing the Microbial Degradation of Olive Oil: A Case Study with the Thermophilic Bacterium *Geobacillus thermoleovorans* IHI-91 Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention. ISBN: 978-0-12-374420-3 P: 377-386 Måløv, Denmark.
- Belhaj-Ben Romdhane, I., Fendri, A., Gargouri, Y., Gargouri, A., Belghith, H. (2010). A novel thermoactive and alkaline lipase from *Talaromyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. *Biochemical Engineering Journal*, 53, 112–120.

- Beltrán, G., Aguilera, M.P., Del Rio, C., Saínchez, S., Martínez, L., 2005. Influence of fruit ripening process on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chemistry*, 89, 207–215.
- Beltrán, G., Ruano, M.T., Jiménez, A., Uceda, M., Aguilera, M.P. (2007). Evaluation of virgin olive oil bitterness by total phenol content analysis. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*, 109, 193-197.
- Beltran, B., Nos, P., Dasi, F., Iborra, M., Bastida, G., Martínez, M., O'Connor, J.E., Saez, G., Moret, I., Ponce, J. (2010). Mitochondrial dysfunction, persistent oxidative damage, and catalase inhibition in immune cells of naive and treated Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*, 16, 76–86.
- Bendini, A., Cerretani, L., Salvador, M.D., Fregapane, G., Lercker, G. (2010). Stability of the sensory quality of virgin olive oil during storage: An overview. *Italian Food & Beverage Technology*, LX, 5–18.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Lercker, G. (2007). Phenolic molecules in virgin olive oils: a survey of their sensory properties, health effects, antioxidant activity and analytical methods. An overview of the last decade. *Molecules*, 12, 1679-1719.
- Bennett, J. W., Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497–516.
- Ben-Hassine, K., Taamalli, A., Ferchichi, S., Mlaouah, A., Benincasa, C., Romano, E., Flamini, G., Lazzez, A., Grati-kamoun, N., Perri E., Malouche D., Hammami, M. (2013). Physicochemical and sensory characteristics of virgin olive oils in relation to cultivar, extraction system and storage conditions *Food Research International*, 54, 1915–1925.



- Ben Temime, S., Taamalli, W., Baccouri, B., Abaza, L., Daoud, D., Zarrouk, M. (2006). Changes in olive oil quality of Chetoui variety according to origin of plantation. *J. Food Lipids*, 13, 88–99.
- Bentiger, N., Brismark, K., Dallner, G. (2007). The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, 7, 541-550.
- Benzie, I.F.F., Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “Antioxidant power”: the frap assay. *Analytical Biochemistry*. 239, 70-76.
- Bernard, D., Quatannens, B., Begue, A., Vandebunder, B., Abbadie, C. (2001). Antiproliferative and antiapoptotic effects of cRelmay occur within the same cells via the up-regulation of man-ganese superoxide dismutase. *Cancer Res*, 61, 2656-64.
- Bilancia, M. T., Caponio, F., Sikorska, E., Pasqualone, A., Summo, C. (2007). Correlation of triacylglycerol oligopolymers and oxidised triacylglycerols to quality parameters in extra virgin olive oil during storage. *Food Research International*, 40, 855-861.
- Bogani, P., Galli, C., Villa, M., Visioli, F. (2007). Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis*, 190,181-186.
- Boskou, D. (1996). *Olive oil. Chemistry and Tecnology*. USA: AOCS Press.
- Boskou, D., Blekas, G., Tsimidou, M. (2006). Olive oil composition. Dans D. Boskou (Ed.), *Olive oil, chemistry and technology* (2nd edition). Champaign Illinois: American oil chemists society.USA. pp 41-72.
- Botía, J., Ortuno, M.A., Benavente-Garcia, O., Ba`idez, A.G., Frías, J., Marcos, D., Del Rió, J.A. (2001). Modulation of the biosynthesis of some phenolic

compounds in *Olea europea* L. fruits: their influence on olive oil quality. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 355– 358.

Bouaziz, M., Grayer, R.J., Simmonds, M., Damak, M., Sayadi, S. (2005). Identification and Antioxidant Potential of Flavonoids and Low Molecular Weight Phenols in Olive Cultivar Chemlali Growing in Tunisia. *J. Agric. Food Chem.* 53, 236-241.

Bramley, P.P., Elmadfa, I., Kafatos, A., Kelly, F.J., Manios, Y., Roxborough, H.E., Schuch, W., Sheehy, P.J.A., Wagner, K. (2000). Vitamin E. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 913–938.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.- Wiss. Technol.*, 28, 25-30.

Brenes, M., Hidalgo, F. J., Garcia, A., Rios, J. J., Garcia, P., Zamora, R. Garrido, A. (2000). Pinoresinol and 1-acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of American oil Chemist's Society*, 77, 715-720.

Breton, C., Pinate, I.C., Médail, F., Bonhomme, F., Bervillé, A. (2008). Comparison between classical and Bayesian methods to investigate the history of olive cultivars using SSR-polymorphisms, *Plant Sci.* 175 524 doi:10.1016/j.plantsci.2008.05.025.

Briante, R., Patumi, M., Febbraio, F., Nucci, R. (2004). Production of highly purified hydroxytyrosol from *Olea europaea* leaf extract biotransformed by hyperthermophilic  $\beta$ -glycosidase. *Journal of Biotechnology*, 111, 67–77.

Britton, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. (2008). *Carotenoids: Natural Functions*. Birkhauser.

- Brook, R. D., Franklin, B., Cascio, W., Hong, Y., Howard, G., Lipsett, M., Luepker, R., Mittleman, M., Samet, J., Tager, I. (2004). Air pollution and cardiovascular disease. A statement for healthcare professionals from the expert panel on population and prevention science of the American Heart Association. *Circulation*, 109, 2655-2671.
- Bubonja-Sonje, M., Giacometti, J., Abram, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial activity of olive oil, cocoa and rosemary extract polyphenols. *Food Chemistry*, 127, 1821–1827.
- Bucci, T., Howard, P., Tolleson, W., Laborde, J., Hansen, D. (1998). Renal effects of fumonisin mycotoxins in animals. *Toxicol. Pathol.* 26,190–194.
- Buchanan, R.L. (1995). The role of microbiological criteria and risk assessment in HACCP. *Food Microbiology*, 12, 421-424.
- Burlingame, B., Pineiro, M. (2007). The essential balance: risks and benefits in food safety and quality. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 139-146.
- (CAC), Codex Alimentarius Commission (2003). Recommended international code of practice: General principles of food hygiene. CAC/RPP 1-1969, Revision 4.
- Cano, A., Hernández-Ruiz, J., García-Cánovas, F., Acosta, M., Arnao, M.B. (1998a). An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochemical Analysis*, 9, 196–202.
- Cao, G., Prior, R.L. (1998). Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry*, 44, 1309- 1315.
- Cao, G., Prior, R.L. (1999). Measurement of Oxygen Radical Absorbance Capacity in biological samples. *Methods in enzymology*, vol 299, cap 5, 50-60.

- Carluccio, M.A., Massaro, M., Scoditti, E., De Caterina, R. (2007). Vasculoprotective potential of olive oil components. *Mol. Nutr. Food Res*, 51, 1225–1234.
- Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2006). Rapid quantification of the phenol fraction of Spanish virgin olive oils by capillary electrophoresis with uv detection. *J. Agric. Food Chem*, 54, 7984–7991.
- Carrasco Pancorbo. A (2006). Determinación de compuestos fenólicos en aceite de oliva mediante técnicas y metodologías separativas avanzadas. D.L.: Gr.2062-2006. ISBN: 978-84-338-4127-8. Editorial de la Universidad de Granada.
- Carrillo Fernández, L., Dalmau Serra, J., Martínez Álvarez, J.R., Solà Alberichd, R., Pérez Jiménez, F. (2011). Grasas de la dieta y salud cardiovascular *Clin Invest Arterioscl*. 23, 1-36
- Carvalho, A.P., Meireles, L.A., Malcata, F.X. (2006). Microalgal reactors: a review of enclosed system designs and performances. *Biotechnol Prog* 2006, 22,1490–506.
- (CE, 2005), Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de 15 de noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE) (DOL 338 de 22 de diciembre de 2005).
- (CE, 2004), Reglamento (CE) N° 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 2004 relativo a la higiene de los productos alimenticios (DOL 139 de 29 de abril de 2004).
- CECAM, Castilla-La Mancha, (2009). Manual de aplicación del sistema APPCC en industrias lácticas de Castilla-Lamancha. Junta de Comunidades de

Castilla-La Mancha y CECAM. Depósito Legal: TO-686-2009. ISBN nº 978-84-7788-546-7.

Chaves, B.D., Brashears, M.M. (2014). Prevalence of molecular markers for Salmonella and Shiga toxigenic Escherichia coli (STEC) in whole-muscle beef cuts sold at retail markets in Costa Rica, Food Control, doi: 10.1016/j.foodcont.2014.09.024.

Cheeseman, K.H., Slater, T.F. (1993). An introduction to free radical biochemistry. Br Med Bull, 49, 588-603.

Chimi, (2001). Qualité des huiles d'olive au Maroc, Transfer de Technologie en Agriculture, BULLETIN MENSUEL D'INFORMATION ET DE LIAISON DU PNTTA, N° 79, Abril 2001.

Choe, E. (2008). Effects and mechanisms of minor compounds in oil on lipid oxidation. In C. C. Akoh, D. B. Min (Eds.), Food lipids chemistry, nutrition, and biotechnology .P: 449–474. Boca Raton, FL: CRC Press.

Christodouleas, D.C., Giokas, D.L., Garyfali, V., Papadopoulos, K., Calokerinos, A. C. (2015). An automatic FIA-CL method for the determination of antioxidant activity of edible oils based on peroxyoxalate hemiluminescence. Microchemical Journal, 118, 73–79.

Cerretani, L., Salvador, M.D., Bendini, A., Fregapane, G. (2008). Relationship between sensory evaluation performed by Italian and Spanish official panels and volatile and phenolic profiles of virgin olive oils. Chemosensory Perception, 1, 258-267.

Cerretani, L., Bendini, A. (2010). Rapid Assays to Evaluate the Antioxidant Capacity of Phenols in Virgin Olive Oil. Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention. ISBN: 978-0-12-374420-3. Bologna Cesena, Italy.

- Ceci, L. N., Carelli, A. A. (2010). Relation between oxidative stability and composition in Argentinian olive oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 87, 1189–1197.
- Ciafardini, G., Marsilio, V., Lanza, B., Pozzi, N. (1994). Hydrolysis of oleuropein by *Lactobacillus plantarum* strains associated with olive fermentation. *Appl. Environ. Microbiol*, 60, 4142- 4147.
- Ciafardini, G., Zullo, B.A. (2002). Microbiological activity in stored olive oil. *International Journal of Food Microbiology*, 75, 111 –118
- Ciafardini, G., Zullo, B.A. (2000).  $\beta$ -Glucosidase activity in olive brine during the microbiological debittering process. *Adv. Food Sci. (CMTL)*, 22, 69– 76.
- Ciafardini, G., Cioccia, G., Peca, G., Zullo, B.A., (2004). Transfer of selected yeasts to oil through olive inoculation. *Italian J. Food Sci.* 1, 1–7.
- Ciafardini, G., Zullo, B.A., Iride, A. (2006). Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. *Food Microbiol*, 23, 60-67.
- Ciafardini, G., Zullo, B.A., Cioccia, G., Iride, A. (2006a). Lipolytic activity of *Williopsis californica* and *Saccharomyces cerevisiae* in extra virgin olive oil. *Int.J.Food Microbiol*, 10, 27-32.
- Cicerale, S., Conlan, X.A., Barnett, N.W., Keast, R.S.J. (2011). Storage of extra virgin olive oil and its effect on the biological activity and concentration of oleocanthal, *Food Research International*, FRIN-03636; P: 6, Victoria, Australia.
- Cicerale, S., Conlan, X.A., Sinclair, A.J., Keast, R.S. (2009). Chemistry and health of olive oil phenolics. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 49, 218-236.

- Cintra, R.M.G., Mancini-Filho, J. (2001). Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos in vitro e in vivo. *Nutrire*, 22, 49-62, 2001.
- Cioffi, G., Pesca, M.S., De Caprariis. P., Braca, A., Severino, L., De Tommasi, N. (2010). Phenolic compounds in olive oil and olive pomace from Cilento (Campania, Italy) and their antioxidant activity. *Food Chem*, 121, 05-111.
- Cirne, D.G., Paloumet, X., Bjornsson, L., Alves, M.M., Mattiasson, B. (2007). Anaerobic digestion of lipid-rich waste –effects of lipid concentration. *Renewable Energy*, 32, 965–975.
- Clodoveo, M. L., Durante, V., La Notte, D. (2013). Working towards the development of innovative ultrasound equipment for the extraction of virgin olive oil. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1261–1270.
- (COA), Codex Alimentarius Commission (2003), Food Hygiene Basic Texts, 3rd ed. Conseil oleicole international (COI) (novembre 2013) <http://www.internationaloliveoil.org>
- Codex (Codex Alimentarius Commission). (2009). Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods. <http://www.codexalimentarius.org/standards/list-of-standards/>
- Colakoglu, A. (2007). Oxidation kinetics of soybean oil in the presence of monoolein, stearic acid and iron. *Food Chemistry*, 101, 724–728.
- Concha-Herrera, V., Lerma-García, M. J., Herrero-Martínez, J. M., Simó-Alfonso, E. F. (2010). Classification of vegetable oils according to their botanical origin using amino acid profiles established by high performance liquid chromatography with UV–vis detection: A first approach. *Food Chemistry*, 120, 1149–1154.

- Conkova, E., Laciakova, A., Kovac, G., Seidel, H. (2003). Fusarial toxins and their role in animal diseases. *Vet. J.* 165:214–220.
- (COI) Conseil Oléicole International (2008). Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive. 3 Novembre 2008. COI/T.15/NC n° 3/Rév.
- (COI) Consejo Oleícola International ( 2006). Guía de Gestión de la Calidad de la Industria del Aceite de Oliva: Las almazaras. .33/Doc. n° 2-4. 2006. [iooc@internationaloliveoil.org](mailto:iooc@internationaloliveoil.org) - <http://www.internationaloliveoil.org/>
- (COI) Conseil Oléicole International (2012). Politiques – Maroc. 2012. Retrieved from <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/130-survey-and-assessment-division>.
- (COI) Conseil Oléicole International (2013a). Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive. 7 mai 2013. COI/T.15/NC n° 3/Rév.
- (COI) Conseil Oléicole International (2013b). Cifras del mercado mundial de aceite de oliva. Novembre 2013. [http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures?lang=es\\_ES](http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures?lang=es_ES)
- Consejería de salud (2007). Documento orientativo de especificaciones de los sistemas de autocontrol. Junta de Andalucía.
- Consejería de Salud (2003). Documento orientativo de especificaciones de Sistemas de autocontrol. Junta de Andalucía.
- Contesini, F. J., Lopes, D. B., Macedo, G. A., Nascimento, M. G., Carvalho, P. O. (2010). *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67, 163–171.



- Corona, G., Spencer, J., Dessi, M. (2009). Extra virgin olive oil phenolics: absorption, metabolism, and biological activities in the GI tract. *Toxicol Ind Health*, 25:285-293.
- Corral-Aguayo, R.D., Yahia, E.M., Carrillo-lópez, A., González-Aguilar, G. (2008). Correlation between Some Nutritional Components and the Total Antioxidant Capacity Measured with Six Different Assays in Eight Horticultural Crops. *J. Agric. Food Chem.*5, 10498-10504.
- Costas, M., Deive, F.J., Longo, M.A. (2004). Lipolytic activity in submerged cultures of *Issatchenkia orientalis*. *Process Biochem*, 39, 2109–2114.
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., Sohier, D. (2006). Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 130–135.
- Covas, M.I., Nyyssonen, K., Poulsen, H.E., Kaikkonen, J., Zunft, H.J., Kiesewetter, H., Gaddi, A., de la Torre, R., Mursu, J., Baumler, H. et al. (2006). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*, 145,333-341.
- Covas, M. I. (2007). Olive oil and the cardiovascular system. *Pharmacological Research*, 55, 175–186.
- Dabbou, S., Chehab, H., Brahmi, F., Dabbou, S., Esposto, S., Selvaggini, R., Taticchi, A., Servili, M., Montedoro, G. F., Hammami, M., (2010). Effect of three irrigation regimes on Arbequina olive oil produced under Tunisian growing conditions. *Agricultural Water Management*, 97, 763–768.
- Dabbou, S., Gharbi, I., Dabbou, S., Brahmi, F., Nakbi, A. (2011). Impact of packaging material and storage time on olive oil quality. *African Journal of Biotechnology*, 10, 16937–16947.

- Dag, A., Ben-David, E.A., Fiume, P., Perri, E. (2009). Cultivation: Problems and Perspectives, Sixth Framework Programme Priority 5; Food Quality and Safety Priority, Call 4-C; MAC-oils. The Scientific Handbook, PP: 1–55. Avellino, Italy.
- Dag, A., Kerem, Z., Yogev, N., Zipori, I., Lavee, S., Ben-David, E. (2011). Influence of time of harvest and maturity index on olive oil yield and quality. *Scientia Horticulturae*, 127, 358–366.
- Dagdelen, A., Tumen, G., Ozcan, M. M., Dundar, E. (2013). Phenolics profiles of olive fruits (*Olea europaea* L.) and oils from Ayvalık, Domat and Gemlik varieties at different ripening stages. *Food Chemistry*, 136, 41–45.
- Davies, K.J.A. (1987). Protein damage and degradation by oxygen radicals. General aspects. *J Biol Chem*, 262, 9895-9901.
- De Bernardis, F., Morelli, L., Ceddia, T., Lorenzini, R., Cassone, A. (1990). Experimental pathogenicity and acid proteinase secretion of vaginal isolates of *Candida parapsilosis*. *Med.Vet.Mycol.* 28, 125–137.
- Decker, E. A., McClements, D. J. (2008). Lipids. In S. Damodaran, K. L. Parkin, O. R. Fennema (Eds.), *Fennema's Food Chemistry*, 4th ed. (pp. 155–216). Boca Raton, FL: CRC Press.
- De Gaulejac, S.C., Provost, C., Vivas, N. (1999). Comparative study of polyphenol scavenging activities assessed by different methods. *J. Agric. Food Chem.* 47, 425- 431.
- De Grey, A.D.N.J. (2002). HO<sub>2</sub>: The forgotten radical. *DNA Cell Biol.* 21, 251-257.
- Dehesa Santisteban, F.L. (2012). *Tecnología Alimentaria y Salud Humana. El Caso de la Leche y los Productos Lácteos. La Industria Alimentaria como Estrategia Sanitaria. Producciones Artesanales y Seguridad Alimentaria*

(Discurso de entrada del doctor Francisco Luis Dehesa Santisteban con ocasión de su ingreso en la Real Academia de Medicina del País Vasco en sesión celebrada el 14 de febrero de 2011). *Gac Med Bilbao*. 109, 79-88.

De la Torre-Carbot, K., Chavez-Servin, J.L., Jauregui, O., Castellote, A.I., Lamuela-Raventos, R.M., Fito, M., Covas, M.I., Munoz-Aguayo, D., Lopez-Sabater, M.C. (2007). Presence of virgin olive oil phenolic metabolites in human low density lipoprotein fraction: determination by high-performance liquid chromatography– electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta*, 583, 402-410.

De la Torre-Carbot, K., Chavez-Servin, J.L., Jauregui, O., Castellote, A.I., Lamuela-Raventos, R.M., Nurmi, T., Poulsen, H.E., Gaddi, A.V., Kaikkonen, J., Zunft, H.F. et al. (2010). Elevated circulating LDL phenol levels in men who consumed virgin rather than refined olive oil are associated with less oxidation of plasma LDL. *J Nutr*, 140,501-508.

Dell'Agli, M., Fagnani, R., Galli, G.V., Maschi, O., Gilardi, F., Bellostà, S., Crestani, M., Bosisio, E., De Fabiani, E., Caruso, D. (2010). Olive oil phenols modulate the expression of metalloproteinase 9 in THP-1 cells by acting on nuclear factor- $\kappa$ B signaling. *J Agric Food Chem*, 58, 2246-2252.

Del Rio, L.A., Sandalio, L.M., Palma, J.M., Bueno, P., Corpas, F.J. (1992). Metabolism of oxygen radicals in peroxisomes and cellular implications. *Free Radic Biol Med*, 13, 557-80.

Desbois, A., Smith, V. (2010). Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 85, 1629–1642.

Dincer, Y., Erzin, Y., Himmetoglu, S., Gunes, K.N., Bal, K., Akcay, T. (2007). Oxidative DNA damage and antioxidant activity in patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 52, 1636-41.

- Diplock, A.T., Charleux, J.L., Crozier, G., Kok, F.J., Rice-Evans, C.A., Roberfroid, M., Stahl, W., Viña-Ribes, J. (1998). Functional food science and defence against reactive oxidative species. *British J. Nutr.* 80, S77-S112.
- DiRusso, C.C., Black, P.N. (1999). Long-chain fatty acid transport in bacteria and yeast. Paradigms for defining the mechanism underlying this protein mediated process. *Mol. Cell. Biochem.* 192, 41–52.
- D'Odorico, A., Bortolan, S., Cardin, R., D'Inca', R., Martines, D., Ferronato, A., Sturniolo, G.C. (2001). Reduced plasma antioxidant concentrations and increased oxidative DNA damage in inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 36, 1289-94.
- Doménech, Escriche, I., Martorell, S. (2008). Assessing the effectiveness of critical control points to guarantee food safety. *Food Control*, 19, 557-565.
- Dorman, H.J.D., Shikova, A.N., Pozharitskaya, O.N., Hiltune, R. (2011). Antioxidant and pro-oxidant evaluation of a *Potentilla alba* L. rhizome extract. *Chemistry and Biodiversity.* 8, 1344-1356.
- Droge, W. (2002). Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. *Physiol. Rev.* 82, 47-95.
- Eaton, D. L., Gallagher, E. P. (1994). Mechanisms of aflatoxins carcinogenesis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 34, 135–172.
- Egan, M.B., Raats, M.M., Grubb, S.M., Eves, A., Lumbers, M.L., Dean, M.S., Adams, M.R. (2007). A review of food safety and food hygiene training studies in the commercial sector. *Food Control*, 18, 1180-1190.
- Ehiri, J. E., Morris, G. P., McEwen, J. (1995). Implementation of HACCP in food businesses: the way ahead. *Food Control*, 6, 341-345.

- El Adlouni, C., Tozlovanu, M., Naman, F., Faid, M., Pfohl-Leszkowicz, A. (2006). Preliminary data on the presence of mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B1) in black table olives “Greek style” of Moroccan origin. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 507–512.
- El haouhay, N., Araceli, Bijkdaouen, L., Tapias, V., López, L.C., Rivas, I., Escames, G., Granados, M.J., Acuña-Castroviejo, D. (2003). Oxidative stress in human aging. 1<sup>st</sup> Luso-Spanish Congress on Free Radicals. 6<sup>th</sup> Portuguese Congress on Free Radicals in Chemistry, Biology and Medicine. December 4-6 2003, Coimbra, Portugal. Communication Poster. Book of Abstracts, p: 87.
- El haouhay, N., Samaniego-Sánchez, C., Asehrou, A., Villalón-Mir, M., López-García de la Serrana, H. (2014). Microbiological characterization of Picholine variety olives and analysis of olive oil produced in traditional oil mills in Morocco *CyTA – Journal of Food*, 2014 no: 918178, 1–9, <http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2014.918178>
- Elnagar, A.Y., Sylvester, P.W., El Sayed, K.A. (2011). Oleocanthal as a c-Met inhibitor for the control of metastatic breast and prostate cancers. *Planta Medica*, doi:10.1055/ s-0030-1270724.
- Eltem, R. (1996). Growth and aflatoxin B1 production on olives and olive paste by moulds isolated from ‘Turkish-style’ natural black olives in brine. *International Journal of Food Microbiology*, 32, 217-223.
- Ergönül, B. (2013). Consumer awareness and perception to food safety: a consumer analysis. *Food Control* 32 (2), 461-471.
- Ertugrul, S., Donmez, G., Takac, S. (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *J. Hazard Mater*, 149, 720-4.

- Essiari, M., Zouhair, R., Chimi, H. (2014). Contribución al estudio de la tipicidad de los aceites de oliva vírgenes producidos en la región de Sais (Marruecos). OLIVÆ No. 119 – Revista Oficial del Consejo Oleícola Internacional [www.internationaloliveoil.org](http://www.internationaloliveoil.org).
- Estruch, R., Martínez-González, M.A, Corella, D., Salas-Salvadó, J., Ruiz-Gutiérrez, V., Covas. M.I., Fiol, M., Gómez-Gracia, E., López-Sabater, M.C., Vinyoles, E., Arós, F., Conde, M., Lahoz, C., Lapetra, J., Sáez, G., Ros, E. (2006). Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*, 145,1-11.
- Eves, A., Dervisi, P. (2005). Experiences of the implementation and operation of hazard analysis critical control points in the food service sector. *Hospitality Management*, 24, 13-19.
- Faccio, E., Costa, N., Losasso, C., Cappa, V., Mantovani, C., Cibin, V., Andrighetto, I., Ricci, Antonia. (2013) What programs work to promote health for children? Exploring beliefs on microorganisms and on food safety control behavior in primary schools. *Food Control*, 33, 320-329.
- Fadil, K., Chahlaouia, A., Ouahbib, A., Zaida, A., Borja, R. (2003). Aerobic biodegradation and detoxification of wastewaters from the olive oil industry. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 51, 37–41.
- Falguera, V., Pagan, J., Ibarz, A. (2010). A kinetic model describing melanin formation by means of mushroom tyrosinase. *Food Research International*, 43, 66–69.
- FAO. (1997). Hazard analysis and critical control point (HACCP) system guidelines for its application. CAC/RCP 1e1969, Rev 3.
- FAO, WHO. (2006). FAO/WHO guidance to governments on the application of HACCP in small and/or less-developed food businesses. *FAO Food and Nutrition paper*, no. 86. ISSN 0254-4725, p. 53-55.

[http://www.who.int/foodsafety/publications/fs\\_management/HACCP\\_SLDB.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/HACCP_SLDB.pdf).

- FAO/WHO. (2009). CODEX ALIMENTARIUS and Food hygiene basic texts (4th ed.). Rome: FAO/WHO.
- Fennema, O.R. (2000). Química de los alimentos. ISBN8420009148, 9788420009148 N° P: 1258 página .Acribia. Espana.
- Fernandez-Orozco, R., Roca, M., Gandul-Rojas, B., Gallardo-Guerrero, L. (2011). DPPH-scavenging capacity of chloroplastic pigments and phenolic compounds of olive fruits (cv. Arbequina) during ripening. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 858–864.
- Finley, J.W., Kong, A., Hintze, K. J., Jeffery, E. H., Ji, L.L., Lei, X. G. (2011). Antioxidants in foods: state of the science Important to the food Industry. *J. Agric. Food Chem*, 59, 6837-6846.
- Fitó, M., Cladellas, M., De la Torre, R., Martí, J., Alcántar, M., Pujadas-Bastardes, M., Marrugat, J., Bruguera, J., López-Sabater, M.C., Vila, J., Covas, M.I. (2005). Antioxidant effect of virgin olive oil in patients with stable coronary heart disease: a randomized, crossover, controlled, clinical trial. *Atherosclerosis*, 181, 149–158.
- Fitó, M., De la Torre, R., Farré-Albalaedejo, M., Khymenetz, O., Marrugat, J., Covas, M.I. (2007). Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Amm. Ist. Super. Sanita*. 43, 375–381.
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1035-1040.

- (FPA). Food Product Association (2006). HACCP: A systemic approach to food safety. Washington, D.C.: FPA.
- Franco, M.N., Galeano-Díaz, T., López, Ó., Fernández-Bolaños, J.G., Sánchez, J., De Miguel, C., Gil, M.V., Martín-Vertedor, D. (2014). Phenolic compounds and antioxidant capacity of virgin olive oil. *Food Chemistry*, 163, 289–298.
- Frankel, E.N. (1985). Chemistry of autoxidation: mechanism, products and flavor significance. In: Min, D.B., Smouse, T.H. (eds) *Flavor Chemistry of Fats and Oils*. AOCS Press, Champaign, IL (USA), pp. 1–37.
- Fridovich, I. (1989). Superoxide dismutases: an adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem*, 264, 7761-4.
- Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*, 201, 875-880.
- Gallus, S., Bosetti, C., La Vecchia, C. (2004). Mediterranean diet and cancer risk. *Eur J Cancer Prev*. 13, 447- 452.
- García, A., Brenes, M., García, P., Romero, C., Garrido, A. (2003). Phenolic content of commercial olive oils. *European Food Research and Technology*, 216, 520-525.
- García, A., Brenes, M., Martínez, F., Alba, J., García, P., Garrido, A. (2001). HPLC evaluation of phenols in virgin olive oil during extraction at laboratory and industrial scale. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 625–629.
- García, J. M., Sellar, S., Pérez-Camino, M. C. (1996). Influence of fruit ripening on olive oil quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44, 3516-3520.



- García-González, D. L., Tena, N., Aparicio, R. (2010). Quality characterization of the new virgin olive oil Var. Sikitita by phenols and volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 8357–8364.
- García-Mesa, J. A., Pereira-Caro, G., Fernández-Hernández, A., García-Ortíz Civantos, C., Mateos, R. (2008). Influence of lipid matrix in the bitterness perception of virgin olive oil. *Food Quality and Preference*, 19, 421–430.
- García-Inzaa, G.P., Castroa, D.N., Hallb, A.J., Rousseauxa, M.C. (2014). Responses to temperature of fruit dry weight, oil concentration, and oil fatty acid composition in olive (*Olea europaea* L. var. 'Arauco'). *Europ. J. Agronomy*, 54, 107– 115.
- García-Rodríguez, R., Romero-Segura, C., Sanz, C., Sánchez-Ortiz, A., Pérez, A. G. (2011). Role of polyphenol oxidase and peroxidase in shaping the phenolic profile of virgin olive oil. *Food Research International*, 44, 629–635.
- Gelderblom, W., Marasas, W., Farber, E. (1992). The cancer initiating potential of the fumonisin B mycotoxins. *Carcinogenesis*. 13:433–437.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Maiani, G., Azzini, E., Ferro-Luzzi, A. (1995). A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. *Free Radic. Biol. Med.*, 18, 29-36.
- Gilbert, D.L., Colton, C.A. (1999). *Reactive Oxygen Species in Biological Systems: An Interdisciplinary Approach*. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers. pp. 33-38, 593-605.
- Gimeno, E., De la Torre, K., Lamuela-Raventos, R.M., Castellote, A.I., Fitó, M., De la Torre, R., Covas, M.I., López-Sabater, M.C. (2007). Changes in the phenolic content of low density lipoprotein after olive oil consumption in men. A randomized crossover controlled trial. *Br. J. Nutr*, 9, 1–8.

- Giugliano, D. (2000). "Dietary antioxidants for cardiovascular prevention". *Nutrition Metabolism cardiovascular Diseases*, 10, 30-44.
- Goldmann, D., Kaushal, R. (2002). Time to tackle the tough issues in patient safety. *Pediatrics*, 110, 823-826.
- Gomes, T., Delcuratolo, D., Paradiso, V. M., Summo, C., Caponio, F. (2011). Pro-oxidant activity of oxidized triacylglycerols in olive oil and comparison with pro-oxidant action of polar triacylglycerol oligopolymers. *LWT - Food Science and Technology* 44, 1236-1239.
- Gomes, T., Delcuratolo, D., Paradiso, V. M. (2008). Pro-oxidant action of polar triglyceride oligopolymers in edible vegetable oils. *European Food Research and Technology*, 226, 1409-1414.
- Gómez-Alonso, S., Mancebo-Campos, V., Desamparados, S. M., Fregapane, G. (2007). Evolution of major and minor components and oxidation indices of virgin olive oil during 21 months storage at room temperature *Food Chemistry*, 100, 36–42.
- Gómez-Caravaca, A. M. R., Maggio, M., Verardo, V., Cichelli, A., Cerretani, L. (2013). Fourier transform infrared spectroscopy-Partial Least Squares (FTIR-PLS) coupled procedure application for the evaluation of fly attack on olive oil quality. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 153-159.
- Gómez-Coca, R.B., Moreda, W., Pérez-Camino, M.C. (2012). Fatty acid alkyl esters presence in olive oil vs. organoleptic assessment. *Food Chemistry*, 135, 1205–1209.
- Gómez-Rico, A., Fregappane, G., Salvador, M. D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in Spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, 41, 433–440.

- Gonçalves, M.R., Costa, J.C., Marques, I.P., Alves, M.M. (2012). Strategies for lipids and phenolics degradation in the anaerobic treatment of olive mill wastewater. *Water Research*, 46, 1684-1692.
- Gong, D., Geng, C., Jiang, L., Cao, J., Yoshimura, H., Zhong, L. (2009). Effects of hydroxytyrosol-20 on carrageenan-induced acute inflammation and hyperalgesia in rats. *Phytother Res*, 23, 646-650.
- Gonzalez-Santiago, M., Fonolla, J., Lopez-Huertas, E. (2010). Human absorption of a supplement containing purified hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, and evidence for its transient association with low-density lipoproteins. *Pharmacol Res*, 61,364-370.
- Gorris, L. G. M. (2005). Food safety objective: an integral part of food chain management. *Food Control*, 16, 801-809.
- Covas, M.I., Nyyssonen, K., Poulsen, H.E., Kaikkonen, J., Zunft, H.J., Kiesewetter, H., Gaddi, A., de la Torre, R., Mursu, J., Baumler, H., Salonen, J.T., Fitó, M., Virtanen, J., Marrugat, J. (2006). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Ann Intern Med*, 145,333-341.
- Goya, L., Mateos, R., Bravo, L. (2007). Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma HepG2 cells: protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Eur J Nutr*, 46, 70-78.
- Gülçin, İ., Elias, R., Gepdiremen, A., Chea, A., Topal, F. (2010). Antioxidant activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania rotunda*: Cepharanthine and fangchinoline. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 25, 44-53.
- Gutfinger, T. J. (1981). Polyphenols in olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 58, 966-968.

- Gutierrez, F., Fernandez, J. L. (2002). Determinant parameters and components in the storage of virgin olive oil. Prediction of storage time beyond which the oil is no longer of “extra” quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 571–577.
- Gutierrez, F., Jimenez, B., Ruiz, A., Albi M. A. (1999) Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties pictual and hojiblanca and on the different components involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 121- 127.
- Gutiérrez-Rosales, F., Ríos, J.J., Gómez-Rey, L. (2003). Main Polyphenols in the Bitter Taste of Virgin Olive Oil. Structural Confirmation by On-Line HPLC Electrospray Ionization Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6021-6025.
- Haba, E., Bresco, O., Ferrer, C., Marques, A., Busquets, M., Manresa, A. (2000). Isolation of lipase secreting bacteria by deploying used frying oil as selective substrate. *Enzyme Microb Technol*, 26, 40–4.
- Haddam, M., Chimi, H., El-Antari, A., Zahouily, M., Mouhibi, R., Zaz, A., Ibrahimi, M., Amine, A. (2014). Caracterización fisicoquímica y estabilidad oxidativa de los aceites de oliva de las variedades ‘Picholine marocaine’, ‘Haouzia’, ‘Koroneiki’ y ‘Arbequina’ de la región oleícola central de Marruecos (Chauía-Uardiga). *OLIVÆ*. No. 119 2014.
- Hayes, J.E., Allen, P., Brunton, N., O’Grady, M.N., Kerry, J.P. (2011). Phenolic composition and in vitro antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chemistry*, 126, 948–955.
- Halliwel, B. (1995). Antioxidant characterization; methodology and mechanism. *Biochem. Pharmacol*, 49, 1341- 1348.

- Halliwell, B. (1996). Oxidative stress, nutrition and health. *Free Rad. Res.* 25, 57- 74.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. (1986). Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*; 246:501-514.
- Halliwell, B. (1991). Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med*, 91, 14-22.
- Halliwell, B. (1993). The chemistry of free radicals. *Toxicol Ind Health*, 9, 1-21.
- Harris, W.S., Miller, M., Tighe, A.P., Davidson, M.H., Schaefer, E.J. (2008). Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: Clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis*. 197, 12- 24.
- Haskins, K., Bradley, B., Powers, K., Fadok, V., Flores, S., Ling, X., Pugazhenthii, S., Reusch, J., Kench, J. (2003). Oxidative stress in type 1 diabetes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1005, 43–54.
- Hassanzadeh, K., Akhtari, K., Hassanzadeh, H., Zarei, S. A., Fakhraei, N., Hassanzadeh, K. (2014). The role of structural CAH compared with phenolic OH sites on the antioxidant activity of oleuropein and its derivatives as a great non-flavonoid family of the olive components: A DFT study. *Food Chemistry*, 164, 251–258.
- Hernández, A., Martín, A., Aranda, E., Pérez Nevado, F., Córdoba, M. G. (2007). Identification and characterization of yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Food Microbiol*, 24, 346-351.
- Hernández, A., Martín, A., Córdoba, M. G., Benito, M. J., Aranda, E., Pérez-Nevado, F. (2008). Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 178-188.

- Hillestrøm, P.R., Covas, M.I., Poulsen, H.E. (2006). Effect of dietary virgin olive oil on urinary excretion of etheno-DNA adducts. *Free Radic Biol Med*, 41, 1133-1138
- Hollman, P.C., Cassidy, A., Comte, B., Heinonen, M., Richelle, M., Richling, E., Serafini, M., Scalbert, A., Sies, H., Vidry, S. (2011). The biological relevance of direct antioxidant effects of polyphenols for cardiovascular health in humans is not established. *J Nutr.*;141:989S---1009S.
- Hondrodinou, O., Kourkoutas, Y., Panagou, E.Z. (2011). Efficacy of natamycin to control fungal growth in natural black olive fermentation. *Food Microbiology*, 28, 621-627.
- Hossain, M. B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A. B., Wilkinson, M., Brunton, N. P. (2008). Study of phenolics in spices and their antioxidant activities to improve the quality of chilled ready meals. In *Food Microbiology 2008*, poster presentation, Aberdeen, Scotland, 1–4th September 2008.
- Hrncirik, K., Fritsche, S. (2005). Relation between the endogenous antioxidant system and the quality of extra virgin olive oil under accelerated storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2103–2110.
- Howard, P., Warbritton, A., Voss, K., Lorenzen, R., Thurman, J., Kovach, R. and Bucci, T. (2001). Compensatory regeneration as a mechanism for renal tubule carcinogenesis of fumonisinB1 in F344/N/NctrBRrat. *Environ. Health Persp.* 109:309–314.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L. (2005). The chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1841-1856.
- Ibar Albiñana, L. (2002). “Guía completa del cultivo del olivo”. Ed. Vecchi. ISBN 843152815X, 9788431528157. P: 126 España.

- Imeh, U., Khokhar, S. (2002). Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 6301- 6306.
- Ishige, K., Schubert, D., Sagara, Y. (2001). Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Rad. Biol. Med.*, 30, 433-446.
- Issaoui, M., Ben Hassine, K., Flamini, G., Brahmi, F., Chehab, H., Aouni, Y., Mechri, B., Zarrouk, M., Hammami, M. (2009). Discrimination of some Tunisian olive oil varieties according to their oxidative stability, volatiles compounds and chemometric analysis. *Journal of Food Lipids*, 16, 164–186.
- Issaoui, M., Flamini, G., Brahmi, F., Dabbou, S., Ben Hassine, K., Taamali, A., Chehab, H., Ellouz, M., Zarrouk, M., Hammamia, M. (2010). Effect of the growing area conditions on differentiation between Chemlali and Chétoui olive oils. *Food Chemistry*, 119, 220–225.
- Ivekovic, D., Milardovic, S., Roboz, M., Grabaric, B. S. (2005). Evaluation of the antioxidant activity by flow injection analysis method with electrochemically generated ABTS radical cation. *The Analyst*, 130, 708-714.
- Jackson, B. E., Bhupathiraju, V. K., Tanner, R. S., Woese, C. R., McInerney, M. J. (1999). *Syntrophus aciditrophicus* sp. nov., a new anaerobic bacterium that degrades fatty acids and benzoate in syntrophic association with hydrogen-using microorganisms. *Arch. Microbiol.*, 171, 107–114.
- Jacxsens, L., Devlieghere, F., Uyttendaele, M. (2009). *Quality management systems in the food industry*, ISBN 978-90-5989-275-0.
- Jeanette, R., Croguennec, T., Schuck, P., Brulé, G., (2006). *Science des aliments*. Ed. TEC, DOC Lavoisier, Paris. Vol.1, ISBN. 2-7430-0833- 4. p:197-223.

- Jouve, J.L. (1998). Principles of food safety legislation. *Food Control* 9, 75-81.
- Kalogeropoulos, N., Kaliora Andriana, C., Artemiou, A., Giogios, I. (2014). Composition, volatile profiles and functional properties of virgin olive oils produced by two-phase vs three-phase centrifugal decanters *LWT - Food Science and Technology* xxx 1-8.
- Kanadaswami, C., Lee, L.T., Lee, P.P.H., Hwang, J.J., Ke, F.C., Huanh, Y.T., Lee, M.T. (2005). The antitumour activities of flavonoids. *In vivo* 19, 895–909.
- Kapellakis, I.E., Tsagarakis, K.P., Crowther, J.C. (2008). Olive oil history, production and by-product management. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* 7, 1–26.
- Karabagias, I., Michos, Ch., Badeka, A., Kontakos, S., Stratis, I., Kontominas, M.G. (2013). Classification of Western Greek virgin olive oils according to geographical origin based on chromatographic, spectroscopic, conventional and chemometric analyses. *Food Research International*, 54, 1950–1958.
- Khymenets, O., Fito, M., Covas, M.I., Farre, M., Pujadas, M.A., Munoz, D., Konstantinidou, V., de la Torre, R. (2009). Mononuclear cell transcriptome response after sustained virgin olive oil consumption in humans: an exploratory nutrigenomics study. *OMICS*, 13, 7-19.
- Key, T.J., Appleby, P.N., Allen, N.E., Travis, R.C., Roddam, A.W., Jenab, M., et al. (2007). Plasma carotenoids, retinol, and tocopherols and the risk of prostate cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. *Am J Clin Nutr*, 86, 672-81.



- Kim, D-O., Lee, K.W., Lee, H.J., Lee, C.Y. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolics phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3713-3717.
- Kinsella, J. E., Shimp, J. L., Mai, J. (1978). The proximate composition of several species of fresh water fishes. *Food and Life Sciences Bulletin*, 69, 1–20.
- Kooy, N.W., Royall, J.A., Ischiropoulos, H., Beckm, J.S. (1994) Peroxynitrite-mediated oxidation of dehydrorhodamine 123. *Free Radical Biological & Medicine*, 16, 149-156.
- Krichene, D., Allalout, A., Mancebo-Campos, V., Salvador, M.D., Zarrouk, M., Fregapane, G. (2010). Stability of virgin olive oil and behaviour of its natural antioxidants under medium temperature accelerated storage conditions *Food Chemistry*, 121, 171–177.
- Kiritsakis, A., Nanos, G. D., Polymenopulos, Z., Thomai, T., Sfakiotakis, E. M. (1998a). Effect of fruit storage conditions on olive oil quality. *JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 721-724.
- Kiritsakis, A., Markakis P. (1978). Olive oil: a review. *Adv. Fd. Res.* 31, 470-482.
- Kiritsakis, A. K. (1992). *El Aceite de Oliva*. Ed Madrid Vicente. P: 31-76, Madrid, España..
- Koidis, A., Triantafillou, E., Boskou, D., (2008). Endogenous microflora in turbid virgin olive oils and the physicochemical characteristics of these oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 110, 164-171.
- Koidis, A., Boskou., D. (2015). Virgin Olive Oil: Losses of Antioxidant Polar Phenolic Compounds due to Storage, Packaging, and Culinary Uses Processing and Impact on Active Components in Food

<http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00032-9> . P: 267-274.  
Thessaloniki, Greece.

- Kök, M. S. (2009). Application of food safety management systems (ISO22000/ HACCP) in the Turkish poultry industry: a comparison based on enterprise size. *Journal of Food Protection*, 72, 2221-2225.
- Koutelidakis, A. E., Argiri, K., Serafini, M., Proestos, C., Komaitis, M., Pecorari, M., Kapsokefalou, M. (2009). Green tea, white tea, and *Pelargonium purpureum* increase the antioxidant capacity of plasma and some organs in mice. *Nutrition*, 25, 453–458.
- Kuskoski, E.M., Asuero, A.G., Troncoso, A.M., Garcia-Parilla, M.C., Fett, R. (2004). Actividad antioxidante de pigmentos antocianicos. *Rev. Bras. Ciênc. Technol. Alim.*, v. 24, n.4, 691-693.
- Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J., Fett, R. (2005). Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos. *Ciênc. Technol. Aliment.*, Campinas, 25, 726-732.
- Lafka, T-I., Lazou, A. E., Sinanoglou, V. J., Lazos, E. S. (2011). Phenolic and antioxidant potential of olive oil mill wastes. *Food Chemistry*. 125, 92–98.
- Lalman, J., Bagley, D. (2001). Anaerobic degradation and methanogenic inhibitory effects of oleic and stearic acids. *Water Research*, 35, 2975-2983.
- Lalman, J., Bagley, D.M., (2002). Effects butyrate and hydrogen degradation. *Water Res.* 36, 3307–3313.
- Lama-Muñoz, A., Romero-García, J. M., Cara, C., Moya, M., Castro, E. (2014). Low energy-demanding recovery of antioxidants and sugars from olive

stones as preliminary steps in the biorefinery context *Industrial Crops and Products*, 60, 30–38.

Lamia, A., Moktar, H., 2003. Fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus plantarum*. *Process Biochem.* 39, 59–65.

Landete, J. M., Rodríguez, H., Curiel, J. A., de las Rivas, B., López de Felipe, F., Muñoz, R. (2010). Degradation of Phenolic Compounds Found in Olive Products by *Lactobacillus plantarum* Strains. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*, ISBN: 978-0-12-374420-3. Madrid, Spain.

Lavelli, V., Fregapane, G., Salvador, M. D. (2006) « Effect of storage on secoiridoid and tocopherol contents and antioxidant activity of monovarietal extra virgin olive oils ». *J. Agric. Food Chem.* 54(8), 3002-3007.

Lawley, R. (September 2007). Hygiene by design. Food Safety Watch, . <http://www.foodsafetywatch.com/public/609.cfm>.

Lee, H.K., Ahn, M.J., Kwak, S.H., Song, W.H., Jeong, B.C. (2003). Purification and characterization of cold active lipase from psychrotrophic *Aeromonas* sp LPB 4. *J. Microbiol.* 41, 22–27.

Leonarduzzi, G., Sottero, B., Poli, G. (2010). Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: The antioxidant concept revisited. *Pharmacology and Therapeutics* 128, 336-374.

Leontopoulos, D., Siafaka, A., Markaki, B. (2003). Black olives as substrate for *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production. *Food Microbiology*, 20, 119-126.

Lerma-Garcia, M. J., Simo-Alfonso, E. F., Chivaró, E., Bendini, A., Lercker, G., Cerretani, L. (2009). Study of chemical changes produced in virgin olive

oils with different phenolic contents during an accelerated storage treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7834–7840.

Lesschaeve, I., Noble, A.C. (2005). Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 330S-335S.

Li, H.Y., Deng, Z.Y., Wu, T., Liu, R.H., Loewen, S., Tsao, R. (2012). Microwave-assisted extraction of phenolics with maximal antioxidant activities in tomatoes. *Food Chem.* 130, 928–936.

Li, W., Sperry, J. B., Crowe, A., Trojanowki, J. Q., Smith, A. B., Lee, V. M. Y. (2009). Inhibition of tau fibrillization by oleocanthal via reaction with amino groups of tau. *Journal of Neurochemistry*, 110, 1339–1351.

Liu, C.H., Chen, C.Y., Wang, Y.W., Chang, J.S. (2011). Fermentation strategies for the production of lipase by an indigenous isolate *Burkholderia* sp. C20. *Biochemical Engineering Journal*, 58– 59, 96– 102.

López-Miranda, J., Pérez-Jiménez, F., Ros, E., De Caterina, R., Badimón, L., Covas, M.I, et al. (2010). Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report. Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.*;20,284-294.

Lopez-Lopez, A., Rodriguez-Gomez, F., Cortes-Delgado, A., Montano, A., Garrido- Fernandez, A. (2009). Influence of ripe table olive processing on oil characteristics and composition as determined by chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 8973–8981.

Lorowitz, W. H., Zhao, H., Bryant, M. P. (1989). *Syntrophomonas wolfei* subsp. *saponavida* subsp. nov., a long-chain fatty-acid-degrading, anaerobic, syntrophic bacterium; *Syntrophomonas wolfei* subsp. *wolfei* subsp. nov.; and emended description of the genus and species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 39, 122–126.

- Loru, D., Incani, A., Deiaa, M., Corona, G., Atzeri, A., Melis, M.P., Rosa, A., Dessi, M.A. (2009). Protective effect of hydroxytyrosol and tyrosol against oxidative stress in kidney cells. *Toxicol Ind Health*, 25, 301-310.
- Lozano-Sánchez, J., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. (2011). Characterisation of the phenolic compounds retained in different organic and inorganic filter aids used for filtration of extra virgin olive oil. *Food Chemistry*, 124, 1146–1150.
- Luber, P., Crerar, S., Dufour, C., Farber, J., Datta, A., Todd, E. (2011). Controlling *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: working towards global scientific consensus and harmonization: recommendations for improved prevention and control. *Food Control*, 22, 1535-1549.
- Luna, G., Morales, M. T., Aparicio, R. (2006). Changes induced by UV radiation during virgin olive oil storage". *J. Agric. Food Chem.* 54, 4790-4794
- Lutz, M., Cajas. Y., Henríquez, C. (2012). Phenolics contents and antioxidant capacity of Chilean grapes. Cv. País and Cabernet Sauvignon, *CyTA- Journal of Food*, 10, 251-257.
- Maga, J.A. (1978). Simple phenol and phenol compounds in food flavor. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 10, 323–372.
- Mailer, R., Ayton, J., Graham, K. (2010). The influence of growing region, cultivar and harvest timing on the diversity of Australian olive oil. *J. Am. Chem. Soc.* 87,877–884.
- Majadahonda, (1982). Técnicas para el análisis Microbiológicos de alimentos y Bebidas del Centro Nacional de Alimentación y Nutrición. Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto Nacional de Sanidad. Gobierno de España. Madrid.

- Manai-Djebali, H., Krichène, D., Ouni, Y., Gallardo, L., Sánchez, J., Osorio, E., Daoud, D., Guido, F., Zarrouk, M. (2012). Chemical profiles of five minor olive oil varieties grown in central Tunisia. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27, 109–119.
- Mancebo-Campos, V., Salvador, M.D., Fregapane, G. (2014). Antioxidant capacity of individual and combined virgin olive oil minor compounds evaluated at mild temperature (25 and 40 °C) as compared to accelerated and antiradical assays. *Food Chemistry*. 150, 374–381.
- Manning, L., Baines, R. (2004). Effective management of food safety and quality. *British Food Journal*, 106, 598-606.
- (MAPM) Ministère de l'Agriculture et de la Pêche Maritime, (2013). Veille économique-Secteur oléicole Septembre 2013. Direction de la Stratégie et des Statistiques Note stratégique n°95.
- Mariani, C., Fedeli, E. (1985). "Determinazione delle forme gliceridiche presenti negli oli alimentari, Nota I: caso dell "olio di oliva". *Riv. Ital. Sost. Grasse*, 62, 3-7.
- Marquina, D., Peres, C., Caldas, F.V., Marques, F.V., Peinado, J.M., Spencer, M. (1992). Characterization of the yeast populations in olive brines. *Lett. Appl. Microbiol*, 14, 279-283.
- Marsilio, V., Lanza, B. (1998). Characterization of an oleuropein degrading strain of *Lactobacillus plantarum*. Combined effects of compounds present in olive fermenting brines (phenols, glucose and NaCl) on bacterial activity. *J. Sci. Food Agric*, 76, 520–524.
- Marsilio, V., Lanza, B., Pozzi, N. (1996). Progress in table olive debittering: degradation in vitro of oleuropein and its derivatives by *Lactobacillus plantarum*. *JAOCs*, 73, 593–597.

- Martín-Belloso, O., Marselle´s-Fontanet, Á.R., Elez-Martínez, P. (2014). Food Safety Aspects of Pulsed Electric Fields. Emerging Technologies for Food Processing <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-411479-1.00010-3>. P: 169-178 Lleida, Spain.
- Marrugat, J., Covas, M.I., Fito, M., Schroder, H., Miro-Casas, E., Gimeno, E., Lopez-Sabater, M.C., de la Torre, R., Farre, M. (2004). Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation — a randomized controlled trial. *Eur J Nutr*, 43,140-147.
- Masella, P., Parenti, A., Spugnoli, P., Calamai, L. (2011). Malaxation of olive paste under sealed conditions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88, 871-875.
- Mataix Verdú, J. (2001). *Aceite de Oliva Virgen: Nuestro Patrimonio Alimentario*. Ed. Universidad de Granada, Puleva Food. Granada.
- Mataix Verdú, J., Martínez de Vitoria, E. (1988). *Bases para el futuro, El aceite de oliva*. Ed. Consejería de Agricultura y Pesca. Junta de Andalucía. Sevilla.
- .
- Mateos, R., Espartero, J. L., Trujillo, M., Ríos, J. J., León-Camacho, M., Alcudia, F., Cert, A. (2001). Determination of phenols, flavones, and lignans in virgin olive oils by SPE and high-performance liquid chromatography with diode array ultraviolet detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 2185–2192.
- Mateos, R., Cert, A., Pérez-camino, M. C., Garcia, J.M. (2004) “Evolution of virgin olive oil bitterness by quantification of secoiridoid derivatives”. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 81, 71-75.
- Mateos, R., Dominguez, M.M., Espartero, J.L., Cert, A. (2003). Antioxidant effect of phenolic compounds, alpha-tocopherol, and other minor

components in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7170–7175.

Mateos, R., Trujillo, M., Pérez- Camino, M. C., Moreda, W., Cert, A. (2005) “Relationships between oxidative stability, triacylglycerol composition, and antioxidant content en olive oil matrices”. *J. Agric. Food Chem*, 53, 5766-5771.

Mattson, F.H., Grundy, S.M. (1985). Comparison of effects of dietary saturated, monounsaturated, and polyunsaturated fatty acids on plasma lipids and lipoproteins in man. *J Lipid Res*. 26,194-202.

Mayordomo, I., Rande-Gil, F., Prieto, J.A. (2000). Isolation, purification, and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. *J. Agric. Food Chem*, 48, 105–109.

Mazuelos Vela, F. (1972). Lipase del Hongo *Gloesporium olivarum* Alm. *Grasas y Aceites*, 23 432-435.

McLauchlin, J., Mitchell, R. T., Smerdon, W. J., Jewell, K. (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, 92(1), 15-33.

McNamara, C.J., Anastasiouc, C.C., O’Flahertyd, V., Mitchell, R. (2008). Bioremediation of olive mill wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad*. 61, 127–134.

Medina, E., de Castro, A., Romero, C., Brenes, M. (2006). Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: Correlation with antimicrobial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(14), 4954–4961.



- Medina, E., Romero, C., Brenes, M., De Castro, A. (2007). Antimicrobial activity of olive oil, vinegar, and various beverages against foodborne pathogens. *Journal of Food Protection*, 70(5), 1194–1199.
- Miller, J.N., Rice-Evans, c.A., Davies, M.J., Gopinathan, V. Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci*. 84, 407-412.
- Min, D. B., Boff, J. M. (2002). Lipid oxidation in edible oil. In C. C. Akoh D. B. Min (Eds.), *Food lipids—chemistry, nutrition and biotechnology* (pp. 335–363). New York: Springer
- Missmer, S. A., Suarez, L., Felkner, M., Wang, E., Merrill, A. H. Jr., Rothman, K. J., Hendricks, K. A. (2006). Exposure to fumonisins and the occurrence of neural tube defects along the Texas-Mexico border. *Environ. Health Persp.* 114:237–241.
- Miyashita, K., Takagi, T. (1986). Study on the oxidative rate and prooxidant activity of free fatty acids. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 63, 1380–1384.
- Montedoro, G. (1972). Costituenti fenolici presenti negli oli vergini di oliva Nota I: Identificazione di alcuni acidi fenolici e loro potere antiossidante. *Sci. Tecnol. Aliment*, 3, 177–186.
- Montedoro, G.F., Baldioli, M. (1992). “I composti fenolici dell’olio di oliva e la loro importanza sensoriale, nutrizionale e merceologica”. *Giornale Ital. Nutriz. Clin. Prev.* 1, 19-32.
- Montedoro, G., Baldioli, M., Selvaggini, R., Begliomini, A. L., Taticchi, A. (2002). Relationship between phenolic compounds of olive fruit and olive oil: importance of the endogenous enzymes. *Acta Horticultrae*, 586, 551–556.

- Montoya, B.H., Lemeshko, V., López, J.B., Pareja, A., Urrego, R., Torres, R. (2003). Actividad antioxidativa de algunos extractos vegetales. *Vitae*, 10, 2, 72-79.
- Moreira, A.V.B., Mancini-Filho, J. (2003). Atividade antioxidante das especiarias mostarda, canela e erva doce em sistemas aquoso e lipídico. *Nutrire*, 25, 31-46
- Morelló, J. R., Motilva, M. J., Tovar, M. J., Romero, M. P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chemistry*, 85, 357–364.
- Morelló, J.R., Vuorela, S., Romero, M.P., Motilva, M.J., Heinonen, M. (2005). Antioxidant activity of olive pulp and olive oil phenol compounds of the arbequina cultivar. *J. Agric. Food Chem*, 53, 2002–2008.
- Morello, J.R. (2004) Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on the phenolic fraction. *Food Chem*, 85,357-364.
- Moret, I., Rausell, F., Iborra, M., Bastida, G., Aguas, M., Tortosa, L., et al. (2012). Apoptosis resistance of Crohn's disease blood T-cells depends on catalase activity inhibition. *Gastroenterology*, ISSN0016-5085, DOI10.1016/S0016-5085(12)63438-6.
- Moret, I., Cerrillo, E., Navarro-Puche, A., Iborra, M., Rausell, F., Tortosa, L., Beltrán, B. (2014). Estrés oxidativo en la enfermedad de Crohn. *Gastroenterol Hepatol*, 37, 28- 34.
- Mortimore, S. (2000). An example of some procedures used to assess HACCP systems within the food manufacturing industry, *Food Control* 11, 403-413.
- Mortimore, S., Wallace, C. (2001). HACCP enfoque práctico. 2 edición, 446 Zaragoza: Acribia SA.

- Motarjemi, Y. (2014). Hazard Analysis and Critical Control Point System (HACCP) Food Safety Management. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-381504-0.00031-7>.P: 845-871. Nyon, Switzerland
- Moyer, R. A., Hummer, K.E., Finn, C.E., Frei, B., Wrolstad, R.E. (2002). Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: Vaccinium, Rubus, and Ribes. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 519-525.
- Murkovic, M., Lechner, S., Pietza, A., Bratacos, M., Katzogiannos, E. (2004). Análisis of minor components in olive oil. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 61, 155- 160.
- NACMCF (1997). Hazard Analysis and Critical Control Point Principles and application guidelines. *Journal of Food Protection*, 61, 1246-1259.
- Nagy, D., Bongiorno, G., Avellone, P., Agozzino, L., Ceraulo, K., Vékey, J. (2005). High performance liquid chromatography–mass spectrometry based chemometric characterization of olive oils *Chromatogr.,A*, 1078, 90-97.
- Nakbi, A., Issaoui, M., Dabbou, S., Koubaa, N., Echbili, A., Hammami, M., Attia, N. (2010). Evaluation of antioxidant activities of phenolic compounds from two extra virgin olive oils. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 711–715.
- Nestel, P. (2003). Isoflavones: their effects on cardiovascular risk and functions. *Curr. Opin. Lipidol*, 14, 3–8.
- Nisiotou, A. A., Chorianopoulos, N., Nychas, G. J.E., Panagou, E.Z. (2010). Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black *Conservolea* olives in different brine solutions. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 396–405.

- Obied, H. K., Prenzler, P. D., Ryan, D., Servilli, M., Taticchi, A., Esposito, S., Robards, K. (2008). Biosynthesis and biotransformations of phenol-conjugated oleosidic secoiridoids from *Olea europaea* L. *Natural Product Reports*, 25, 1167–1179.
- Ocakoglu, D., Tokatli, F., Ozen, B. Korel, F. (2009) Distribution of simple phenols, phenolic acids and flavonoids in Turkish monovarietal extra virgin olive oils for two harvest years. *Food Chemistry*. 15, 401-410.
- Odabasoglu, F., Aslan, A., Cakir, A., Suleyman, H., Karagoz, Y., Bayir, Y. (2005). Antioxidant activity, reducing power and total phenolic content of some lichen species. *Fitoterapia*. 76, 216-219.
- Okogeri, O., Tasioula-Margari, M. (2002). Changes occurring in phenolic compounds and alpha-tocopherol of virgin olive oil during storage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1077–1080.
- Oliveras-López, M.J. (2005). *Capacidad del aceite de olive virgin extra. Antioxidantes y función biológica*. Editorial de la universidad de Granada. D.L: Gr. 1347-2005. ISBN: 84-338-3562-9.
- Oliveras-López, M.J., Muros Molina, J. J., Villalón Mir, M., Fontao Rey, E., Martín, F., López-García de la Serrana, H. (2013). Extra virgin olive oil (EVOO) consumption and antioxidant status in healthy institutionalized elderly humans. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, 57, 234–242.
- Oliveras-López, M.J., Berná, G., Jurado-Ruiz, E., López-García de la Serrana, H., Martín, F. (2014). Consumption of extra-virgin olive oil rich in phenolic compounds has beneficial antioxidant effects in healthy human adults, *journal of functional foods*. 10, 475–484.
- Ollé, M. (2002). *Analyse des corps gras DGCCRF, Laboratoire interrégional de Montpellier France, Techniques de l'ingénieur*, pp 3325.

- Orsi, R.H., Bakker, H.C.D., Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: genomics, evolution, ecology, and phenotypic characteristics. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 79-96.
- Orlandi, F., Bonofiglio, T., Romano, B., Fornaciari, M. (2012). Qualitative and quantitative aspects of olive production in relation to climate in southern Italy. *Sci.Hortic*, 138, 151–158.
- Orr, M. S., Scherf, U. (2002). Large-scale gene expression analysis in molecular target discovery. *Leukemia*, 16, 473–477.
- Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior, R.L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4619-4626.
- Ou, B., Huang, D., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J.A., Deemer, E.K. (2002). Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. *J Agric Food Chem.* 50, 3122–3128.
- Ouni, Y., Taamalli, A., Gómez-Caravaca, A. M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Zarrouk, M. (2011). Characterisation and quantification of phenolic compounds of extra-virgin olive oils according to their geographical origin by a rapid and resolute LC–ESI-TOF MS method. *Food Chemistry*, 127, 1263–1267.
- Ozgen, M., Reese, R. N., Tulio, A. Z., Jr., Scheerens, J. C., Miller, A. R. (2006). Modified 2,2-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2,20-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1151-1157.

- Paiva-Martins, F., Fernandes, J., Rocha, S., Nascimento, H., Vitorino, R., Amado, F., Borges, F., Belo, L., Santos-Silva, A. (2009). Effects of olive oil polyphenols on erythrocyte oxidative damage. *Mol Nutr Food Res*, 53,1-8.
- Page, H., Salmon, A., Leiser, S., Robb, E., Brown, M., Milter, R., Stuart, J. (2009). Mechanisms of stress resistance in snell dwarf mouse fibroblast: enhanced antioxidant and DNA base excision repair capacity, but no differences in mitochondrial metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*. 46,1109-1118.
- Palatsi, J., Viñas, M., Guivernau, M., Fernandez, B., Flotats, X. (2011). Anaerobic digestion of slaughterhouse waste: main process limitations and microbial community interactions. *Bioresour. Technol*, 102, 2219–2227.
- Panagou, E. Z. (2006). Greek dry-salted olives: Monitoring the dry-salting process and subsequent physico-chemical and microbiological profile during storage under different packing conditions at 4 and 20°C. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 39, 322–329.
- Panagou, E.Z., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P., Nychas, G.-J, E. (2008). Microbiological and biochemical profile of cv. Conservolea naturally black olives during controlled fermentation with selected strains of lactic acid bacteria. *Food Microbiol*. 25,328-358.
- Panzanaro, S., Nutricat, E., Miceli, A., De Bellis, L. (2010). Biochemical characterization of a lipase from olive fruit (*Olea europaea* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 741-745.
- Papadopoulos, G., Boskou, D. J. (1991). Antioxidant effect of natural phenols in olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68, 669–671.
- Paradiso, V. M., Gomes, T., Nasti, R., Caponio, F., Summo, C. (2010). Effects of free fatty acids on the oxidative processes in purified olive oil. *Food Research International*, 43, 1389–1394.

- Parenti, A., Spugnoli, P., Masella, P., Calamai, L. (2007). Improving olive oil quality using CO<sub>2</sub> evolved from olive pastes during processing. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109, 1180-1185.
- Park, I.H., Kim, S.H., Lee, Y.S., Lee, S.C., Zhou, Y., Kim, C.M., Ahn, S.C., Choi, Y.L. (2009). Gene cloning, purification, and characterization of a cold-adapted lipase produced by *Acinetobacter baumannii* BD5. *J. Microbiol. Biotechnol*, 19, 128–135.
- Pauwels, E.K. (2011). The protective effect of the Mediterranean diet: focus on cancer and cardiovascular risk. *Med Princ Pract.*, 20, 103-11.
- Pellegrini, N., Re, R., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Screening of Dietary carotenoids and carotenoid- rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis (3-ethylenebenzothiazoline- 6-sulfonic acid radical cation decolorization assay. *Methods in enzymology*, 299, 379- 389.
- Pellegrini, N., Visioli, F., Buratti, S., Brighenti. F. (2001). Direct Analysis of Total Antioxidant Activity of Olive Oil and Studies on the Influence of Heating. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 2532- 2538.
- Pellegrini, N., Serafín, M., Colombi, B., Del Rio, D., Salvatore, S., Bianchi, M., Brighenti, F. (2003). Total antioxidant capacity of plant foods, beverages, and oils consumed in Italy assessed by three different in Vitro assays. *Journal of Nutrition*, 133(9), 2812-2819.
- Pereira, M.A., Pires, O.C., Mota, M., Alves, M.M. (2002). Anaerobic degradation of oleic acid by suspended and granular sludge: identification of palmitic acid as a key intermediate. *Water Science and Technology*, 45, 139-144.
- Pereira, M.A., Sousa, D.Z., Mota, M., Alves, M.M., (2004). Mineralization of LCFA associated to anaerobic sludge: kinetics, transport limitations,

enhancement of methanogenic activity and effect of VFA. *Biotechnol. Bioeng.* 88, 502–511.

Pérez-Camino, M.C., Moreda, W., Mateos, R., Cert, A. (2003). Simultaneous determination of long- chain aliphatic aldehydes and waxes in olive oils. *Journal of Chromatography A*, 983, 283- 288.

Pérez-Jiménez, F., Ruano, J., Pérez-Martínez, P., López-Segura, F., López-Miranda, J. (2007). The influence of olive oil on human health: not a question of fat alone. *Mol Nutr Food Res*, 51, 1199- 208.

Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz-Rubio, M.E., Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*. 41, 274-285.

Perona, J.S., Cabello-Moruno, R., Ruiz-Gutierrez, V. (2006). The role of virgin olive oil components in the modulation of endothelial function. *J Nutr Biochem*, 17,429-445.

Perona, J.S., Cabello-Moruno, R., Ruíz-Gutierrez, V. (2006). The role of virgin components in the modulation of endothelial function. *J. Nutr. Biochem*, 17, 429–437.

Pinelli, P., Galardi, C., Mulinacci, N., Vincieri, F. F., Cimato, A., Romani, A. (2003). Minor polar 13 compounds and fatty acid analyses in monocultivar virgin olive oils from Tuscany. *Food Chemistry*, 80, 331-336.

Pinheiro, P.B.M., Esteves da Silva, J.C.G. (2005). Chemometric classification of the biometric parameters of olives from three Portuguese cultivars of *Olea europaea* L. *Anal. Chim. Acta*, 544, 229–235.



- Pires, S. M., Vieira, A. R., Perez, E., Lo Fo Wong, D. and Hald, T. (2012). Attributing human foodborne illness to food sources and water in Latin America and the Caribbean using data from outbreak investigations. *International Journal of Food Microbiology* 152, 129-38.
- Piscopo, A., De Bruno, A., Zappia, A., Poiana, M. (2014). Antioxidant activity of dried green olives (Carolea cv.) *LWT - Food Science and Technology*, 58, 49-54
- Pitt, J., Roth, W., Lacor, P., Blankenship, M., Velasco, P., De Felice, F., et al. (2009). Alzheimer's-associated A-beta oligomers show altered structure, immunoreactivity and synaptotoxicity with low doses of oleocanthal. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 240, 189–197
- Pizarro, C., Rodríguez-Tecedor, S., Pérez-del-Notario, N., Esteban-Díez, I., González-Sáiz, J.M. (2013). Classification of Spanish extra virgin olive oils by data fusion of visible spectroscopic fingerprints and chemical descriptors. *Food Chemistry*, 138, 915–922.
- Platz, E.A., Giovannucci, E. (2006). Prostate Cancer. En: Schottenfeld D, Fraumeni Jr JF, editores. *Cancer Epidemiology and Prevention*. 3rd ed Oxford: Oxford University Press;. p. 1128 - 50.
- Pohanka, M., Sochor, J., Ruttkay-Nedecký, B., Cernei, N., Adam, V., Hubálek, J., Stiborová, M., Eckschlager, T., Kizek, R. (2012). Automated assay of the potency of natural antioxidants using pipetting robot and spectrophotometry. *J Appl Biomed.* 10, 155–167.
- Polášek, M., Skála, P., Opletal, L., Jahodář, L. (2004). Rapid automated assay of anti-oxidation/radical-scavenging activity of natural substances by sequential injection technique (SIA) using spectrophotometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 379, 754–758.

- Pourcel, L., Routaboul, J. M., Cheynier, V., Lepiniec, L., Debeaoujon, I. (2006). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in Plant Science*, 12, 29–36.
- Powell, M. R. (2014). The food safety impact of the Codex sampling plans for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: An empirical case study applying the FAO/WHO sampling plan tool, *Food Control*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.04.033>.
- Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem*, 53, 4290–4302.
- Prior, R.L., Cao, G., Martin, A., Sofic, E., Mce-Wan, J., O'Brien, C., Lischner, N., Ehlenfeldt, M., Kalt, W., Krewer, G., Mainland, C.M. (1998). Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity and variety of *Vaccinium* specie. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 2686-2693.
- Prior, R.L., Cao, G. (1999). In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radical Biology & Medicine*, 27, 1173-1181.
- Psani, M., Kotzekidou, P. (2006). Technological characteristics of yeasts strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 22, 1329-1336.
- Puiggrós, F., Llopiz, N., Ardévol, A., Bladé, C., Arola, L., Salvadó, M. J. (2005). Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 6080–6086.
- Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F. (2000). Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 48, 3396-3402.

- Quesada-Gomez, C., Mulvey, M., Vargas, P., Gamboa-Coronado, M.M., Rodriguez-Cavallini, E., Rodriguez, C. (2013). Isolation of a toxigenic and clinical genotype of *Clostridium difficile* in retail meats in Costa Rica. *Journal of Food Protection* 76: DOI 10.4315/0362-028X.JFP-12-169.
- Rababah, T. M., Feng, H., Yang, W., Eriefej, K., Al-omoush, M. (2011). Effects of type of packaging material on physicochemical and sensory properties of olive oil. *International Journal of Agricultural & Biological Engineering*, 4, 66–72.
- Ramírez Vela, A., Martín Fernández, J. (2003). Barriers for the developing and implementation of HACCP plans: results from a Spanish regional survey. *Food Control* 14, 333-337.
- Ramos-Cormenzana, A., Juarez-Jimenez, B., Garcia-Pareja, M.P., (1996). Antimicrobial activity of olive mill waste-waters (alpechín) and biotransformed olive oil mill wastewater. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 38, 283–290.
- Rashid, N., Shimada, Y., Ezaki, S., Atomi, H., Imanaka, T. (2001). Low-temperature lipase from psychrotrophic *Pseudomonas* sp strain KB700A. *Appl. Environ. Microbiol*, 67, 4064–4069.
- Rastrelli, L., Passi, S., Ippolito, F., Vacca, G., De Simone, F. (2002). Rate of degradation of alpha-tocopherol, squalene, phenolics, and polyunsaturated fatty acids in olive oil during different storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5566–5570.
- RD 2207/1995. Real Decreto 2207/1995, de 28 de diciembre, por el que se establece las normas de higiene relativas a los productos alimenticios. *Boletín Oficial del Estado* 50/1196, 7381-7386. 96.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.*, 26, 9/10, 1231-1237, 1999.
- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J. (2014). Improvements in the malaxation process to enhance the aroma quality of extra virgin olive oils, *Food Chemistry* doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.02.140>
- Reglamento (UE) N° 61/2011 de la Comisión de 24 de enero de 2011 por el que se 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 (DOL 23 de 27 de enero de 2011).
- Reglamento (EEC). (1991). 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. *Official Journal of the European Communities*, July 11, L248, 1–83.
- Rezaie, .A., Parker, R.D., Abdollahi, M. (2007). Oxidative stress and pathogenesis of inflammatory bowel disease: an epiphenomenon or the cause. *Dig Dis Sci.*; 52, 2015- 2121
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 933–956.
- Riley.R.F, (2002) Olive oil production on Bronze Age Crete: Nutritional properties, processing methods and storage life of Minoan olive oil, *Oxford J. Archaeol.* 21 (1) 64.
- Rivero-Pérez, M.D., Muñiz, P., González-Sanjosé, M.L. (2007). Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger

activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. *J. Agric. Food Chem.* 55, 5476-5483.

Robards, K., Prenzler, P.D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.*, 66, 401-436, 1999.

Roberto, C. D., Brandão, S. C. C., da Silva, C. A. B. (2006). Costs and investments of implementing and maintaining HACCP in a pasteurized milk plant. *Food Control*, 17, 599-603.

Rodríguez, H., de las Rivas, B., Gómez-Cordovés, C., Muñoz, R., (2008a). Degradation of tannic acid by cell-free extracts of *Lactobacillus plantarum*. *Food Chem.* 107, 664–670.

Rodríguez, H., Landete, J.M., Curiel, J.A., de las Rivas, B., Mancheño, J.M., Muñoz, R., (2008b). Characterization of the p-coumaric acid decarboxylase from *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. *J. Agric. Food Chem.* 56, 3068–3072. (doi:10.1021/jf703779s).

Rodríguez, H., Landete, J.M., de las Rivas, B., Muñoz, R., (2008c). Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. *Food Chem.* 107, 1393–1398.

Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F.N., López-López, A., Bautista-Gallego, J., and Garrido-Fernández, A. (2010). Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing. *Food Microbiology*, 27, 604–612.

Rodreguez-Nogales, J.M., Vila-Crespo, J., Gómez, M. (2011). Development of a rapid method for the antioxidant capacity in cereal and legume milling products using the radical cation DMPD<sup>+</sup>, *Food Chemistry*. 129, 1800-1805.

- Romero, C., Medina, E., Vargas, J., Brenes, M., De Castro, A. (2007). In vitro activity of olive oil polyphenols against *Helicobacter pylori*. *J Agric Food Chem* 2007, 55, 680-686.
- Romero-Segura, C., Sanz, C., Pérez, A. G. (2009). Purification and Characterization of an Olive Fruit beta-Glucosidase Involved in the Biosynthesis of Virgin Olive Oil Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7983–7988.
- Ropkins, K., Beck, A.J. (2003). Using HACCP to control organic chemical hazards in food wholesale, distribution, storage and retail. *Trends in food science & technology* 14, 374-389.
- Ropkins, K., Beck, A. J. (2000). Evaluation of worldwide approaches to the use of HACCP to control food safety. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 10-21.
- Rotondi, A., Bendini, A., Cerretani, L., Mari, M., Lercker, G., Toschi, T.G. (2004). Effect of olive ripening degree on the oxidative stability and organoleptic properties of cv. Nostrana di Brisighella extra virgin olive oil. *J. Agric. Food Chem*, 52, 3649–3654.
- Roussos, S., Zaouia, N., Salih, G., Tantaoui-Elaraki, A., Lamrani, K., Cheheb, M., et al. (2006). Characterization of filamentous fungi isolated from Moroccan olive and olive cake: Toxinogenic potential of *Aspergillus* strains. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 500–506.
- Rovellini, P., Cortesi, N., Fedeli, E. (1997). Analysis of flavonoids from *Olea europaea* by HPLC-UV and HPLC-electrospray-MS. *Riv. Ital. Sost. Grasse* 74, 273–279.
- Roy, F., Samain, E., Dubourguier, H. C., Albagnac, G. (1986). *Syntrophomonas sapovorans* sp. nov., a new obligately proton reducing anaerobe oxidizing

saturated and unsaturated long chain fatty acids. *Arch. Microbiol.*, 145, 142–147.

Rozès, N., Peres, C., 1998. Effects of phenolic compounds on the growth and the fatty acid composition of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 108–111.

Rufián-Henares, J. Á., Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B. (2005). Evolution of fatty acid profile and lipid oxidation during enteral formula storage. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 29, 204–211.

Ruíz-Barba, J.L., Rios-Sánchez, R.M., Fedriani-Iriso, C., Olias, J.M., Rios, J.L., Jiménez-Díaz, R. (1990). Bactericidal effect of phenolic compounds from green olives on *Lactobacillus plantarum*. *System. Appl. Microbiol.* 13, 199–205.

Ruiz-Domínguez, M. L., Raigón. M. D., Prohens, J. (2013). Diversity for olive oil composition in a collection of varieties from the region of Valencia (Spain). *Food Research International*, 54, 1941–1949.

Ryan, D., Prenzler, P. D., Lavee, S., Antolovich, M., Robards, K. (2003). Quantitative changes in phenolic content during physiological development of the olive (*Olea europaea*) cultivar Hardy's mammoth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2532-2538.

Ryan, D., Robards, K. (1998) "phenolic compounds in olives". *Analyst* ,123, 31-44.

Sacks, F.M., Bray, G.A., Carey, V.J., Smith, S.R., Ryan, D.H., Anton, S.D., et al. (2009). Comparison of weight-loss diets with different compositions of fat, protein, and carbohydrates. *N Engl J Med.* 360, 859-873.

Salvini, S., Sera, F., Caruso, D., Giovannelli, L., Visioli, F., Saieva, C., Masala, G., Ceroti, M., Giovacchini, V., Pitozzi, V. Galli, C., Romani, A., Mulinacci,

N., Bortolomeazzi, R., Dolara, P., Palli, D. (2006). Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br J Nutr*, 95,742-751.

Samaniego-Sánchez, C. (2006). Estudio y evaluación de la capacidad antioxidante virgen extra. Implicación en la salud. Editor: Editorial de la Universidad de Granada. D.L.: Gr.727-2005. ISBN: 84-338-3804-0.

Samaniego-Sánchez, C., Troncoso González, A.M., García-Parrilla, M.C., Quesada Granados, J.J., López García de la Serrana, H., López Martínez, M.C. (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Anal. Chim. Acta*, 593, 103–107.

Samaniego-Sánchez, C., Javier Quesada-Granados.J., Sánchez-Navarro,M.R., López-Garcia de la Serrana, H., López-Martinez, M.C. (2010). Antioxidant Capacity of Blood after Extra Virgin Olive Oil Intake in Human Volunteers. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. ISBN: 978-0-12-374420-3.

Samaniego-Sánchez, C., Oliveras-López, M. J., Quesada-Granados, J. J., Villalón-Mir, M., López-Garcia de la Serrana, H. (2012). Alterations in picual extra virgin olive oils under different storage conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 194-204.

Sánchez- Moreno, (2002). Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci Technol Int* 8, 121-137.

Sánchez-Morino, C., Larrauri, J.A., Saura-Calixto, F.A. (1998). procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J. Sci. Food Agric.*, 76, 270-276.

Sánchez Rodríguez, J.A., Jodral Villarejo, M.L., errano Jiménez, M.S., Marfil Navarro, J.A. (2003). Diseño del Plan de limpieza y desinfección en un



matadero de porcino. Córdoba: Servicio de publicaciones de la Universidad de Córdoba.

- Sathish Yadav, K.N., Adsul, M.G., Bastawde, K.B., Jadhav , D.D., Thulasiram , H.V., Gokhale, D.V. (2011). Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. *Bioresource Technology*, 102, 10663–10670.
- Santosa, M. (2010). Analysis of sensory and non-sensory factors mitigating consumer behavior: A case study with extra virgin olive oil. PhD Dissertation, Food Science: University of California, Davis.
- Scarmeas, N., Luchsinger, J. A., Schupf, N., Brickman, A. M., Cosentino, S., Tang, M. X., et al. (2009). Physical activity, diet, and risk of Alzheimer disease. *Journal of American Medical Association*, 302, 627–637.
- Schmid, R. D., Verger, R. (1998). Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 37, 1608 – 1633.
- Schneider, C. (2005). Chemistry and biology of vitamin E. *Molecular Nutrition, Food Research*, 49, 7–30.
- Schroeter, H., Heiss, C., Balzer, J., Kleinbongard, P., Keen, C. L., Hollenberg, N. K., Sies, H., Kwik-Urbe, C., Schmitz, H. H., Kelm, M. (2006). (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 1024–1029.
- Segura-Carretero, A., Carrasco-Pancorbo, A., Bendini, A., Cerretani, L. and Fernández-Gutiérrez, A. (2010). Analytical Determination of Polyphenols in Olive Oil. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. ISBN: 978-0-12-374420-3. P: 509-523 Granada, Spain.

- Sellappan, S., Akoh, C.C., Krewer, G. (2002). Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2432-2438.
- Serafini, M., Laranjinha, J.A.N., Almeida, L. M., Maiani, G. (2000). Inhibition of human peroxidation by phenol-rich beverages and their impact on plasma total antioxidant capacity in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 11,585-9.
- Servili, M., Taticchi, A., Esposto, S., Urbani, S., Selvaggini, R., Montedoro, G. F. (2008). Influence of the decrease in oxygen during malaxation of olive pastes on the composition of volatiles and phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10048-10055.
- Serra Belenguer, J.A., Escriche Roberto, I. (1997). Introducción al Control de Calidad en la Industria Alimentaria. En: *Concepto de Calidad y Control de Calidad*. Ed. Reproval, S.L. P: 3-60, Vlencia, España.
- Shafei, M.S., Abd-Elsalam, I.S. (2005). Role of some fermentation parameters affecting lipase production by *Fusarium solani*. *Acta Pharmaceutica Turcica*, 47, 209–223.
- Shahat, A.A., Marzouk, M. (2013). Tannins and Related Compounds from Medicinal Plants of Africa. *Medicinal Plant Research in Africa*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-405927-6.00013-8>. P: 480-555
- Shahidi, F., Nacsk, M. (1995). *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, and Applications*. Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, PA.
- Shahidi, F., Wanasundara, U. N. (1998). Methods of measuring oxidative rancidity of fats and oils. In C. C. Akoh & D. B. Min (Eds.), *Food lipids: Chemistry, nutrition, and biotechnology* (pp. 377–396). New York: Marcel Dekker.

- Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. (2001). Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnol Adv*, 19, 627–62.
- Shigematsu, T., Tang, Y., Mizuno, Y., Kawaguchi, H., Morimura, S., and Kida, K. (2006), Microbial Diversity of Mesophilic Methanogenic Consortium That Can Degrade Long-Chain Fatty Acids in Chemostat Cultivation. *JOURNAL OF BIOSCIENCE AND BIOENGINEERING*, 102, 535–544.
- Silva, T., Reto, M., Sol, M., Peito, A., Peres, C.M., Peres, C., Xavier Malcata, F. (2011). Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behaviour. *Food Science and Technology*, 44, 1349-1354.
- Silva, W.O.B., Mitidieri, S., Schrank, A., Vainstein, M.H. (2005). Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Process Biochem*, 40, 321–326.
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic–phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 299, 152-179.
- Sochor, J., Rývolová, M., Krystofová, O., Salas, P., Hubálek, J., Adam, V., Trnková, L., Havel, L., Beklova, M., Zehnálek, J., et al. (2010). Fully automated spectrometric protocols for determination of antioxidant activity: Advantages and disadvantages. *Molecules*, 15, 8618–8640.
- Sochor, J., Juriková, T., Pohanka, M., Skutková, H., Baron, M., Tomásková, L., Balla, S., Klejdus, B., Pokluda, R., Mlček, J., Trojaková, Z., Saloun, J. (2014) Evaluation of Antioxidant Activity, Polyphenolic Compounds, Amino Acids and Mineral Elements of Representative Genotypes of *Lonicera*

edulis. *Molecules* 2014, 19, 6504-6523; doi:10.3390/molecules19056504. ISSN 1420-3049. www.mdpi.com/journal/molecules.

Sofi, F., Cesari, F., Abbate, R., Gensini, G.F., Casini, A. (2008). Adherence to Mediterranean diet and health status: meta-analysis. *BMJ*, 2008, 337-344.

Solà-Alberich, R., Valls-Zamora, R. M., Fernández-Castillejo, S., Catalán-Santos, Ú., Pedret-Figuerola, A., Giralt-Batista, M., Konstantinidou, Valentini. (2011). ¿Los compuestos fenólicos ejercen sus efectos en nuevas vías o mecanismos que explicarían efectos cardiosaludables del aceite de oliva virgen? Do phenolic compounds exercise their effects by new pathways or mechanisms that would explain the healthy-heart effects of virgin olive oil? *Clin Invest Arterioscl*, 23, 275-277.

Sousa, D.Z. (2006). Ecology and physiology of anaerobic microbial communities that degrade long chain fatty acids. PhD thesis, Dept Biological Eng., University of Minho, Braga, Portugal.

Stadtman, E.R. (1992). Protein oxidation and aging. *Science*, 257, 1220-4.

Stefanoudaki, E., Koutsaftakis, A., Harwood, J.L. (2011). Influence of malaxation conditions on characteristic qualities of olive oil. *Food Chemistry*, 127, 1481–1486.

Stefanoudaki, E., Williams, M., Harwood, J. (2010). Changes in virgin olive oil characteristics during different storage conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 906–914.

Stier, R.F. (2003). Thoughts on Today's Food Safety: HACCP Myths and Misunderstandings. *FOOD PROTECTION TRENDS*; 23; 712 ISSN: 1541-9576.

- Stoev, S. (2007). Food Safety and Some Foodborne Mycotoxicoses, Vet Africa 2007 Congress, 27–28 July, 2007, Johannesburg, South Africa.
- Stoev, S. D. (2008). Complex etiology, prophylaxis and hygiene control in mycotoxic nephropathies in farm animals and humans, special issue “Mycotoxins: Mechanisms of toxicological activity—treatment and prevention”, section “Molecular Pathology.” Int. J. Mol. Sci. 9:578–605.
- Stoev, S. D. (2010a). Studies on carcinogenic and toxic effects of ochratoxin A in chicks. Special Issue “Ochratoxins”. Toxins, 2:649–664.
- Stoev, S. D. (2010b). Studies on some feed additives and materials giving partial protection against the suppressive effect of ochratoxin A on egg production of laying hens. Res. Vet. Sci. 88:486–491.
- Stoev, S.D. (2013). Food Safety and Increasing Hazard of Mycotoxin Occurrence in Foods and Feeds, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 53:9, 887-901, DOI: 10.1080/10408398.2011.571800.
- Svetlitshnyi, V., Rainey, F., Wiegel, J. (1996). *Thermosyntropha lipolytica* gen. nov., sp. nov., a lipolytic, anaerobic, alkalitolerant, thermophilic bacterium utilizing short- and longchain fatty acids in syntrophic coculture with a methanogenic archaeum. Int. J. Syst. Bacteriol, 46, 1131–1137.
- Sun, S.Y., Xu, Y., Wang, D. (2009). Novel minor lipase from *Rhizopus chinensis* during solid-state fermentation: Biochemical characterization and its esterification potential for ester synthesis. Bioresour Technol, 100, 2607–2612.
- Sun-Waterhouse, D., Zhou, J., Miskelly, G.M., Wibisono, R., Wadhwa, S.S. (2011). Stability of encapsulated olive oil in the presence of caffeic acid. Food Chemistry, 126, 1049–1056.

- Takahama, U., Oniki, T. (2000). Flavonoids and some other phenolics as substrates of peroxidase: Physiological significance of the redox reactions. *Journal of Plan Research*, 113, 301–309.
- Tantaoui-Elaraki, A., Benabdellah, L., Majdi, M., Elalaoui, M. R., Dahmani, A. (1994). Recherche des mycotoxines dans les denrées alimentaires distribués au Maroc. *Actes Institut Agronomique et Vétérinaire Hassan II*, 14, 11–16.
- Taticchi, A., Esposito, S., Veneziani, G., Urbani, S., Selvaggini, R., Servili, M. (2013). The influence of the malaxation temperature on the activity of polyphenoloxidase and peroxidase and on the phenolic composition of virgin olive oil. *Food Chemistry*, 136, 975–983.
- Templer, J., Lalman, J.A., Jing, N., Ndegwa, P.M. (2006). Influence of C18 long chain fatty acids on hydrogen metabolism. *Biotechnol. Progr*, 22, 199–207.
- Ten Eyck, T. A., Thede, D., Bode, G., Bourquin, L. (2006). Is HACCP nothing? a disjoint constitution between inspectors, processors, and consumers and the cider industry in Michigan. *Agriculture and Human Values*, 23, 205–214.
- Terral, J.F., Alonso, N., Capdevila, R.B.I., Shatt, N., Fabre, L., Fiorentino, G., Marínval, P., Jorda, G.P., Pradat, B., Rovira, N., Alibert, P. (2004). Historical biogeography of olive domestication (*Olea europaea* L.) as revealed by geometrical morphometry applied to biological and archaeological material. *Journal of Biogeography*, 31, 63–77.
- Toshima, S., Hasegawa, A., Kurabayashi, M., et al. (2000). Circulating oxidized low-density lipoprotein levels. A biochemical risk marker for coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 20, 2243–2247.

- Tous, J., Romero, A., Plana, J., Guerrero, L., Díaz, I., Hermoso, J.R. (1997). Características químico-sensoriales de los aceites de oliva «Arbequina» obtenidos en distintas zonas de España. *Grasas y Aceites*, 48, 415–424.
- Tovar, M. J., Romero, M. P. (2001). “Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from young trees (*Olea europaea* L. cv Arbequina) grown under linear strategies”. *J. Agric. Food. Chem.*, 49, 5502-5508.
- Trichopoulou. A., Bamia. C., Trichopoulos., D. (2009). Anatomy of health effects of Mediterranean diet: Greek EPIC prospective cohort study. *BMJ*:338:b2337.
- Trienekens, J., Zuurbier, P. (2008). Quality and safety standards in the food industry, developments and challenges. *International Journal of Production Economics*, 113, 107-122.
- Tripoli, E., Giammanco, M., Tabacchi, G., Di Majo, D., Giammanco, S., La Guardia, M. (2005). The phenolic compounds of olive oil: Structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutrition Research Reviews*, 18, 98–112.
- Tsimidou, M.Z. (2010). Squalene and Tocopherols in Olive Oil: Importance and Methods of Analysis. *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. ISBN: 978-0-12-374420-3. P: 561-567. Thessaloniki, Greece.
- Tuck, L. K., Hayball, P. J. (2002). Major phenolic compounds in olive oil: metabolism and health effects. *Journal of nutritional biochemistry*. 13, 636-644.
- Uceda, M., Hermoso, M. (1997). *La Calidad del Aceite de Oliva. El Cultivo del Olivo*. Eds Barranco D., Fernández-Escobar R., Rallo L. Junta de Andalucía. Sevilla.

- Uceda, M., Aguilera, M. P., Beltrán, G., Jiménez, A. (2000). Aceites de Oliva Vírgenes Extra. Calidad y diversidad. Ed. Patrimonio Comunal Olivarero. Junta de Andalucía. Sevilla.
- Uceda, M., Beltrán, G., Jiménez, A. (2005). Composición del aceite (Bancon de Germoplasma de Córdoba). En: Variedades de olivo en España (Libro II: Variabilidad y selección). Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J.M., Del Rio, C., Martin, A., Tous, J., and Trujillo, M. I. (Eds.) Junta de Andalucía, MAPA y Ediciones MundPrensa. Madrid. España.
- Untermann, F. (1999). Food safety management and misinterpretation of HACCP. *Food Control*, 10, 161–167.
- Uribe, E., Lemus-Mondaca, R., Vega-Galvez, A., Zamorano, M., Quispe-Fuentes, I., Pasten, A., Di Scala, K. (2014). Influence of process emperature on drying kinetics, physicochemical properties and antioxidant capacity of the olive-waste cake. *Food Chemistry*, 147, 170–176.
- Uttara, B., Singh, A.V., Zamboni, P., Mahajan, R.T. (2009). Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol*, 7, 65-74.
- Vacca, V., Del Caro, A., Poiana, M., Piga, A. (2006). Effect of storage period and exposure conditions on the quality of Bosana extra-virgin olive oil. *Journal of Food Quality*, 29, 139–150.
- Valladão. A.B.G., Torres. A.G., Freire.D.M.G., Cammarota. M.C. (2011). Profiles of fatty acids and triacylglycerols and their influence on the anaerobic biodegradability of effluents from poultry slaughterhouse. *Bioresource Technology*, 102, 7043–7050.
- Van der Werf, M. J., Jellema, R. H., Hankemeier, T. (2005). Microbial metabolomics: replacing trial-and-error by the unbiased selection and ranking of targets. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32, 234–252.



- Van der Sluis, A., Dekker, M., Van Boekel, N. (2005). Activity and Concentration of Polyphenolic Antioxidants in Apple Juice. 3. Stability during Storage. *J. Agric. Food Chem*, 53, 1073-1080.
- Van der Spiegel, M., Luning, P., Ziggers, G., Jongen, W. (2004). Evaluation of performance measurement instruments on their use for food quality systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 44, 501- 512.
- Van Schothorst, M., Zwietering, M. H., Ross, T., Buchanan, R. L., Cole, M. B. (2009). Relating microbiological criteria to food safety objectives and performance objectives. *Food Control*, 20, 967-979.
- Van Waes, J. G., Starr, L., Maddox, J., Aleman, F., Voss, K. A., Wilberding, J. and Riley, R. T. (2005). Maternal fumonisin exposure and risk for neural tube defects: Mechanisms in an in vivo mouse model. *Birth Defects Res. A. Clin. Mol. Teratol.* 73, 487–497.
- Velasco, J., Dobarganes, M. C. (2002). Oxidative stability of virgin olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technologie*, 104, 661–676.
- Venditti, E., Bacchetti, T., Tiano, L., Carloni, P., Greci, L., Damiani, E. (2010). Hot vs. cold water steeping of different teas: Do they affect antioxidant activity? *Food Chemistry*. 119, 1597–1604.
- Vercellotti, J. R., St. Angelo Allen, J., Spanier, Arthur, M. (1992). Method for determining oxidation of vegetable oils by near-infrared spectroscopy lipid oxidation in food. *ACS Symposium Series*, 500. 1-11.
- Vetrani, C., Rivellese, A. A., Annuzzi, G., Mattila, I., Meudec, E., Hyötyläinen, T., Orešić, M., Aura, A.-M. (2014). Phenolic metabolites as compliance biomarker for polyphenol intake in a randomized controlled human intervention. *Food Research International*, doi:10.1016/j.foodres.2014.01.018.

- Villeneuve. P., Muderhwa, J.M., Graille, J., Haas, M.J., Mol. J., Catal, B. (2000). *Enzym*, 385, 113–148.
- Visioli, F., Caruso, D., Grande, S., Bosisio, R., Villa, M., Galli, G., Sirtori, C., Galli, C. (2005). Virgin Olive Oil Study (VOLOS): vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr*, 44,121-127.
- Visioli F, Grande S, Bogani P, Galli C. (2004). The role of antioxidants in the Mediterranean diet: focus on cancer. *Eur J Cancer Prev*, 13, 337-43.
- Von Low, E.C., Perabo, F.G.E., Siener, R., Müller, S.C. (2007). Facts and fiction of phytotherapy for prostate cancer: a critical assessment of preclinical and clinical dates. *In Vivo*. 21, 189-204.
- Walker, E., Pritchard, C., Forsythe, S. (2003). Hazard analysis critical control point and prerequisite program implementation in small and medium size food businesses. *Food Control*, 14, 169-174.
- Wallace, C., Williams, T. (2001). Pre-requisites: a help or a hindrance to HACCP?. *Food Control*, 12, 235-240.
- Wallace, C., Holyoak, L., Powell, C., Dykes, F. (2011). Re-thinking the HACCP team: an investigation into HACCP team knowledge and decision-making for successful HACCP development. *Food Research International*, 47(2), 236-245.
- Wallace, C., Powell, S., Holyoak, L. (2005). Development of methods for standardised HACCP assessment. *British Food Journal*, 107, 723-742.
- Wang, J., Zhang, B., Chen, S., (2011). Oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* mutants with a disrupted fatty acyl-CoA synthetase gene accumulate saturated fatty acid. *Process Biochemistry*, 46, 1436–1441.

- Waraho, T., Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M., McClements, D. J., Decker, E. A. (2009). Prooxidant mechanisms of free fatty acids in stripped soybean oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7112-7171.
- Waraho, T., McClements, D. J., Decker, E. A. (2011). Impact of free fatty acid concentration and structure on lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 129, 854-859.
- Wayner, D.D.M., burton, G.W., Ingold, K.U., Locke, S. (1985). Quantitative measurement of the total peroxy radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation: the important contribution made by plasma proteins. *FEBS Letter*, 187, 33- 37.
- Weems, J.J. (1992). *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestation, and antimicrobial susceptibility. *Clin. Infect. Dis.* 14, 756 – 766.
- Willett, W. C., Sacks, F., Trichopoulos, A., Drescher, G., Ferro-Luzzi, A., Helsing, E., et al. (1995). Mediterranean diet pyramid: A cultural model for healthy eating. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61, 1402S–1406S.
- Wooley, S., Petersen, B. (1994). *Lipases their Structure Biochemistry and Application*. Cambridge University Press, Cambridge UK.
- Yang, D. P., Kong, D. X., Zhang, H. Y. (2007). Multiple pharmacological effects of olive oil phenols. *Food Chemistry*. 104, 1269-1271.
- Yang, X.X., Lin, X.Z., Fan, T.J., Bian, J., Huang, X.H. (2008). Cloning and expression of lipP, a gene encoding a cold-adapted lipase from *Moritella* sp. 2-5-10-1. *Curr. Microbiol*, 56, 194–198.
- Yoshida, A., Hama, S., Nakashima, K., Kondo, A. (2011). Water activity dependence of performance of surface-displayed lipase in yeast cells: A

unique water requirement for enzymatic synthetic reaction in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 334–338.

Yu, Q., Purwaha, P., Ni, K., Sun, C., Mallik, S., Qian, S. Y. (2009). Characterization of novel radicals from COX-catalyzed arachidonic acid peroxidation. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 568–576.

Zamora, R., Alaiz, M., Hidalgo, F.J. (2001). Influence of cultivar and fruit ripening on olive (*Olea europaea*) fruit protein content, composition and antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4267–4270.

Zenil Lugo, N., Colinas León, M. T., Bautista Bañuelos, C., Vázquez Rojas, T. R., Lozoya Saldaña, H., Martínez Damián, M.T. (2014). Total phenols and antioxidant capacity estimated with DPPH/ABTS assays in roses on preservative solutions. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5, 1029-1039.

Zhang, C., Liu, X., Dong, X. (2004). *Syntrophomonas curvata* sp. nov., an anaerobe that degrades fatty acids in co-culture with methanogens. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54, 969–973.

Zhang, L., Lee, C.-H., Jahng, D. (2011). Restriction of linoleic acid inhibition of methanization of piggery wastewater and enhancement of its mineralization by adding calcium ions. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 86, 282–289.

Zhang, J.W., Zeng, R.Y. (2006). Cloning, expression and characterization of the cold active lipase (Lip3) from metagenomic DNA of an Antarctic deep sea sediment. *Prog. Biochem. Biophys.*, 33, 1207–1214.

Zhen-Qian, Z., Chun-Yun, G. (2009). Screening for lipase-producing *Enterobacter agglomerans* for biodiesel catalyzation. *African Journal of Biotechnology*, 8, 1273–1279.

- Zhu, H., Li, R. (2012). Oxidative stress and redox signaling mechanisms of inflammatory bowel disease: updated experimental and clinical evidence. *Exp Biol Med*, 237, 474-480.
- Zinedine, A., Mañes, J. (2009). Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco *Food Control*, 20, 334–344.
- Ziogas, V., Tanou, G., Molassiotis, A., Diamantidis, G., Vasilakakis, M. (2010). Antioxidant and free radical-scavenging activities of phenolic extracts of olive fruits. *Food Chemistry*, 120, 1097–1103.
- Zullo, B.A., Ciafardini, G. (2008). Lipolytic yeasts distribution in commercial extra virgin olive oil. *Food Microbiol*, 25, 970-977.
- Zullo, B.A., Cioccia, G., Ciafardini, G. (2010). Distribution of dimorphic yeast species in commercial extra virgin olive oil. *Food Microbiology*, 27, 1035-1042.



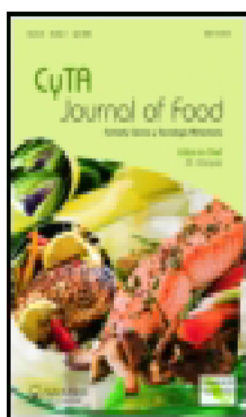
## **VI. PUBLICACIONES Y CONGRESOS**





## VI. PUBLICACIONES Y CONGRESOS

This article was downloaded by: [UGR-BTCA Gral Universitaria]  
On: 09 July 2014, At: 02:47  
Publisher: Taylor & Francis  
Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



### CyTA - Journal of Food

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.tandfonline.com/loi/tcyt20>

### Microbiological characterization of Picholine variety olives and analysis of olive oil produced in traditional oil mills in Morocco

I. El haouhay<sup>a</sup>, C. Samaniego-Sánchez<sup>a</sup>, A. Asehraou<sup>b</sup>, M. Villalón-Mir<sup>a</sup> & H. López-García de la Serrana<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain

<sup>b</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, University Mohamed Premier, 60 000 Oujda, Morocco

Published online: 04 Jul 2014.

**To cite this article:** I. El haouhay, C. Samaniego-Sánchez, A. Asehraou, M. Villalón-Mir & H. López-García de la Serrana (2014): Microbiological characterization of Picholine variety olives and analysis of olive oil produced in traditional oil mills in Morocco, *CyTA - Journal of Food*, DOI: [10.1080/19476337.2014.918178](https://doi.org/10.1080/19476337.2014.918178)

**To link to this article:** <http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2014.918178>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Taylor & Francis makes every effort to ensure the accuracy of all the information (the "Content") contained in the publications on our platform. However, Taylor & Francis, our agents, and our licensors make no representations or warranties whatsoever as to the accuracy, completeness, or suitability for any purpose of the Content. Any opinions and views expressed in this publication are the opinions and views of the authors, and are not the views of or endorsed by Taylor & Francis. The accuracy of the Content should not be relied upon and should be independently verified with primary sources of information. Taylor and Francis shall not be liable for any losses, actions, claims, proceedings, demands, costs, expenses, damages, and other liabilities whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with, in relation to or arising out of the use of the Content.

This article may be used for research, teaching, and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, redistribution, reselling, loan, sub-licensing, systematic supply, or distribution in any form to anyone is expressly forbidden. Terms & Conditions of access and use can be found at <http://www.tandfonline.com/page/terms-and-conditions>

## Microbiological characterization of Picholine variety olives and analysis of olive oil produced in traditional oil mills in Morocco

### Caracterización microbiológica de aceitunas variedad Picholine y análisis de aceites producidos en molinos de aceite tradicionales en Marruecos

N. El haouhay<sup>a</sup>, C. Samaniego-Sánchez<sup>a\*</sup>, A. Asehraou<sup>b</sup>, M. Villalón-Mir<sup>a</sup> and H. López-García de la Serrana<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Nutrition and Food Science, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain; <sup>b</sup>Department of Biology, Faculty of Sciences, University Mohamed Premier, 60 000 Oujda, Morocco

(Received 11 January 2014; final version received 21 April 2014)

The physico-chemical and microbiological characteristics of olive oil can be affected by both storage time of the olives before milling, and also the manner in which the oil is stored.

The aim of this study was to determine the microbiological profile of olives stored for different periods (7, 15 and 30 days) and to examine the olive oils obtained by measuring changes in physico-chemical and microbiological characteristics, including polyphenol contents and antioxidant capacity, after 3 and 6 months storage.

In all olive samples, and also in all the corresponding oils, the main micro-organisms found were mesophilic and psychrotrophic bacteria, yeasts and moulds. Enterobacteriaceae were not detected. It was noted that storage produced a significant increase in acidity, peroxide contents and ultraviolet absorbance, as well caused a significant reduction in polyphenol contents and antioxidant capacity.

**Keywords:** olive oil; mills; micro-organisms; oxidation; polyphenols; DPPH; ABTS; FRAP; DMPD

Las características fisicoquímicas y microbiológicas del aceite de oliva pueden ser afectadas tanto por el tiempo de almacenamiento de las aceitunas antes de su trituración, como de la manera en la cual el aceite es almacenado.

El objetivo de este estudio es determinar el perfil microbiológico de aceitunas almacenadas durante diferentes periodos (7, 15 y 30 días) y examinar los aceites de oliva obtenido, midiendo cambios en características fisicoquímicas y microbiológicas, incluyendo contenido de polifenoles y capacidad antioxidante, después de 3 y 6 meses de almacenamiento.

En todas las muestras de aceitunas, y también en los correspondientes aceites, los principales microorganismos encontrados han sido mesófilos y psicrotrofos, mohos y levaduras. Enterobacteriaceae no han sido detectadas. Se ha observado que este almacenamiento ha producido un aumento significativo en acidez, contenido de peróxidos, y absorbancia en ultravioleta, como también ha causado una reducción significativa en contenido de polifenoles y capacidad antioxidante.

**Palabras clave:** aceite de oliva; molino; microorganismos; oxidación; polifenoles; DPPH; ABTS; FRAP; DMPD

#### Introduction

Olive oil is the primary source of fat in the Mediterranean diet. In 2011, olive tree plantations covered approximately 840.000 hectares in Morocco, predominant by the Moroccan Picholine variety (96%), with about 75% of olive production used for oil extraction (COI, 2012).

Olive fruits are, in general, very sensitive to physical damage (Gutiérrez, Jiménez, Ruiz, & Albi, 1999) and to alteration by micro-organisms (Asehraou, Faid, & Jana, 1992). The milling of olives can lead to the development of mesophilic and psychrotrophic bacteria, moulds and yeasts (Ciafardini, Zullo, & Iride, 2006), and consequently the generation of lipases (Ertugül, Dönmez, & Takaç, 2007; Zullo & Ciafardini, 2008), responsible for triglyceride hydrolysis and the increase of free fatty acids, which become very sensitive to autoxidation in the bulk oil (Kinsella, Shimp, & Mai, 1978). In addition, oxidized triglycerides had high pro-oxidant activity (Kintsakis, Nanos, Polymenopoulos, Thomai, & Sfakiotakis, 1998), reduced the induction time of oxidation and increased the concentration of oxidized triglycerides.

Moreover, in water-oil emulsions, the autoxidation of fatty acids caused very high concentrations of hydroperoxides

(Waraho, McClements, & Decker, 2011) involved in polyphenol degradation (Landete et al., 2010).

Prolonged exposure of olive paste to oxygen during oil extraction reduced the contents of the phenolic compounds (García et al., 2001). Decrease of phenols may also be due to the growth of bacteria, yeasts and moulds during prolonged storage of olives under uncontrollable conditions before processing and during extraction (Rodríguez, Landete, de las Rivas, & Muñoz, 2008).

In Morocco, industrially produced olive oil is commercialized principally according to the regulation of the International Olive Oil Council (COI, 2008) and is mainly destined for export, whereas the majority of the population, especially in rural areas, uses oil produced for local consumption in small family or cooperative oil mills. Generally speaking, in these oil mills the olives are stored in plastic bags at ambient temperature for periods ranging from 1 day to several months before processing. The olives are processed in poor hygienic conditions, without washing. In the course of 1 day, between 400 and 1200 kg of olives are milled very slowly and the olive paste is subjected to several

\*Corresponding author. Email: csama@ugr.es

2 N. El haouhay et al.

pressings for 12 hours or more to complete the extraction. Olive oil is recovered after a single decantation and without filtration. The lack of good hygienic practices during oil extraction would increase the incidence of biological and chemical hazards in the edible product, and lead to detrimental effects on its subsequent quality. To obtain high-quality olive oil, good manufacturing practices should be implemented during all stages of processing, from collection and transportation of olives to mills as well as avoiding the storage of fruits in non-ventilated containers for many days before processing.

The aim of this study is the determination of the microbiological and chemical characteristics of different samples of olive oils produced in traditional oil mills in Morocco.

## Materials and methods

### Sampling

Samples of olives and olive oils of the Moroccan Picholine variety were collected from traditional mills in the rural area of Oujda in eastern Morocco during the 2011 harvest. The olives were classified into three groups according to the storage periods before milling: A1 (7 days storage), B1 (15 days storage) and C1 (30 days storage). Each group contained approximately 400 kg of olives distributed in plastic bags stored at temperature ambient of around 11°C and with a relative humidity of around 71%. At the end of storage for each group and just before the olives were milled, samples were taken at random from each of the bags, so that these samples (a total of 24 (8 for each group)) represent the total of the stored olives. Olive samples were taken aseptically and kept immediately at 4°C until microbiological analysis. A total of 78 samples of the oil obtained (26 for each group) were taken at different phases of oil extraction, stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles and kept in darkness at laboratory ambient temperature (17–23°C) until analysis after 3 and 6 months of storage; microbiological and chemical analysis, including total polyphenols and antioxidant capacity, follow-

ing Spanish regulations for olive oil.

### Microbiological analysis: mesophilic and psychrotrophic bacteria, moulds, yeasts and enterobacteriaceae in olives and olive oil

Samples of olives and olive oil were analysed according to the methods described by Majadahonda (1982). Results were expressed as colony forming units (CFU) of micro-organisms per g of olive (CFU/g) or per ml of olive oil (CFU/ml). The CFU numbers were also transformed into corresponding logarithmic numbers.

### Quality parameters: percentage of free fatty acids, peroxide index and ultraviolet light absorbance

Free acidity reported as percentage of oleic acid (%), peroxide value expressed as milliequivalents of active oxygen per kg of oil (meq O<sub>2</sub>/kg), extinction coefficients K<sub>232</sub> and K<sub>270</sub> calculated from absorption at 232 and 270 nm, respectively. All the parameters were determined in triplicate, according to methods established by the European Community, Commission Regulation (EEC, 1991) No. 2568/91 and subsequent

amendment European Community, Commission Regulation (EC) No. 1989/2003.

### Extraction of phenolic fraction

Phenolic compounds extraction was obtained using methanol/water (80:20, v/v) in agreement with data reported in the literature (Montedoro & Cantarelli, 1969; Vazquez Rincero & Janer del Valle, 1978). The procedure was based on that recommended by Montedoro, Servili, Baldioli, and Miniati (1992), with some modifications: 10 g of oil diluted in methanol to 80% (p/p) was homogenized by shaking for 60 min, the tubes were then centrifuged at 8000 rpm for 15 min, and the supernatant was recovered and used for analysis. Duplicate extractions were prepared from each sample and all extracts were measured three times in each assay.

### Analysis of total phenol contents

Total phenolic contents were determined using the Folin–Ciocalteu colorimetric method described by Singleton and Rossi (1965) and modified in our laboratory; 2.5 ml of de-ionized water and 500 µl of Folin–Ciocalteu reagent were added to 100 µl of methanolic extract. The mixture was allowed to stand for 5 min, and then 2 ml of a 10% aqueous Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution were added. The final volume was adjusted to 10 ml. Samples were allowed to stand for 90 min at room temperature before measurement at 700 nm versus the blank using a Beckman spectrophotometer. The amount of total phenolics was expressed as gallic acid equivalents (µg gallic acid/g of olive oil) using the calibration curve of gallic acid.

### Antioxidant capacity assays

#### DPPH assay

The radical scavenging activity of antioxidants against free radicals using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) was evaluated as described following Brand-Williams, Cuvelier, and Berset

(1995), with some modifications by Samaniego-Sánchez et al. (2007). A Lambda 25 UV/Vis spectrophotometer (Perkin-Elmer R, Madrid, Spain) was used for the DPPH assay, whose results were expressed as µM trolox/g oil.

#### ABTS assay

The total antioxidant capacity was measured following the method described by Samaniego-Sánchez et al. (2007), adapted to samples of extra virgin olive oil (EVOO). The radical was generated using potassium persulphate. Once the radical was formed, 2 ml of ABTS<sup>+</sup> was mixed with 100 µl of appropriately diluted oil (methanol extract) and the absorbance was measured at 734 nm once per min for 30 min. A Lambda 25 UV/Vis spectrophotometer (Perkin-Elmer R, Madrid, Spain) was used for ABTS<sup>+</sup> and results were expressed as µM trolox/g oil.

In addition, a study of the technical precision of the equipment to guarantee the quality of the measurements was made, because of the large number of samples to analyse, the unavoidably prolonged duration of these measurements, as well as the fact that the same instrument was shared with other researchers for other purposes, which could lead to the burnout of the instrument's visible light source with subsequent deviations in measurement accuracy. Therefore, a standard solution of gallic



acid (500 mg/l) was prepared, on which 10 TEAC value measurements were performed on different days.

#### FRAP assay

The antioxidant potential of olive oil extract was determined using the FRAP (ferric reducing antioxidant capacity) assay following Stratil, Klejdus, and Kubáň (2006). A potential antioxidant reduces the ferric ion ( $Fe^{3+}$ ) to the ferrous ion ( $Fe^{2+}$ ); the latter forms a blue complex ( $Fe^{2+}$ /TPTZ), which increases absorbance at 593 nm. Briefly, the FRAP reagent was prepared by mixing acetate buffer (3.1 g sodium acetate and 20 ml acetic acid per l, pH 3.6), a solution of 10 l M TPTZ in 40 l M HCl, and 20 mmol/l  $FeCl_3 \cdot H_2O$  at 10:1:1 (v/v/v). Absorbance readings of the coloured product [ferrous tripyridyltriazine complex] were measured at 593 nm using a Lambda 25 UV/Vis spectrophotometer (Perkin-Elmer R, Madrid, Spain). The results of the assay were expressed as  $\mu M$  trolox/g oil.

#### DMPD assay

The radical hydrogen-donor ability of samples was measured colorimetrically using the DMPD method (Fogliano, Verde, Randazzo, & Ritieni, 1999). DMPD (1.0 mM) was prepared in a 0.1 M sodium acetate buffer, pH 5.25, and the red radical cation (DMPD $^{+}$ ) was obtained by adding an aqueous  $FeCl_3$  solution to a final concentration of 0.1 mM. One millilitre of this solution was pipetted and measured at 505 nm. Antioxidant activity was determined by adding different concentrations of antioxidant to 1 ml of DMPD $^{+}$  solution and measuring the absorbance at 505 nm after 10 min at 25°C in a Lambda 25 UV/Vis spectrophotometer (Perkin-Elmer R, Madrid, Spain). The results of the DMPD assay were expressed as  $\mu M$  trolox/g oil.

#### Statistical analysis

The results obtained were expressed as mean and standard deviations. To determine the influence of storage time, among other

variables studied, when the variables fulfilled the parametric conditions, one-way analysis of variance (ANOVA) was used, and when the variables were non-parametric, the Kruskal–Wallis test was used. Fisher's least significant difference procedure was used to discriminate between the means of the variables when necessary.

The Kolmogorov–Smirnov test and the Bartlett test, as well as the Wilcoxon test, were used to test the normal distribution of variables and the homogeneity of variances.

Statistical analysis was performed using SPSS 20.0 (IBM® SPSS® Statistics 20.0) and Statgraphics Plus 4.1 software. Differences of  $p < 0.05$  were considered significant.

## Results and discussion

### Microbiological analysis: mesophilic and psychrotrophic bacteria, moulds, yeasts and enterobacteriaceae in olives and olive oil

#### Olive fruits

The evolution of the micro-organism population (mesophilic bacteria, psychrotrophic bacteria, mould and yeast) during storage of Moroccan Picholine olives destined for the extraction of olive oil, after 7, 15 and 30 days (groups A1, B1 and C1) was summarized in Table 1.

**Mesophilic and psychrotrophic bacteria.** The mesophilic bacteria were detected in all olive groups, without significant difference, whereas the number of psychrotrophic bacteria was reduced significantly after 30 days of storage (group C1), the change might be caused by a presence of mould or yeast together with bacteria (Table 1). Mesophilic and psychrotrophic bacteria were also detected by Panagou (2006) in black olives used to prepare a traditional type of table olives known as “naturally black dry salted olives”. Silva et al. (2011) also reported that a species of yeast found in brined olives exhibited both mycogenic and anti-bacterial activities against common food-borne pathogens.

**Mould and yeast.** A significant ( $p < 0.05$ ) increase was detected in the mould population with longer storage (from 7 to 30 days) (Table 1). The presence of mould in Moroccan olives during storage was reported previously by Asehraou et al. (1992). Roussos et al. (2006) isolated mould from spoiled olives and olive cake from olive oil production in Morocco.

Many moulds are able to develop on olives and produce mycotoxins after harvesting and during storage (El Adlouni, Tozlovanu, Naman, Faid, & Pfohl-Leszkowicz, 2006). Moreover, the presence of moulds can compromise the safety of

the product, especially in the case of mycotoxin-producing fungi (Zinedine & Mañes, 2009). The most representative microbiota of black olives were species of moulds that may be associated with food poisoning due to their mycotoxins (Asehraou et al., 1992).

The yeast population increased significantly ( $p < 0.05$ ) during storage, (from 7 to 30 days) (Table 1). The behaviour of yeasts was in good agreement with previous published works in olive brines (Alves, Gonçalves, & Quintas, 2012; Arroyo-López, Querol, Bautista-Gallego, & Garrido-Fernández, 2008).

Table 1. Quantity of micro-organisms (log<sub>10</sub> CFU/g) obtained in Moroccan Picholine olives stored for different periods.

Tabla 1. Cantidad de microorganismos (log<sub>10</sub> CFU/g) obtenidos en aceitunas variedad Picholine marroquí almacenado a diferentes tiempos.

Groups of samples	Storage time (days)	Mesophilics <sup>a</sup>	Psychrotrophics <sup>a</sup>	Moulds <sup>a</sup>	Yeasts <sup>a</sup>
A1	7	4.10 ± 3.78 a	4.84 ± 3.84 b	3.40 ± 2.76 a	4.09 ± 3.65 c
B1	15	4.06 ± 3.84 a	5.08 ± 3.55 c	3.96 ± 2.18 b	5.26 ± 4.95 b
C1	30	4.19 ± 3.87 a	4.65 ± 3.69 a	4.04 ± 3.04 c	5.30 ± 3.02 a

Note: <sup>a</sup>Means ± SD of three replicates, n = 24.

Means followed by the same letter in the same micro-organism are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

Nota: <sup>a</sup>Promedio ± SD de tres réplicas, n = 24.

Promedios seguidos de la misma letra no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

4 N. El haouhay et al.

Rodríguez-Gómez, Arroyo-López, López-López, Bautista-Gallego, and Garrido-Fernández (2010) reported that yeasts were found in high proportions during the ripe olive storage of Manzanilla and Hojiblanca cultivars. Moreover, several yeasts were obtained directly from natural black olive fermentations (Coton, Coton, Levert, Casaregola, & Sohler, 2006; Nisiotou, Chorianopoulos, Nychas, & Panagou, 2010) and green table olive fermentations (Bautista-Gallego et al., 2011). Therefore, it was reported that yeasts were the most relevant micro-organisms in the fermentation of cracked green table olives (Alves et al., 2012).

The presence of bacteria and fungi in olives may modify the nutritional composition of the olive oil as well as its organoleptic characteristics.

#### Olive oil

The results obtained on the evolution of micro-organic populations (mesophilic bacteria, psychrotrophic bacteria, mould and yeast) in groups A, B and C of olive oil extracted from olives stored for 7, 15 and 30 days, respectively, were summarized in Table 2.

A rich microflora was showed in olive oil recovered after a single decantation (Ciafardini & Zullo, 2002). The micro-organisms found in the oil were derived from the olives' phyllosphere which, during the crushing of the olives, migrate into the oil together with the solid parts of the fruit and micro-drops of vegetation water (Zullo & Ciafardini, 2008). The presence of vegetation water with oil may lead to formation of an oil-in-water emulsion. In fact, the presence of water in oil showed an important role in both the growth of micro-organisms and their enzyme function (Yoshida, Hama, Nakashima, & Kondo, 2011). There more, catalytic reaction of lipases took place at the lipid-water interface, a phenomenon known as interfacial activation (Schmid & Verger, 1998).

**Mesophilic and psychrotrophic bacteria.** Mesophilic bacteria were demonstrated in all groups of olive oil after 3 months storage with a significant difference ( $p < 0.05$ ). After 6 months

storage, the number of these bacteria decreased significantly ( $p < 0.05$ ). Similarly, the psychrotrophic bacteria contents found in the oil fell significantly between 3 and 6 months storage (Table 2), which can be explained by a reduction of nutrients and/or accumulation of products not favourable for bacterial growth.

Indeed, olive oil has been found to be the most suitable carbon source for mesophilic and psychrotrophic bacteria to induce lipase (Liu, Chen, Wang, & Chang, 2011; Shafei & Abd-Elsalam, 2005; Zhen-Qian & Chun-Yun, 2009).

**Mould and yeast.** The dynamic mould population in the olive oil samples showed after 3 months storage was completely eliminated after 6 months storage, a reduction possibly caused by the exhaustion of available substrates (Table 2). Different works described the importance of mould and yeast in lipase production (Belhaj-Ben Romdhane, Fendri, Gargouri, Gargouri, & Belghith, 2010; Contesini, Lopes, Macedo, Nascimento, & Carvalho, 2010; Sathish Yadav et al., 2011; Yoshida et al., 2011). Moreover, the fungal growth in olives was associated with mycotoxin production (Eltem, 1996; Leontopoulos, Sifaka, & Markaki, 2003) and hence its presence in the processing environment showed a potential health risk and should be avoided (Hondrodinou, Kourkoutas, & Panagou, 2011).

In fact, yeasts were found to coexist with bacteria and mould after 3 months storage, without significant difference between groups (Table 2). After 6 months storage, groups A and B demonstrated a significant growth, where group C proved a significant reduction.

The absence of moulds would result in a limited competition for nutrients between the other three kinds of micro-organisms, in favour of yeast. Besides, species of yeast in table olives could be destructive for the rest of the bacterial flora (Hernández et al., 2008). Further, some human pathogen yeasts were found in commercial EVOO (Zullo & Ciafardini, 2008). It should be emphasized that the existence of micro-organisms in olive oil may be detrimental to human health.

#### Quality parameters: percentage of free fatty acids, peroxide index and ultraviolet light absorbance

The quality values of all studied oils (groups A, B and C) were summarized in Table 3. After 3 months storage, the oil of group A had  $0.64 \pm 0.21\%$  acidity and could be classed as extra virgin

oil, group B had  $1.36 \pm 0.39\%$  acidity and might be classified as virgin oil and group C had  $4.19 \pm 3.88\%$  acidity, was classed as lampante. It showed that the longer the storage time of olives before milling, the higher the acidity of the resulting oil, with statistically significant differences between groups studied ( $p < 0.05$ ).

Table 2. Quantity of micro-organisms (log<sub>10</sub> CFU/ml) obtained in olive oil produced in traditional Moroccan olive oil mills and stored for 3 and 6 months.

Tabla 2. Cantidad de microorganismos (log<sub>10</sub> CFU/ml) obtenidos en aceite de oliva producido en molino de aceite tradicional marroquí durante tiempo de almacenamiento (3 y 6) meses.

Groups of samples	Mesophiles <sup>a</sup>		Psychrotrophics <sup>a</sup>		Moulds <sup>a</sup>		Yeasts <sup>a</sup>	
	3 months	6 months	3 months	6 months	3 months	6 months	3 months	6 months
A	3.33 ± 3.19c	2.88 ± 2.35d	4.53 ± 4.22a	4.10 ± 3.39c	1.96 ± 1.80a	–	2.71 ± 2.51a	4.46 ± 4.03b
B	3.46 ± 3.19b	2.88 ± 2.51d	3.96 ± 3.05b	2.55 ± 2.30d	1.80 ± 1.73a	–	2.75 ± 2.65a	3.83 ± 3.53c
C	3.29 ± 3.04a	2.31 ± 2.24e	4.05 ± 3.98b	2.68 ± 2.59d	2.24 ± 2.12a	–	2.87 ± 2.32a	2.77 ± 2.75d

Note: A (oil obtained from olives stored for 7 days), B (oil obtained from olives stored for 15 days) and C (oil obtained from olives stored for 30 days).

<sup>a</sup>Means ± SD of three replicates, n = 78.

Means followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

Note: A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas 30 días).

<sup>a</sup>Promedio ± SD de tres réplicas, n = 78.

Promedios seguidos de la misma letra no difieren significativamente ( $p < 0.05$ ).

Table 3. Evolution of the quality parameters of olive oils obtained in traditional Moroccan olive oil mills and stored for 3 and 6 months.

Tabla 3. Evolución de parámetros de calidad de aceite de oliva obtenido en molino de aceite tradicional marroquí durante tiempo de almacenamiento (3 y 6) meses.

Groups of samples	Acidity (% oleic acid) <sup>a</sup>		Peroxides index (meq O <sub>2</sub> /kg) <sup>a</sup>		K270 <sup>a</sup>		K232 <sup>a</sup>	
	3 months	6 months	3 months	6 months	3 months	6 months	3 months	6 months
A	0.64 ± 0.21c	0.77 ± 0.24b	3.35 ± 1.04a	7.56 ± 3.34c	0.114 ± 0.03a	0.210 ± 0.05c	1.959 ± 0.35b	2.47 ± 0.55d
B	1.36 ± 0.39c	1.51 ± 0.40b	3.71 ± 1.78a	8.43 ± 3.09c	0.132 ± 0.04a	0.222 ± 0.06c	2.134 ± 0.16b	2.529 ± 0.39d
C	4.19 ± 3.88a	4.70 ± 4.07d	7.26 ± 5.27b	13.79 ± 8.26 d	0.214 ± 0.12b	0.321 ± 0.12 d	2.605 ± 1.02a	3.330 ± 1.68c

Note: A (oil obtained from olives stored for 7 days), B (oil obtained from olives stored for 15 days) and C (oil obtained from olives stored for 30 days).

<sup>a</sup>Means ± SD of three replicates, n = 78.

Means followed by the same letter are not significantly different (p &lt; 0.05).

Nota: A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas 30).

<sup>a</sup>Promedio ± SD de tres réplicas, n = 78.

Promedios seguidos de la misma letra no difieren significativamente (p &lt; 0,05).

After 6 months storage, the acidity in all groups rose with significant differences ( $p < 0.05$ ) between the oils stored for 3 and 6 months, showed that the degree of acidity increased with storage time of the oil, in agreement with results of Samaniego-Sánchez, Oliveras-López, Quesada-Granados, Villalón-Mir, and López-García de la Serrana (2012). That increase might be due to the presence of mesophilic and psychrotrophic bacteria, moulds and yeasts that produced lipases and caused triglyceride hydrolysis (Ciafardini et al., 2006; Ertuğrul et al., 2007; Zullo & Ciafardini, 2008).

The peroxide index determined 3 months after production of the oil showed values below the limits established by EU Regulation 1989/2003 (European Community Commission Regulation [EC], 2003). Table 3 indicated a rise in the peroxide index with increasing storage time of the olives before milling, with statistically significant differences between the samples of the group analysed ( $p < 0.05$ ). After 6 months storage of the oil, the peroxide index increased in all three groups, possibly due to the photo-oxidation reactions of the olives during long storage before oil extraction and also to long exposure of the olive paste

to air and light during extraction. Rise in peroxide index caused by production of free fatty acids (Paradiso, Gomes, Nasti, Caponio, & Summo, 2010), as a result of triglyceride hydrolysis.

The peroxide index rose with increased storage time of olives and oil, with statistically significant differences between the oils stored for 3 and 6 months ( $p < 0.05$ ).

The third parameter was information on the presence of conjugated trienes (K270) formed during autooxidation of the oil because of the positional shift of double bonds. In all the samples, the value of the K270 coefficient after 3 months was found to be lower than the permitted legal limits (Table 3).

After 6 months storage, the K270 values increased (Table 3), with a statistically significant difference between samples of these groups at 3 and 6 months storage of the oil ( $p < 0.05$ ). The increase in the extinction coefficient values during storage could be due to the presence of conjugated dienes and would indicate a significant autooxidation in the oils after prolonged storage time.

The last parameter examined was the K232 values. The oils in a medium state of oxidation showed maximum absorbance at 232 nm (European Community Commission Regulation [EC], 2003). At 3 months the value of the K232 coefficient (Table 3) was found to be within the permitted legal limits in groups A and B, whereas in group C it exceeded the established legal limit. There were significant differences between the samples of the

groups indicated ( $p < 0.05$ ), and an increase in the K232 value showed with increased storage time of the olives.

After 6 months storage, the value of the K232 coefficient exceeded the permitted legal limits in all the oils ( $p < 0.05$ ). During storage, statistically significant variations took place, depending on both storage of olives before milling and storage of the corresponding oils ( $p < 0.05$ ).

The increase in the level of K232 could be explained by the fact that free fatty acids caused by micro-organisms caused oxidation of triglycerides, which in turn increased the level of oxidation of the oil (Gomes, Delcuratolo, Paradiso, Summo, & Caponio, 2011). The higher the concentration of oxidized triglycerides, the higher the oxidation level of the oil.

The fact that olives were crushed with no prior cleaning or washing could lead to the migration of transition metals, such as Cu or Fe, into the oil. In addition, separation of the oil from vegetation water by simple decantation and without filtration implied inclusion of some water in the oil, led to the formation of possible oil-in-water emulsions where transition metals could accelerate oxidation of the oil (Waraho, Cardenia, Rodriguez-

Estrada, McClements, & Decker, 2009).

Presence of free fatty acids in oil-in-water emulsion accelerated oil oxidation and autooxidation (Waraho et al., 2011).

The statistical analyses indicated significant differences between groups A and C and groups B and C in all the parameters examined after both 3 and 6 months storage. The non-significant differences between groups A and B indicated that oils obtained from olives stored between 7 and 15 days (groups A and B) were less oxidized than oils obtained from olives stored for more than 15 days. Further, olives antioxidant components, especially phenolic compounds, could limit the formation of oxidizing components in the olives stored for 2 weeks before crushing (groups A1 and B1). However, the oil samples in group C, obtained from olives stored for up to 30 days (group C1), were significantly affected by increased oxidation, and this might be due to a reduction in antioxidant components. It is important to consider that the storage of olives can affect the formation of certain volatile compounds resulting in the formation and degradation of different hydroperoxides formed by oxidation processes, and also that they can directly influence all the tested quality parameters (Frankel, 1993). In general, an increase in these parameters can affect the conservation of the olive oil, as well as their nutritive and organoleptic characteristics. According to the results obtained after 3 months storage, 26.08% of oil samples were classified as extra virgin, 17.39% as



6 N. El haouhay et al.

virgin olive oil and 56.52% as lampante oil. After 6 months storage, 100% of the oils were classified as lampante.

#### Analysis of total phenol content

The total polyphenol contents (Figure 1) were highest in group A, lower in group B and lowest in group C, with statistically significant differences between the samples of the studied groups ( $p < 0.05$ ). The total amount of polyphenols decreased as storage time of the olives increased. That decrease might be due to hydrolysis and oxidation (Sicari, Gruffe, Lonadj, & Poiana, 2010).

After 6 months, the total quantity of polyphenols was decreased in all three groups with statistically significant differences between the three groups ( $p < 0.05$ ) (Figure 1), indicated that the longer the storage time of the oil, the greater the decrease in polyphenols. That reduction in the amount of total polyphenols could be explained by hydrolysis and oxidation, which could take place during storage of the olives and exposure to the air (Ciafardini & Zullo, 2000; Servili et al., 2008), together with lack of hygiene, led to the development of micro-organisms capable of degrading the polyphenols (Ciafardini & Zullo, 2000, 2002; Landete et al., 2010).

#### Antioxidant capacity assays

##### DPPH assay

The DPPH assay determined the evolution over time of the variations in measured antioxidant capacity according to storage time of the olives before milling and storage time of the corresponding oils ( $p < 0.05$ ). After 3 months oil storage, the highest

values were found in group A, followed by group B, and the lowest value in group C (Figure 2(a)).

The difference in antioxidant capacity between the three groups of samples could be explained by the different storage times of the olives before milling. After 6 months storage, the antioxidant

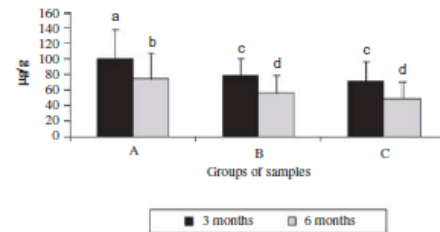


Figure 1. Changes in total phenol contents ( $\mu\text{g/g}$  gallic acid) of the olive oil obtained in traditional Moroccan olive oil mills after 3 and 6 months storage.

Note: A (oil obtained from olives stored for 7 days), B (oil obtained from olives stored for 15 days) and C (oil obtained from olives stored for 30 days). Means  $\pm$  SD of three replicates,  $n = 78$ . Means followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

Figura 1. Cambios en contenido total de fenoles ( $\mu\text{g/g}$  glicico) de aceite de oliva obtenido en molino de aceite tradicional marroqui durante tiempo de almacenamiento (3 y 6) meses.

Nota: A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas 30 días). Promedio  $\pm$  SD de tres réplicas,  $n = 78$ . Promedios seguidos de la misma letra no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

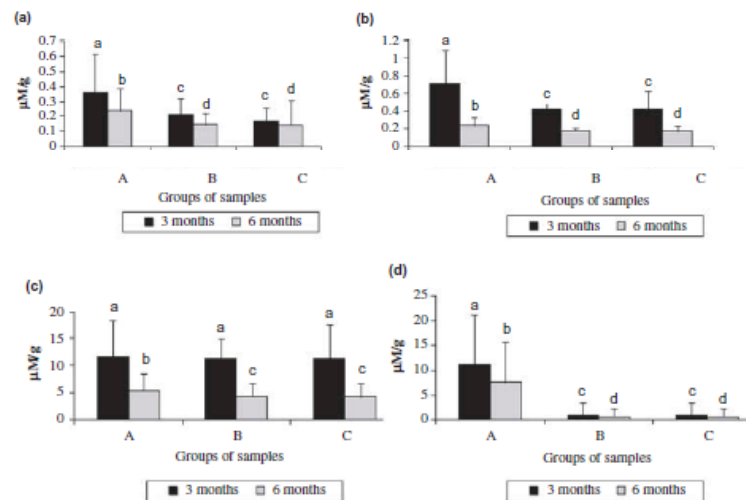


Figure 2. Evolution of antioxidant capacity: TEAC values ((a) DPPH+ test, (b) ABTS+ test, (c) FRAP test, (d) DMPD test) of the olive oil obtained in traditional Moroccan olive oil mills after 3 and 6 months storage.

Note: A (oil obtained from olives stored for 7 days), B (oil obtained from olives stored for 15 days) and C (oil obtained from olives stored for 30 days). Means  $\pm$  SD of three replicates,  $n = 78$ . Means followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

Figura 2. Evolución de capacidad antioxidante: Valores TEAC ((a) test de DPPH+, (b) test de ABTS+, (c) test de FRAP, (d) test de DMPD) de aceite de oliva obtenido en molino de aceite tradicional marroqui durante tiempo de almacenamiento (3 y 6) meses.

Nota: A (Aceites de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas 7 días), B (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas 15 días) y C (Aceite de oliva obtenido de las aceitunas almacenadas 30 días). Promedio  $\pm$  SD de tres réplicas,  $n = 78$ . Promedios seguidos de la misma letra no difieren significativamente ( $p < 0,05$ ).

capacity of the oil fell further to  $0.237 \pm 0.15$   $\mu\text{mol/g}$  (group A),  $0.144 \pm 0.07$   $\mu\text{mol/g}$  (group B) and  $0.139 \pm 0.17$   $\mu\text{mol/g}$  (group C).

The oxidative stability of the samples was significantly different between the two storage periods of 3 and 6 months ( $p < 0.05$ ). There is a decrease in oxidative stability during storage of olives and oil which could be explained by the increase in the level of oxidation and reduction of antioxidant compounds.

#### ABTS assay

During the ABTS assays, consumption of coloured ABTS+ was monitored by observing the decrease in absorbance (Figure 2(b)). After 3 months storage, the measurements decreased progressively from group A to group C, with statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the groups, since the antioxidant components capable of reducing the effect of the radical ABTS+ decreased progressively with longer storage time of the olives destined for extraction of the oil.

A statistically significant ( $p < 0.05$ ) decrease in antioxidant activity was observed in olive oil between 3 and 6 months storage. That reduction might be due to the accumulation of oxidizing components, the autoxidation of oil and the decrease of antioxidant compounds.

#### FRAP assay

The FRAP method measured changes in absorbance (Figure 2(c)) represented the evolution over time of the variations in antioxidant capacity according to storage time of olives before milling and storage time of the corresponding oils. The antioxidant capacity measured by that method showed that there were no statistically significant differences between the three groups ( $p > 0.05$ ). After 6 months of oil storage, the antioxidant capacity measured by this method decreased in all three groups (Figure 2(c)), with statistically significant differences ( $p < 0.05$ ), indicated that the longer the storage time of the oil, the greater the decrease in antioxidant capacity measured at level of the antioxidant polyphenols capable of transferring electrons to reduce  $\text{Fe}^{2+}$  to  $\text{Fe}^{3+}$ .

#### DMPD assay

Antioxidant capacity measured by the DMPD method (Figure 2(d)), showed statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the groups after 3 months of oil storage, indicated that the longer the storage time of the olives before milling, the greater the reduction of the antioxidant capacity. This antioxidant capacity reduction and the reduction of polyphenol antioxidants, resulted from the prolonged exposure of the olives to agents such as air and light. After 6 months storage, the antioxidant values in all three groups decreased further, with statistically significant differences ( $p < 0.05$ ) between the groups, which indicated that the longer the storage of the oil, the lower the antioxidant activity measured by DMPD.

Statistical analyses indicated a significant reduction in the total contents of phenolic compounds during storage of the olives and the resulting oil.

Statistically significant differences in reduction of phenols and antioxidant compounds found between groups A and B and between groups A and C, indicated that oils (A) obtained from olives stored for 1 week (A1) had relatively

high total contents of polyphenols and antioxidant components, whereas in oils obtained from olives stored for more than 15 days (B1 and C1) those components were found significantly reduced. The important degradation might show that the maximum of phenols and antioxidant components were spent during the first week of olive storage to limit oxidant effects.

#### Conclusions

The olive fruit showed growth of mesophilic and psychrotrophic bacteria, moulds and yeasts in all sample groups. In fact, after 3 months of storage, all sample groups of olive oil showed the presence of the same micro-organisms found in the olive fruit. Storage of the unfiltered olive oil after a single decantation turned it into a medium suitable for growth of micro-organisms. After 6 months storage, we found a significant reduction in bacteria and yeast and a complete elimination of moulds. The changes in micro-organic contents in the oil were possibly due to exhaustion of the available nutrients or/and accumulation of products not favourable for their growth. The presence of micro-organisms in olive oil may deteriorate its quality and make it detrimental to human health. We found significant increases in acidity, the peroxide index and ultraviolet absorbance, which indicated that storage of olives before milling and storage of the oil in these conditions were damaging to the quality of the oil. The lack of a significant difference in the variances determined could indicate that the phenolic and antioxidant components reduced the effect of oxidation during the first 15 days of olive storage. The total quantity of phenols in olive oil fell significantly during storage of the olives and the oil, likewise, we found a decrease in antioxidant capacity after 3 and 6 months storage, as determined by DPPH, ABTS, FRAP and DMPD. There were significant differences in all quality parameters, total phenols and antioxidant capacity in the oils after 3 and 6 months storage, which indicated that the storage in uncontrolled conditions accelerated the deterioration of the components in the oil.

Finally, the traditional processes practised in Moroccan olive oil mills led to the growth of micro-organisms: mesophilic and psychrotrophic bacteria, moulds and yeasts in olives and their corresponding oils. The storage of olives and olive oil in uncontrolled conditions had a negative effect on the quality and shelf life of olive oil, as indicated by the increase in acidity and oxidation. Consequently, over 56% of the olive oil sampled was lampante after 3 months storage, and after 6 months the percentage rose to 100%. Besides, a significant and important reduction of polyphenol contents and antioxidant capacity were detected in olive oil obtained from olive fruits stored for more than 7 days. Olive oil produced in uncontrolled conditions not only was of poor quality, but could put human health at risk.

#### Acknowledgements

We express our gratitude to Dr. R. I. MacCandless for his assistance in improving the English of the manuscript.

#### References

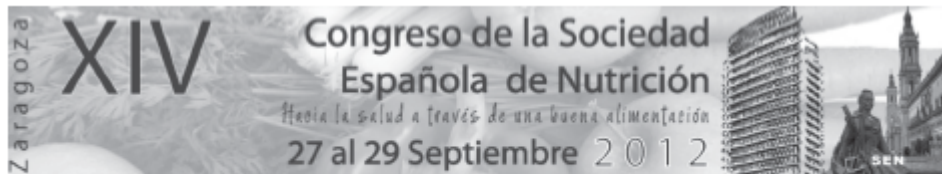
- Alves, M., Gonçalves, T., & Quintas, C. (2012). Microbial quality and yeast population dynamics in cracked green table olives' fermentations. *Food Control*, 23, 363–368. doi:10.1016/j.foodcont.2011.07.033



- Arroyo-López, F. N., Quero, A., Bautista-Gallego, J., & Garrido-Fernández, A. (2008). Role of yeasts in table olive production. *International Journal of Food Microbiology*, 128, 189–196. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.018
- Asehraoui, A., Faid, M., & Jana, M. (1992). Physico-chemical properties and the microflora of Moroccan black table olives. *Grasas y Aceites*, 43, 130–133. doi:10.3989/gya.1992.v43.i3.1164
- Bautista-Gallego, J., Rodríguez-Gómez, F., Barrio, E., Quero, A., Garrido-Fernández, A., & Arroyo-López, F. N. (2011). Exploring the yeast biodiversity of green table olive industrial fermentations for technological applications. *International Journal of Food Microbiology*, 147, 89–96. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.03.013
- Belhaj-Ben Romdhane, I., Fendri, A., Gargouri, Y., Gargouri, A., & Belghith, H. (2010). A novel thermoactive and alkaline lipase from *Thermomyces thermophilus* fungus for use in laundry detergents. *Biochemical Engineering Journal*, 53, 112–120. doi:10.1016/j.bej.2010.10.002
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*, 28, 25–30. doi:10.1016/S0023-6438(95)80008-5
- Ciafardini, G., & Zullo, B. A. (2000). B-glucosidase activity in olive brine during the microbiological debittering process. *Advances Food Sciences (CMTL)*, 22, 69–76.
- Ciafardini, G., & Zullo, B. A. (2002). Microbiological activity in stored olive oil. *International Journal of Food Microbiology*, 75, 111–118. doi:10.1016/S0168-1605(01)00739-5
- Ciafardini, G., Zullo, B. A., & Iride, A. (2006). Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. *Food Microbiology*, 23, 60–67. doi:10.1016/j.fm.2005.01.009
- Conseil Oléicole International (COI). (2008). *Norme commerciale applicable aux huiles d'olive et aux huiles de grignons d'olive*. 3 Novembre 2008. COI/T.15/NC n° 3/Rév.
- Contesini, F. J., Lopes, D. B., Macedo, G. A., Nascimento, M. G., & Carvalho, P. O. (2010). *Aspergillus* sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 67, 163–171. doi:10.1016/j.molcatb.2010.07.021
- Coton, E., Coton, M., Levert, D., Casaregola, S., & Sohier, D. (2006). Yeast ecology in french cider and black olive natural fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 130–135. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.016
- El Adlouni, C., Tozkovani, M., Naman, F., Faid, M., & Pfohl-Leschowicz, A. (2006). Preliminary data on the presence of mycotoxins (ochratoxin A, citrinin and aflatoxin B1) in black table olives "Greek style" of Moroccan origin. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 507–512. doi:10.1002/mnfr.200600055
- Eltem, R. (1996). Growth and aflatoxin B1 production on olives and olive paste by moulds isolated from 'Turkish-style' natural black olives in brine. *International Journal of Food Microbiology*, 32, 217–223. doi:10.1016/0168-1605(96)01115-4
- Ertugrul, S., Dönmez, G., & Takaç, S. (2007). Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. from olive mill wastewater and improving its enzyme activity. *Journal of Hazardous Materials*, 149, 720–724. doi:10.1016/j.jhazmat.2007.04.034
- European Community Commission Regulation (EC). (2003). N° 1989/2003 Amending regulation (EEC) no 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-pomace oil and on the relevant methods of analysis. *Official Journal of the European Communities*, November 6, L295, 57–77.
- European Community, Commission Regulation (EEC). (1991). N° 2568/91 On the characteristics of olive oil and olive-pomace oil and on the relevant methods of analysis. *Official Journal of the European Communities*, July 11, L248, 1–83.
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., & Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1035–1040. doi:10.1021/jf980496s
- Frankel, E. (1993). Formation of headspace volatiles by thermal decomposition of oxidized fish oils vs. oxidized vegetable oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70, 767–772. doi:10.1007/BF02542598
- García, A., Brenes, M., Martínez, F., Alba, J., García, P., & Garrido, A. (2001). High-performance liquid chromatography evaluation of phenols in virgin olive oil during extraction at laboratory and industrial scale. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 625–629. doi:10.1007/s11746-001-0316-x
- Gomes, T., DeLaurato, D., Paradiso, V. M., Summo, C., & Caponio, F. (2011). Pro-oxidant activity of oxidized triacylglycerols in olive oil and comparison with pro-oxidant action of polar triacylglycerol oligopolymers. *LWT – Food Science and Technology*, 44, 1236–1239. doi:10.1016/j.lwt.2010.12.004
- Gutiérrez, F., Jimenez, B., Ruiz, A., & Albi, M. A. (1999). Effect of olive ripeness on the oxidative stability of virgin olive oil extracted from the varieties picual and hojiblanca and on the different components involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 121–127. doi:10.1021/jf980684i
- Hernández, A., Martín, A., Córdoba, M. G., Benito, M. J., Aranda, E., & Pérez-Nevedo, F. (2008). Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *International Journal of Food Microbiology*, 121, 178–188. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.044
- Hondrodinou, O., Kourkoutas, Y., & Panagou, E. Z. (2011). Efficacy of natamycin to control fungal growth in natural black olive fermentation. *Food Microbiology*, 28, 621–627. doi:10.1016/j.fm.2010.11.015
- International Olive Council (COI). (2012). *Politiques – Maroc 2012*. Retrieved from <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/130-survey-and-assessment-division>
- Kinsella, J. E., Shimp, J. L., & Mai, J. (1978). The proximate composition of several species of fresh water fishes. *Food and Life Sciences Bulletin*, 69, 1–20.
- Kiritakis, A., Nanos, G. D., Polymenopoulos, Z., Thomai, T., & Sfakiotakis, E. M. (1998). Effect of fruit storage conditions on olive oil quality. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 75, 721–724. doi:10.1007/s11746-998-0212-7
- Landete, J. M., Rodríguez, H., Curiel, J. A., de las Rivas, B., López de Felipe, F., & Muñoz, R. (2010). Degradation of phenolic compounds found in olive products by *Lactobacillus plantarum* strains. In V. R. Preedy & R. R. Watson (Eds.), *Olive and Olive Oil in Health and Disease Prevention* (pp. 387–396). San Diego: Elsevier.
- Leontopoulos, D., Siafaka, A., & Markaki, P. (2003). Black olives as substrate for *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin B1 production. *Food Microbiology*, 20, 119–126. doi:10.1016/S0740-0020(02)00080-1
- Liu, C. H., Chen, C. Y., Wang, Y. W., & Chang, J. S. (2011). Fermentation strategies for the production of lipase by an indigenous isolate *Burkholderia* sp. C20. *Biochemical Engineering Journal*, 58–59, 96–102. doi:10.1016/j.bej.2011.09.001
- Majadahonda. (1982). *Técnicas para el análisis microbiológicos de alimentos y bebidas del centro nacional de alimentación y nutrición*. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto Nacional de Sanidad. Gobierno de España.
- Montedoro, G., & Cantarelli, C. (1969). Phenolic substances present in olive oils. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 46, 115–124.
- Montedoro, G. F., Servili, M., Baldioli, M., & Miniati, E. (1992). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. I. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1571–1576. doi:10.1021/jf00021a019
- Nisiotou, A. A., Chorianopoulos, N., Nychas, G. J. E., & Panagou, E. Z. (2010). Yeast heterogeneity during spontaneous fermentation of black conservolea olives in different brine solutions. *Journal of Applied Microbiology*, 108, 396–405. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04424.x
- Panagou, E. Z. (2006). Greek dry-salted olives: Monitoring the dry-salting process and subsequent physico-chemical and microbiological profile during storage under different packing conditions at 4 and 20°C. *Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie*, 39, 322–329.
- Paradiso, V. M., Gomes, T., Nasti, R., Caponio, F., & Summo, C. (2010). Effects of free fatty acids on the oxidative processes in purified olive oil. *Food Research International*, 43, 1389–1394. doi:10.1016/j.foodres.2010.04.015
- Rodríguez, H., Landete, J. M., de las Rivas, B., & Muñoz, R. (2008). Metabolism of food phenolic acids by *Lactobacillus plantarum* CECT 748T. *Food Chemistry*, 107, 1393–1398. doi:10.1016/j.foodchem.2007.09.067
- Rodríguez-Gómez, F., Arroyo-López, F. N., López-López, A., Bautista-Gallego, J., & Garrido-Fernández, A. (2010). Lipolytic activity of the yeast species associated with the fermentation/storage phase of ripe olive processing. *Food Microbiology*, 27, 604–612. doi:10.1016/j.fm.2010.02.003

- Roussos, S., Zaouia, N., Salih, G., Tantaoui-Elaraki, A., Lamrani, K., Cheheb, M. ... Ismaili-Alaoui, M. (2006). Characterization of filamentous fungi isolated from Moroccan olive and olive cake: Toxicogenic potential of aspergillus strains. *Molecular Nutrition & Food Research*, 50, 500–506. doi:10.1002/mnfr.200600005
- Samaniego-Sánchez, C., Oliveras-López, M. J., Quesada-Granados, J. J., Villalón-Mir, M., & López-García de la Serna, H. (2012). Alterations in picual extra virgin olive oils under different storage conditions. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 194–204. doi:10.1002/ejlt.201100191
- Samaniego-Sánchez, C., Troncoso González, A. M., García-Parilla, M. C., Quesada Granados, J. J., López García de la Serrana, H., & López Martínez, M. C. (2007). Different radical scavenging tests in virgin olive oil and their relation to the total phenol content. *Analytica Chimica Acta*, 593, 103–107. doi:10.1016/j.aca.2007.04.037
- Sathish Yadav, K. N., Adsul, M. G., Bastawde, K. B., Jadhav, D. D., Thulasiram, H. V., & Gokhale, D. V. (2011). Differential induction, purification and characterization of cold active lipase from *Yarrowia lipolytica* NCIM 3639. *Bioresource Technology*, 102, 10663–10670. doi:10.1016/j.biortech.2011.09.013
- Schmid, R. D., & Verger, R. (1998). Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie International Edition*, 37, 1608–1633. doi:10.1002/(SICI)1521-3773(19980703)37:12<1608::AID-ANIE1608>3.0.CO;2-V
- Servili, M., Taticchi, A., Esposito, S., Urbani, S., Selvaggini, R., & Montodorò, G. (2008). Influence of the decrease in oxygen during malaxation of olive paste on the composition of volatiles and phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10048–10055. doi:10.1021/jf800694h
- Shafei, M. S., & Abd-Elsalam, I. S. (2005). Role of some fermentation parameters affecting lipase production by *Fusarium solani*. *Acta Pharmaceutica Turcica*, 47, 209–223.
- Sicari, V., Giuffrè, A. M., Lonardj, L., & Poiana, M. (2010). Evolution of phenolic compounds of virgin olive oil during 12 months storage. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 87, 109–116.
- Silva, T., Reto, M., Sol, M., Peito, A., Peres, C. M., Peres, C., & Xavier Malcata, F. (2011). Characterization of yeasts from Portuguese brined olives, with a focus on their potentially probiotic behaviour. *Food Science and Technology*, 44, 1349–1354.
- Singleton, V. L., & Rossi, J. A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144–158.
- Stratil, P., Klejdus, B., & Kubán, V. (2006). Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables—Evaluation of spectrophotometric methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 607–616. doi:10.1021/jf052334j
- Vazquez Roncero, A., & Janer del Valle, M. L. (1978). Polyphenol evolution during the pickling process of green olives. II. Changes in total polyphenols. *Grasas y Aceites (Sevilla, Spain)*, 29, 23–27.
- Waraho, T., Cardenia, V., Rodriguez-Estrada, M., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2009). Prooxidant mechanisms of free fatty acids in stripped soybean oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 7112–7117. doi:10.1021/jf901270m
- Waraho, T., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2011). Impact of free fatty acid concentration and structure on lipid oxidation in oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 129, 854–859. doi:10.1016/j.foodchem.2011.05.034
- Yoshida, A., Hama, S., Nakashima, K., & Kondo, A. (2011). Water activity dependence of performance of surface-displayed lipase in yeast cells: A unique water requirement for enzymatic synthetic reaction in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 334–338. doi:10.1016/j.enzmictec.2010.12.008
- Zhen-Qian, Z., & Chun-Yun, G. (2009). Screening for lipase-producing *Enterobacter agglomerans* for biodiesel catalyzation. *African Journal of Biotechnology*, 8, 1273–1279.
- Zinedine, A., & Mañes, J. (2009). Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. *Food Control*, 20, 334–344. doi:10.1016/j.foodcont.2008.07.002
- Zullo, B. A., & Ciafardini, G. (2008). Lipolytic yeasts distribution in commercial extra virgin olive oil. *Food Microbiology*, 25, 970–977. doi:10.1016/j.fm.2008.07.002





DOI: 10.3305/nh.2012.27.5.6101

Nutr Hosp. 2012;27(5):3-66

principalmente con los incrementos de temperatura a los que también es susceptible el AOVE dada su participación en la alimentación como ingrediente y medio de transferencia de calor. El objetivo fue cuantificar el CFT (método de Folin Ciocalteu) y el PAG (cromatografía de gases) en AOVE fresco y tratado a las temperaturas de 3 tratamientos culinarios de uso frecuente a nivel doméstico (fritura, rehogado y cocción). Los tratamientos térmicos cambiaron significativamente el CFT. El aceite rehogado presentó la mayor concentración siguiendo en orden decreciente: frito, crudo y cocido; en este último, se observó la difusión de los fenoles hacia el agua de ebullición. En cuanto al PAG, entre el 95 al 97% de la grasa extraída de las muestras está constituida por los ácidos palmítico (9%), esteárico (3%), oleico (77%), y linoléico (6%); en el caso de la fritura, hubo un incremento leve del porcentaje de ácidos grasos insaturados acompañado de un descenso en los mono y poliinsaturados; sin embargo, las diferencias no fueron significativas respecto al aceite crudo o el experimentado en cualquiera de los tres procesos investigados. Los resultados indican que los tratamientos culinarios (AOVE solo en mezcla con agua) cambian la CFT, sin embargo el PAG permanece constante. Por lo que, dada la estabilidad del PAG, una adecuada elección de los métodos a nivel doméstico garantizará un aporte óptimo de antioxidantes polifenólicos.

#### P069 Efectos de la manipulación sobre la calidad higiénica de aceite de oliva

Samaniego Sánchez C<sup>1</sup>, Nassira Elhaouay<sup>2</sup>, Asehraou A<sup>2</sup>, Villalon Mir M<sup>1</sup>, López García de la Serrana H<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. <sup>2</sup>Department of Biology. Faculty of Sciences. University Mohamed Premier. Oujda. Marruecos.

**Introducción:** El aceite de oliva es un alimento fundamental de la dieta mediterránea. Su consumo es beneficioso gracias a su contenido en ácidos grasos insaturados y en componentes antioxidantes. Diferentes factores influyen en la calidad del mismo entre ellos la manipulación durante las etapas de su producción. La manipulación inadecuada junto al mal almacenamiento de la aceituna, afectan negativamente a la calidad higiénica del mismo.

**Material/métodos:** Se han analizado 46 tipos de aceites procedentes de almazaras tradicionales marroquíes, que escapan a cualquier tipo de sistema de control de calidad. Se han realizando análisis microbiológicos y pruebas de calidad según los métodos actuales recogidos en la reglamentación española. Las muestras están clasificadas en 3 grupos según el tiempo de almacenamiento de las aceitunas antes de su trituración: Grupo A: 1 a 7 días, Grupo B: 15 a 20 días y Grupo C: 20 a 40 días. **Resultados/conclusiones:** Los resultados indican presen-

cia de grados de acidez de 0,56-1,97% en el grupo A, de 2,74-8,14% en el grupo B y de 0,57-17,79% en el grupo C. Los análisis microbiológicos muestran la presencia de Mesófilos, Psicrotrofos, Levaduras y Mohos, en todos los grupos, y ausencia de Enterobacterias. Estos microorganismos producen lipasas que provocan la hidrólisis de los triglicéridos, aumentando la producción de los ácidos grasos libres que se traduce por un grado de acidez alto. La mayoría de las muestras de aceite de grupos B y C presentan grado de acidez elevado, así clasificados como lampantes según el Reglamento de la Unión Europea (CE 2002). La manipulación inadecuada de las aceitunas, las incorrectas condiciones de su almacenamiento, la falta de control higiénico y la conservación del aceite en envases no adecuados, favorecen el crecimiento de microorganismos, mermando la calidad microbiológica higiénica y nutritiva del aceite.

#### P070 Efecto del envasado en vidrio en la composición de dos variedades de judías del ITACYL, "almonga" y "curruquilla"

Asensio-Vegas C<sup>1</sup>, Pedrosa MM<sup>2</sup>, Olmedilla-Alonso B<sup>3</sup>, Asensio M<sup>4</sup>C, Manzanera S<sup>4</sup>, Ibeas-García A<sup>4</sup>

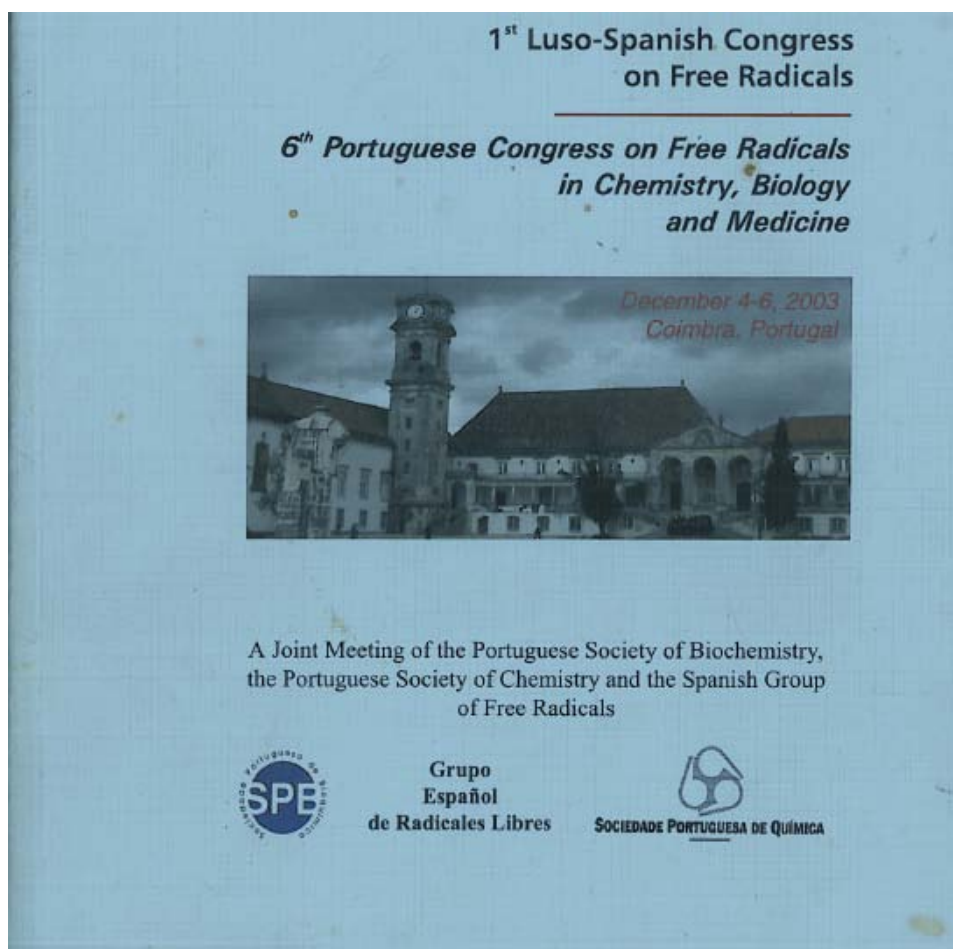
<sup>1</sup>Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ETL). Palencia. <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (Dpto. Tecnología de los Alimentos). Madrid. <sup>3</sup>Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (Dpto. Metabolismo y Nutrición). Madrid. <sup>4</sup>Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (Área de Agricultura). Valladolid.

La judía común (*P. vulgaris* L.) es la leguminosa de consumo humano más importante a nivel mundial por su gran valor nutricional. Sólo con aumentar su consumo podrían llegar a reducirse algunas enfermedades crónicas y situaciones de malnutrición. Para su consumo es necesario el tratamiento térmico, que elimine sus factores antinutricionales.

**Material y métodos:** Se ha estudiado el efecto del envasado en vidrio (remojo, escaldado a 70<sup>o</sup> C durante 9' y cocción a 116 <sup>o</sup>C durante 42') en dos variedades de judías, 'Almonga' (grano blanco) y 'Curruquilla' (grano crema), en los compuestos bioactivos (azúcares solubles, inositol fosfatos totales (IP), inhibidores de tripsina (IT), lectinas (PHA) y fenoles totales), en la actividad antioxidante, en el contenido mineral y en componentes nutricionales (proteína, grasa, fibra alimentaria, almidón, amilosa y amilopectina).

**Resultados:** El proceso reduce en ambas variedades el contenido en sacarosa y oligosacáridos de la familia de la rafinosa. Hay una reducción del 50% en el contenido total de IP y del 98% en IT. En crudo difieren significativamente en lectina, eliminándose ésta en las dos tras el tratamiento térmico. El proceso reduce el contenido fenólico en ambas





Poster - 029

### **Oxidative stress in human aging**

El haouhay N, Araceli, Bijkdaouene L, Tapias V, López, LC, Rivas I, Escames G, Granados, MJ, Acuña-Castroviejo D.

*Departamento de Fisiología, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, España.*

Among the factors leading to aging the production and accumulation of free radicals are of great importance. It is now considered that both reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species participate in the slow and progressive oxidative damage during aging. Thus, an increase in free radicals and decrease in oxidative defense mechanisms take place along the life. The purpose of this study was to assess the degree of oxidative damage in normal aged people and to compare it with normal young ones. Two experimental groups were done: a) young group, comprising 30 healthy adults aged between 30-50 years, and b) aging group, comprising 70 individuals aged between 70-80 years, without any age-associated disease and without medication. Each individual was sampled at 9 am, and plasma levels of both reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione, glutathione peroxidase (GPx) and reductase (GRd), lipid peroxidation (LPO), nitrites and melatonin were measured. The results show that age is associated with a significant increase in LPO, an increase in GSSG/GSH ratio, and a reduction in both GPx and GRd activities. Nitrite levels were also reduced with age. These data strongly suggest a significant increase in oxidative damage in aged people, that depends on both an increase in production of free radicals and a reduction in the antioxidant defenses. The nitrite reduction with age possibly depends on the age-related increase in superoxide anion production, which in turn reacts with nitric oxide producing peroxynitrites, thus reducing the levels of plasma nitrite (1).

Supported by grant G03/137 from ISCIII, Spain.

1. Escames G, et al. *FASEB J.* 17:932-934, 2003.

Poster - 048

**Melatonin counteracts mitochondrial damage during sepsis.**

López LC, Escames G, Sarno F, Rivas I, Tapias V, Bikjdaouene L, El haouhay N, Beatriz, Acuña-Castroviejo D.

*Departamento de Fisiología, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, España*

It is believed that diaphragmatic and heart failure during sepsis depend on cell deenergization due to mitochondrial oxidative. In this study, we evaluated the activity of the electron transport chain (ETC) complexes during experimental sepsis. We also evaluated the effectiveness of administration of melatonin, a well-known antioxidant (1) in preventing sepsis-induced ETC failure. Sepsis was induced by cecal puncture in C57/Bl6 mice of 12-16 weeks of age. Four doses of melatonin (30 mg/kg, s.c.) were injected as follows: 30 min before puncture, immediately after puncture, and 4 and 8 hours after surgery. Twenty-four hours after puncture, the animals were killed and purified mitochondria from diaphragm, heart and skeletal muscle were prepared. The activity of ETC complexes was measured by classic enzymatic methods (1). Sepsis induced the complex I, II, III and IV inhibition by 30-60% in mitochondria from all tissues. Melatonin administration counteracts the decrease in ETC complexes activity due to sepsis, restoring the normal function of mitochondria. The results, together with those showing that melatonin maintains intramitochondrial glutathione homeostasis (1, 2), suggest that mitochondria is a target for melatonin intracellular action. From these data it can be concluded that melatonin may be beneficial for the treatment of sepsis.

Supported by grant FIS01/1076 from ISCIII, Spain.

1. Martín M, et al. *FASEB J.* 14:1677-1679, 2000.
2. Escames G, et al. *FASEB J.* 17:932-934, 2003.

**Melatonin counteracts rotenone-induced mitochondrial oxidative damage in PC12 cells**

Rivas I, Tapias V, López LC, Bikjdaouene L, El haouhay N, Escames G, de la Torre, Y, Acuña-Castroviejo D.

*Departamento de Fisiología, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, España.*

It is suggested that glutathione (GSH) depletion within the substantia nigra of PD patients affects mitochondrial function. GSH regulates intramitochondrial redox status (1) and closes the permeability transition pore (PT). Rotenone is a selective inhibitor of the electron transport chain (ETC) complex I and it is used experimentally to produce PD. In this study, we evaluated the role of melatonin to counteract rotenone-induced mitochondrial failure in PC12 cells, and compared it with cyclosporine A (CsA), an inhibitor of the PT. Differentiated PC12 cells were incubated in the presence of rotenone at different concentrations and GSSG/GSH ratio and glutathione reductase (GRd) and peroxidase (GPx) activities, were measured. Rotenone induced a dose-dependent increase in GSSG/GSH ratio and a reduction in GRd activity. Pretreatment of the cells with melatonin (10-100 nM) by 24 hours normalizes GSSG/GSH ratio and increased GRd activity. When PC12 cells were cultured with rotenone in the presence of 3  $\mu$ M CsA, the GRd activity was partially recovered but GSSG/GSH remained decreased. These results supports previous data showing that melatonin plays a central role on mitochondrial redox homeostasis (1), neutralizing GSH depletion in PD (2). The data also suggest that melatonin is much more efficient to increase intramitochondrial GSH pool than CsA. Thus, melatonin may maintain the PT closed increasing GSH levels, and this may account for the antiapoptotic role of the indoleamine.

Supported by grant SAF01-3191 from MCYT, Spain.

1. Martín M, et al. *FASEB J* 14:1677-1679, 2000.

2. Khaldy H, et al. *Neurobio. Aging* 24:491-500, 2003.



Poster - 030

**Melatonin constracts sepsis-induced mtNOS and NO production in mice.**

Escames G, Sarno F, López LC, Rivas I, Tapias V, Bikjdaouene L, El haouhay N, Navarro A, Acuña-Castroviejo D.

*Departamento de Fisiología, Instituto de Biotecnología, Universidad de Granada, España.*

Sepsis is associated with a strong induction of iNOS and NO. High levels of NO inhibit electron transport chain mitochondrial (ETC), leading to a increased production of both oxygen and nitrogen free radicals. The recently described mitochondrial NOS isoform seems to play a role in the control of the ETC activity. It has been recently demonstrated that melatonin inhibits the expression of mtNOS in septic rats (1). The objective of this work was to study the changes in mtNOS and NO in mitochondria from diaphragm, heart and skeletal muscle of mice after sepsis induction. Sepsis was induced by cecal puncture in C57/B16 mice of 12-16 weeks of age. Four doses of melatonin (30 mg/kg, s.c.) were injected as follows: 30 min before puncture, immediately after puncture, and 4 and 8 hours after surgery. Twenty-four hours after puncture, the animals were killed and Percoll-purified mitochondria from diaphragm, heart and skeletal muscle were prepared. The activity of mtNOS and levels of NO were determined in these preparations. The results show that sepsis induces a strong increase in both mtNOS activity and NO production in the three tissues assayed, whereas melatonin administration returned them to basal levels. These data correlate well with the changes in ETC activity also seen in these mitochondria, and support that mtNOS is inducible in some conditions such as sepsis. The recovery of mitochondrial function after melatonin administration also suggest a role for the indoleamine in the control of mtNOS activity and thus, in mitochondrial homeostasis (2).

Supported by grant FIS01/1076 from ISCIII, Spain.

1. Escames G, et al. *FASEB J.* 17:932-34, 2003.

2. Acuña-Castroviejo D, et al. *Curr Top Med Chem* 2:133-51,2002.