

Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ACRILAMIDA EN ACEITUNAS NEGRAS  
OXIDADAS COMERCIALES**

MARIA ELENA REPILADO REGODÓN

Dissertação orientada pela Doutora Maria Eduardo Costa Morgado Figueira  
e, coorientada pelo Doutor Francisco Pérez Nevado.

CONTROLO DA QUALIDADE E TOXICOLOGÍA ALIMENTAR

2017



Universidade de Lisboa

Faculdade de Farmácia



**ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ACRILAMIDA EN ACEITUNAS NEGRAS  
OXIDADAS COMERCIALES**

MARIA ELENA REPILADO REGODÓN

Dissertação orientada pela Doutora Maria Eduardo Costa Morgado Figueira  
e, coorientada pelo Doutor Francisco Pérez Nevado.

CONTROLO DA QUALIDADE E TOXICOLOGÍA ALIMENTAR

2017

## RESUMEN

Uno de los procesos de elaboración de aceitunas de mesa más frecuentes es el de las aceitunas negras oxidadas o negras al estilo californiano, en el que se emplean variedades como la Manzanilla cacereña o la Hojiblanca. Las producciones y exportaciones de este tipo de aceituna están en plena ascensión por su gran uso para elaborar otros alimentos procesados como pizzas y otros. Su proceso de elaboración incluye tratamientos con NaOH y sucesivas oxigenaciones con aire, seguidos de lavados con agua; gracias a los cuales, las aceitunas comienzan a ennegrecer por la oxidación de compuestos y la polimerización de *o*-difenoles. Para prevenir el deterioro del color, antes del envasado, éste se fija con la adición de sales de hierro. Sin embargo, el producto final no es estable microbiológicamente por lo que es obligatoria una esterilización con la aplicación de temperaturas entre 121 y 126°C durante entre 15 y 30 minutos. El objetivo fundamental del tratamiento térmico es destruir o inactivar los gérmenes capaces de producir toxinas o alterar el alimento en conserva, pero sobre todo se pretende prevenir el crecimiento del *Clostridium botulinum*.

Sin embargo, la esterilización de los alimentos conlleva la formación de algunos compuestos químicos nocivos, como es la acrilamida, un compuesto orgánico de tipo amida. Tras el consumo de esta, el tracto gastrointestinal la absorbe y la distribuye a todos los órganos formándose glicidamida como principal metabolito. Por todo lo anterior y siguiendo una recomendación de la Comisión Europea, se solicita a los Estados Miembros que lleven a cabo un seguimiento anual de los niveles de acrilamida y que faciliten a Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) los datos resultantes para que sean evaluados e incluidos en un informe anual. El número de resultados analíticos presentados a la EFSA ha disminuido desde 2008. En 2011, la Comisión Europea pidió a los Estados miembros que informaran de los niveles de acrilamida que superasen los valores indicativos. En 2015, la Unión Europea está barajando la posibilidad de establecer límites máximos, en base a las recomendaciones anteriores de la Autoridad Europea, puesto que desde hace tiempo se ha recomendado reducir la formación de acrilamida en los alimentos susceptibles como medida de gestión del riesgo más apropiada. También a petición de Dinamarca, Francia, Alemania y Suecia, la EFSA mantiene conexiones con las agencias nacionales de seguridad alimentaria con respecto a los últimos avances científicos sobre la acrilamida y su posible impacto en la salud pública.

En el último informe anual de la EFSA “evaluación científica de acrilamida en alimentos” del año 2015, por primera vez se incluyen las aceitunas negras oxidadas como alimento potencial de acrilamida, comparable a otros alimentos tales como patatas fritas (190-

391 µg/kg), pan (36-167 µg/kg), pan de molde (33-61 µg/kg), café (187-718 µg/kg). En general, la acrilamida se forma por la reacción de aminoácidos libres (principalmente asparagina) y compuestos carbonílicos, vía reacción de Maillard a temperaturas de 120°C. Otros mecanismos alternativos a través de lípidos también han sido propuestos.

La formación de acrilamida durante el procesado de aceitunas oxidadas al estilo californiano fue puesta de manifiesto por primera vez en 2008. En esos estudios, antes de la esterilización no se detectaron cantidades de acrilamida en las aceitunas, mientras que los niveles de esta tras la esterilización se situaron entre 243-1349 µg/kg. En otros estudios, se propone que los péptidos de las proteínas de las aceitunas contribuyen a la formación de acrilamida cuando aquellas se esterilizan y demuestran que es posible disminuir los niveles de acrilamida durante la esterilización de aceitunas negras oxidadas con la adecuada selección de aditivos.

También se ha planteado la hipótesis de que los polifenoles pueden prevenir la formación de acrilamida a altas temperaturas. Por último, existen estudios en los que se demuestra que la acrilamida se genera durante la esterilización y no por la elaboración previa de las aceitunas, habiéndose encontrado que las aceitunas negras al estilo californiano presentan niveles más altos de acrilamida (409.67-511.91 µg/kg) a las obtenidas por el estilo griego (<1.42 µg/kg) y el estilo español, en las que no se detectó ese compuesto; parece claro que la alta temperatura empleada para esterilizar las aceitunas negras es responsable de la generación de acrilamida. Además, en estudios del efecto de la composición de la salmuera en los contenidos de acrilamida en aceitunas negras durante su almacenamiento se ha demostrado que la adición de cloruro de calcio baja los niveles de acrilamida en el producto.

El principal objetivo del presente estudio fue determinar el contenido en acrilamida en aceitunas negras oxidadas comercializadas en España y Portugal, así como estudiar la influencia de tratamientos de horneado de aceitunas negras oxidadas sobre la concentración de acrilamida. Para ello, se analizaron aceitunas de 15 marcas comerciales a nivel fisicoquímico, microbiológico e instrumental.

Al realizar análisis fisicoquímicos se encontraron diferencias significativas entre las muestras analizadas. No obstante, todas cumplen los requisitos de las Normas de calidad de Aceituna de mesa, siendo la empresa quien determina los valores finales de pH, Acidez y sales por no existir legislación que la obligue a determinados parámetros. No fue detectado ningún microorganismo en la salmuera ni patógeno, ni levaduras u otros; ello se debe a que las aceitunas son esterilizadas antes de su comercialización.

Analizamos el color y la textura realizando dos estudios diferentes de textura, uno de penetración o punción, y otro de compresión. En ambos estudios la marca que demostró mayor resistencia y firmeza de la piel, así como una mayor turgencia fue la marca 15. Por otro lado, la de menor resistencia y mayor ablandamiento fue la marca número 6 también en ambos estudios.

En las aceitunas comerciales estudiadas se encontraron diferencias significativas entre ellas en el perfil fenólico tanto de la pasta de aceituna, como de la salmuera y su actividad antioxidante, existiendo una relación entre la mayor capacidad antioxidante y la mayor concentración de compuestos fenólicos. Las que mayores valores de fenoles totales presentan son la 4 y la 15 y la que menos valor presenta es la 9. Así como en su perfil fenólico estas marcas 4 y 15, presentaron las mayores concentraciones de hydroxytirosol, tyrosol y oluropeína. En la actividad antioxidante (analizada por el método DPPH) también se comprueba que son las que más actividad presentan con EC50 más bajos.

Además, se analizó la presencia y concentración de dos compuestos tóxicos, el 5-hidroximetilfurfural y la acrilamida; en cuanto al 5-hidroximetilfurfural no se detectaron concentraciones apreciables en ninguna de aceitunas estudiadas. Se analizó la concentración de acrilamida en todas las marcas siendo la marca número 15 la que mayor concentración de acrilamida presentó con el valor en aceituna de 744 ng/g y en salmuera de 1697 ng/g, y la marca número 9 la de menor concentración, presentando en aceituna 31,5 ng/g y en salmuera 60,4 ng/g. Las aceitunas negras comerciales oxidadas estudiadas presentaron un rango muy amplio de concentración de acrilamida. El 47% y el 53% de las aceitunas y salmueras analizadas presentaron más de 250 ng/g o ml.

Se realizó un estudio para determinar el efecto de diferentes temperaturas y tiempos de horneado sobre la producción de acrilamida. Los ensayos abarcaron un rango de Temperatura de 165 a 250 °C y de tiempo entre 8 y 22 minutos. Para este estudio se seleccionó la muestra de aceitunas comerciales que presentaba la menor concentración de acrilamida. Dependiendo del tratamiento aplicado en el proceso de horneado, la temperatura afecta más que el tiempo en la concentración final de acrilamida. En algunos estudios previos se comprobó que en tratamientos a 110 °C/175 minutos y 115.6 °C/45 minutos no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de acrilamida (154.2 - 156.2 ng/g), respectivamente. Estas observaciones apoyan la teoría de que la formación de acrilamida en las aceitunas está asociada con el tratamiento térmico total (tiempo y temperatura), y no con los parámetros individuales.

Nuestros resultados revelaron que la concentración de acrilamida aumentó de forma proporcional a la temperatura y el tiempo. La cantidad de acrilamida aumentó 4 veces con relación a la concentración inicial en el tratamiento de horneado más agresivo (250°C 15

minutos) y dos veces con relación al tratamiento más suave (165°C 10 minutos). Por otro lado, estudios previos sugieren que los compuestos fenólicos pueden influir en la formación de acrilamida. Se puede observar que los fenoles con alta capacidad antioxidante podrían influir en la formación de acrilamida. Es decir, los polifenoles podrían actuar como eliminadores de radicales libres inhibiendo de este modo la reacción en cadena mediante la combinación del átomo de hidrógeno de -OH fenólico con los radicales libres.

Se observó que la muestra con menor capacidad antioxidante es también la muestra con la menor concentración de acrilamida y fue seleccionada como el objeto del estudio. El tratamiento de horneado de aceitunas maduras enlatadas, combinando diferentes temperaturas y tiempos, constituye un abordaje para el conocimiento de la formación de acrilamida. La información obtenida puede servir una estrategia eficaz para reducir la acrilamida y optimizar el proceso evitando la pérdida de compuestos fenólicos.

**Palabras clave:** Acrilamida, Aceituna negra, aceituna oxidada, horneado, perfil fenólico

## RESUMO

Um dos processos de produção de azeitonas de mesa mais frequentes é o azeitonas pretas oxidadas ou o estilo californiano, em que se usam variedades como a Manzanilla cacereña ou também a Hojiblanca. As produções e exportações deste tipo de azeitona estão em plena ascensão pelo seu ótimo uso para preparar outros alimentos processados como pizzas e outros. O processo de preparação inclui tratamentos com NaOH e oxigenações sucessivas com ar, seguido de lavagem com água; o que leva a que as azeitonas comecem a escurecer pela oxidação de compostos e a polimerização de o-difenóis. Para evitar a deterioração da cor, antes da embalagem, adicionam-se sais de ferro. No entanto, o produto final não é microbiologicamente estável, pelo que é necessária a esterilização com a aplicação de temperaturas entre 121 e 126 °C durante 15 a 30 minutos. O principal objetivo do tratamento térmico é destruir ou inativar os germes capazes de produzir toxinas ou alterar os alimentos enlatados, mas acima de tudo pretende prevenir o crescimento de *Clostridium botulinum*.

No entanto, a esterilização de alimentos leva à formação de alguns compostos químicos prejudiciais, como a acrilamida, um composto orgânico do tipo amida. Após o consumo, o trato gastrointestinal absorve-a e distribui-a por todos os órgãos formando-se glicidamida como principal metabólito. Tendo em conta o exposto e seguindo uma recomendação da Comissão Europeia, é solicitado aos Estados-Membros que realizem um acompanhamento anual dos níveis de acrilamida para fornecer à EFSA os dados resultantes para avaliação e inclusão num relatório anual. O número de resultados analíticos apresentados à EFSA diminuiu desde 2008. Em 2011, a Comissão Europeia solicitou aos Estados Membros que reportassem níveis de acrilamida que excedessem os valores indicativos. Em 2015, a União Europeia começa a considerar estabelecer limites máximos, com base em recomendações anteriores da Autoridade Europeia, uma vez que tem sido recomendado reduzir a formação de acrilamida em alimentos suscetíveis como medida de gestão de risco mais apropriado. Também a pedido da Dinamarca, França, Alemanha e Suécia, a EFSA mantém vínculos com as agências nacionais de segurança alimentar sobre os desenvolvimentos científicos mais recentes sobre a acrilamida e seu possível impacto na saúde pública.

No último relatório anual da EFSA "Avaliação científica da acrilamida nos alimentos", falou-se das azeitonas pretas oxidadas como alimento potencial para a formação de acrilamida, comparável a outros alimentos, como batatas fritas (190-391 µg/kg), pão (36-167 µg/kg), pão de forma (33-61 µg/kg), café (187-718 µg/kg). Em geral, a acrilamida é formada pela reação de aminoácidos livres (principalmente asparagina) e compostos de carbonilo, através da reação de

Maillard a temperaturas de 120 °C. Outros mecanismos lipídicos alternativos também foram propostos.

A formação de acrilamida durante o processamento de azeitonas oxidadas de estilo californiano foi demonstrada pela primeira vez em 2008. Nestes estudos, antes da esterilização, não foram detectadas quantidades de acrilamida nas azeitonas, enquanto os níveis de acrilamida após esterilização encontrados estavam entre 243-1349 µg/kg. Em outros estudos, propõe-se que os péptidos de proteínas de azeitona contribuam para a formação de acrilamida quando são esterilizados e demonstram que é possível diminuir os níveis de acrilamida durante a esterilização de azeitonas pretas oxidadas com a seleção adequada de aditivos.

Por outro lado, a hipótese baseia-se em estudos anteriores de que os polifenóis podem impedir a formação de acrilamida a altas temperaturas. Finalmente, há um estudo em que se mostra que a acrilamida é gerada durante a esterilização e não pelo pré-processamento das azeitonas. Nesse estudo, as azeitonas pretas de estilo californiano apresentaram níveis mais elevados de acrilamida (409,67-511,91 µg/kg) do que os obtidos pelo estilo grego (<1,42 µg/kg) e no estilo espanhol (não detectado), indicando que a alta temperatura usada para esterilizar as azeitonas pretas é responsável pela geração de acrilamida. A adição de cloreto de cálcio demonstrou uma diminuição no teor de acrilamida na composição da salmoura em azeitonas pretas após oito meses de armazenamento.

O principal objetivo deste estudo foi determinar o teor de acrilamida em azeitonas pretas oxidadas comercializadas em Espanha e Portugal, bem como determinar a influência do aquecimento no forno de azeitonas pretas oxidadas na concentração de acrilamida. Para esse fim, 15 marcas comerciais foram analisadas nos níveis físico, químico, microbiológico e instrumental.

No nível físico - químico, diferenças significativas foram encontradas entre as amostras analisadas, no entanto, todas elas atendem aos requisitos dos Padrões de Qualidade da azeitona de mesa. Sendo a empresa quem determina os valores finais de pH, Acidez, Sais por não haver legislação que obrigue. Não foram detectados microrganismos na salmoura nem patogénicos, nem leveduras ou outros, devido ao tratamento de esterilização antes da comercialização.

A análise de cor e da textura foi feita realizando dois estudos de textura diferentes, um de penetração ou punção, e outro de compressão. Em ambos os estudos, a marca que demonstrou maior força e firmeza da pele, bem como um turgor maior foi a marca 15. Por outro lado, o de menos resistência e maior amaciamento foi a marca número 6 também em ambos os estudos.

Nas azeitonas comerciais estudadas, foram encontradas diferenças significativas no perfil fenólico da pasta de azeitona e da salmoura e sua atividade antioxidante. Encontrou-se uma relação entre a maior capacidade antioxidante e a maior concentração de compostos fenólicos. Os valores mais altos de fenóis totais encontram-se nas marcas 4 e 15 e o valor mais baixo na marca 9. No perfil fenólico destas marcas 4 e 15, apresentaram as maiores concentrações de hydroxytyrosol, tyrosol e oleuropeína. Na atividade antioxidante (analisada pelo método dpph) também é verificado que eles são os que possuem a maior atividade com EC50 mais baixa.

Finalmente, foram analisadas a presença e concentração de dois compostos tóxicos, 5-hidroximetilfurfural e acrilamida; No que diz respeito à 5-hidroximetilfurfural, não foram detectadas concentrações apreciáveis em nenhuma das azeitonas estudadas. A concentração de acrilamida em todas as marcas foi analisada, sendo que a número 15 é aquela com maior concentração de acrilamida com valor em azeitona de 744 ng/g e em salmoura de 1697 ng/g e marca 9 com menor concentração, apresentando na azeitona 31,5 ng/g e em salmoura 60,4 ng/g.

As azeitonas pretas comerciais oxidadas estudadas apresentaram uma ampla gama de concentração de acrilamida. 47% e 53% das azeitonas e salmoura analisadas apresentaram mais de 250 ng/g ou ml.

Um estudo foi realizado para determinar o efeito de diferentes temperaturas e tempos de cozadura na produção de acrilamida. Os testes incluíram uma faixa de temperatura de 165 a 250°C e tempo entre 8 e 22 minutos. Para este estudo, foi selecionada a amostra de azeitonas comerciais com menor concentração de acrilamida. Dependendo do tratamento aplicado no processo de cozimento, a temperatura afeta mais do que o tempo na concentração final de acrilamida. Em alguns estudos anteriores, verificou-se que, em tratamentos a 110°C/175 min e 115,6°C/45 min, não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de acrilamida (154,2 - 156,2 ng/g), respectivamente. Essas observações sustentam a teoria de que a formação de acrilamida em azeitonas está associada ao tratamento térmico total (tempo e temperatura, e não com parâmetros individuais).

Nossos resultados mostraram que a concentração de acrilamida aumentou proporcionalmente à temperatura e ao tempo. A quantidade de acrilamida aumentou 4 vezes em relação à concentração inicial no tratamento de cozimento mais agressivo e duas vezes mais do que o tratamento mais fraco (165 °C 10 min). Por outro lado, estudos anteriores sugerem que os compostos fenólicos podem influenciar a formação de acrilamida. Pode-se observar que fenóis com alta capacidade antioxidante podem influenciar a formação de acrilamida. Neste

sentido, os polifenóis poderiam atuar como captadores de radicais livres, inibindo a reação em cadeia combinando o átomo de hidrogênio do OH-fenólico com radicais livres.

Observamos que a amostra com menor capacidade antioxidante é também a amostra com a menor concentração de acrilamida e foi selecionada como o objeto do estudo. O tratamento de cozimento de azeitonas maduras enlatadas, combinando diferentes temperaturas e tempos, constitui uma abordagem para o conhecimento da formação de acrilamida. A informação obtida pode servir uma estratégia eficaz para reduzir a acrilamida e otimizar o processo evitando a perda de compostos fenólicos.

Palavras-chave: Acrilamida, Azeitonas pretas, Perfil fenólico, oxidadas, cozido.

## ABSTRACT

One of the most frequent processes of elaboration of table olives is the black olives oxidized or black Californian style, in which are used varieties like *Manzanilla cacereña* and *Hojiblanca*. The productions and exports of this type of olive are in full ascension because of its utility to elaborate other processed foods like pizzas and others. Its elaboration process includes treatments with NaOH and successive oxygenations with air, followed by washes with water; thanks to which the olives begin to blacken by the oxidation of compounds and the polymerization of o-diphenols. To prevent color deterioration, before packaging, its color is fixed by the addition of iron salts. However, the final product is not microbiologically stable, so sterilization is mandatory with the application of temperatures between 121 and 126 °C during 15-30 minutes. The main objective of the heat treatment is to destroy or inactivate the microorganisms capable of producing toxins or to alter the canned food, but above all it is intended to prevent the growth of *Clostridium botulinum*.

However, the sterilization of food can provoke the formation of some harmful chemical compounds; one of these, acrylamide, is an organic compound of the amide type. After its consumption, the gastrointestinal tract absorbs and distributes it to all the organs forming glycinamide as the main metabolite. In view of the above, and following a recommendation from the European Commission, Member States are requested to carry out annual monitoring of acrylamide levels and to provide EFSA with the resulting data for evaluation and inclusion in an annual report. The number of analytical results submitted to EFSA has declined since 2008. In 2011, the European Commission asked Member States to report levels of acrylamide that exceeded indicative values. In 2015, the European Union is considering setting maximum limits, based on previous recommendations of the European Authority, since it has long been recommended to reduce the formation of acrylamide in susceptible foods as a risk management measure more appropriate. Also, at the request of Denmark, France, Germany and Sweden, EFSA maintains contacts with national food safety agencies regarding the latest scientific developments on acrylamide and its possible impact on public health.

In the latest EFSA annual report "Scientific Assessment of Acrylamide in Foods" of 2015, oxidized black olives are included for the first time as potential food with significant concentrations of acrylamide, comparable to other foods such as potato chips (190-391 µg/kg), bread (36-167 µg/kg), sliced bread (33-61 µg/kg), coffee (187-718 µg/kg). In general, acrylamide is formed by the reaction of free amino acids (mainly asparagine) and carbonyl compounds, formed during the Maillard reaction at temperatures of 120 °C. Other alternative mechanisms involving lipids have also been proposed. The formation of acrylamide during the

production process of oxidized black olives was first demonstrated in 2008. In those studies, prior to sterilization no amounts of acrylamide were detected in the olives, while the levels of acrylamide after sterilization were between 243-1349  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . In other studies, it is proposed that the peptides of olives contribute to the formation of acrylamide when they are sterilized, and demonstrate that a proper selection of additives can help to decrease the levels of acrylamide during the sterilization process. It has also been hypothesized that polyphenols can prevent the formation of acrylamide at high temperatures. Finally, there are studies showing that acrylamide is generated during sterilization rather than by pre-processing olives; black oxidized olives showed higher levels of acrylamide (409.67-511.91  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) to those obtained by the Greek style (<1.42  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) and the Spanish style, in which this compound was not detected. It seems clear that the high temperature used to sterilize the black olives is responsible for the generation of acrylamide. In addition, studies of the effect of the brine composition on acrylamide contents on black olives during storage have shown that the addition of calcium chloride help to reduce the levels of acrylamide in the product.

The main objective of the present study was to determine the acrylamide content in oxidized black olives marketed in Spain and Portugal, as well as to study the influence of baking treatments of oxidized black olives on the acrylamide concentration. For this, we analyzed olives from 15 commercial brands at physicochemical, microbiological and instrumental levels. When performing physicochemical analysis were found significant differences between the samples analyzed. However, all of them meet the requirements of the Quality Standards for table olive, and it is the company who sets the final values of pH, Acidity and salts.

No microorganisms were detected in the brine nor pathogen, nor yeast or other. This is because the olives are sterilized before they are marketed. We analyzed the color and texture by performing two different texture studies, one of penetration or puncture, and another of compression. In both studies the olives that demonstrated greater strength and firmness of the skin, as well as a greater turgor were the olives of the trade mark 15. On the other hand, the one of less resistance and greater softening was the trade mark number 6 in both studies.

In the commercial olives studied, significant differences between olive paste and brine were found in the phenolic profile and in their antioxidant activity. There was a relationship between the higher antioxidant capacity and the higher concentration of phenolic compounds. The highest values of total phenols were found in the commercial olives 4 and 15, and the lowest value in the 9. These presented the highest concentrations of hydroxytyrosol, tyrosol and oleuropein. In the antioxidant activity (analyzed by the DPPH method) it is also verified that these olives were the ones that had the most activity with the lowest EC50.

In addition, the presence and concentration of two toxic compounds, 5-hydroxymethylfurfural and acrylamide, were analyzed. No appreciable concentrations of 5-hydroxymethylfurfural were detected in any of the olives studied. The acrylamide concentration in all brands was analyzed; commercial olives 15 showed the highest concentrations of acrylamide, with 744 ng/g in olive and 1697 ng/g in brine; whereas, commercial olives 9 had the lowest concentration, with 31.5 ng/g in olives and 60.4 ng/g in brine. The oxidized commercial black olives studied presented a very wide range of acrylamide concentration; 47% and 53% of the olives and brines analyzed had more than 250 ng/g or ml.

A study was carried out to determine the effect of different temperatures and baking times on acrylamide production. The temperature conditions studied varied between 165 to 250 °C and time between 8 and 22 minutes. The commercial olives 9, with the lowest concentration of acrylamide, were selected for this study. Depending on the treatment applied in the baking process, the temperature affects more than the time in the final concentration of acrylamide. In previous studies, it was found that treatments with different time conditions (110 °C/175 minutes and 115.6 °C/45 minutes) did not significantly affect to the final acrylamide concentrations. These observations support the theory that the formation of acrylamide in olives is associated with total heat treatment (time and temperature), and not with individual parameters. Our results showed that the acrylamide concentrations increased proportional to temperature and time. The amount of acrylamide increased 4-fold relative to the initial concentration in the most aggressive bake treatment (250 °C 15 minutes); and twice as compared to the milder treatment (165 °C 10 minutes). On the other hand, previous studies suggest that phenolic compounds may influence the formation of acrylamide. It can be observed that phenols with high antioxidant capacity could influence the formation of acrylamide. Thus, polyphenols could act as free radical scavengers thereby inhibiting the chain reaction by combining the hydrogen atom of phenolic -OH with the free radicals.

We observed that the sample with the lowest antioxidant capacity is also the sample with the lowest concentration of acrylamide and was selected as the object of the study. The baking treatment of canned ripe olives, combining different temperatures and times, is an approach to the knowledge of the formation of acrylamide. The information obtained can serve an effective strategy to reduce acrylamide and optimize the process avoiding the loss of phenolic compounds.

Key words: Acrylamide, Black olives, oxidized olives, baking, phenolic profile

## **AGRADECIMIENTOS**

La realización de este trabajo fue posible gracias a la colaboración y apoyo de varias personas.

En primer lugar, agradecer al Profesor Doctor Francisco Pérez Nevado (coorientador), de la Universidad de Extremadura (España) y a la Profesora Maria Eduardo Figueira (Orientadora), de la Universidad de Lisboa (Portugal), por toda la ayuda prestada durante la realización del trabajo de laboratorio y escrito, así como por su constante disponibilidad.

Al Doctor Daniel Martin Vertedor, del Instituto Tecnológico Agroalimentario de Extremadura - CICYTEX-INTAEX (Junta de Extremadura, España), por el apoyo prestado en la realización tanto en la parte de laboratorio, como en el desarrollo de la memoria final.

A CICYTEX-INTAEX por permitir la realización de parte del proyecto en sus laboratorios.

A la Escuela de Ingenierías Agrarias de la Universidad de Extremadura (España), por haberme permitido realizar parte del proyecto en sus laboratorios.

A Manuel Cabrera-Bañegil y Sara Martillanes por la ayuda prestada en la realización de los ensayos de actividad antioxidante y desarrollo del método superficie-respuesta.

Al Servicio de Análisis Molecular perteneciente al Servicio de Apoyo a la Investigación del Universidad de Extremadura (España), por el desarrollo del método de determinación de acrilamida. En especial a M<sup>a</sup> Dolores López Soto y Elena Rodríguez Paniagua por su ayuda en el desempeño de este estudio.

A Raquel, de CICYTEX-INTAEX, por la ayuda con el HPLC.

A mi familia y amigos, sin el apoyo no hubiera podido desenvolver este proyecto.

Y a todos aquellos que de alguna forma contribuyeran en la realización de este trabajo, aunque no estén mencionados.

## Índice de figuras

Figura 1. 1. Principales países productores de aceituna de mesa (COI) .....	32
Figura 1. 2. Evolución de la producción en Portugal en el tiempo .....	33
Figura 1. 3. Evolución del consumo mundial de aceitunas de mesa por grupos de países (toneladas). Hasta el 31 de diciembre de 2017.....	34
Figura 1. 4. Consumo en kg de aceitunas de mesa por habitante/año en 2015 en los países de la Unión Europea.....	34
Figura 1. 5. Diagrama de procesamiento de las Aceitunas verdes de estilo español (Adaptado de Gómez et al, 2006) .....	38
Figura 1. 6. Diagrama de procesamiento de las Aceitunas negras oxidadas (California o estilo americano).....	43
Figura 1. 7. Estructuras químicas de ácidos fenólicos .....	46
Figura 1. 8. Espacio de color cielab .....	48
Figura 1. 9. Esquema de parámetros textura punción .....	51
Figura 1. 10. Esquema de parámetros textura compresión .....	52
Figura 1. 11. Formación de acrilamida. ....	53
Figura 1. 12. DCC para dos factores. Muestras en el cubo (●) , Muestras estrellas (⋆) y Muestra central (●) .....	65
Figura 3. 1. Frascos comerciales usados en el estudio.....	71
Figura 3. 2. pH-metro CRISON, modelo Basic20. Fuente: Laboratorio de Nutrición y Bromatología de la Escuela de Ingenierías Agrarias .....	71
Figura 3. 3. Espectrofotómetro UV/VIS de la serie BIOMATETM 3 de Thermo Scientific. Fuente: Laboratorio de Nutrición y Bromatología de la Escuela de Ingenierías Agrarias. ....	72
Figura 3. 4. Kit de Medios de cultivos preparados.....	73
Figura 3. 5. Preparación de Medios de cultivos. ....	73
Figura 3. 6. Mufla usada para el horneado de la Aceituna. ....	74
Figura 3. 7. Determinación de la acidez libre en la salmuera. ....	76
Figura 3. 8. Realización de la curva de ácido gálico.....	77
Figura 3. 9. Determinación de cloruros.....	78
Figura 3. 10. Determinación de azúcares reductores. Fuente: Laboratorio de Nutrición y Bromatología de la Escuela de Ingenierías Agrarias. ....	79
Figura 3. 11. Refractómetro. ....	79
Figura 3. 12. Placas de cultivo. ....	80

Figura 3. 13. Texturómetro modelo TA.TX2 (Stable Micro System©, U.K.). Laboratorio de Nutrición y Bromatología de la Escuela de Ingenierías Agrarias. Fuente: Elaboración propia. .....	81
Figura 3. 14. Preparación de DPPH. ....	82
Figura 3. 15. Preparación de DPPH y medida de la absorbancia.....	83
Figura 3. 16. Preparación de muestras para su medida en HPLC. ....	85
Figura 3. 17. Extracción. ....	85
Figura 4. 1. Ejemplo de placa sembrada en Agar de Pseudomonas 18.01.2017 Dilución 10-1. .....	104
Figura 4. 2. Gráficos actividad antioxidante Aceituna y Salmuera en Muestra 1.....	106
Figura 4. 3. Contenido en Acrilamida ng/g en Salmuera y pasta de Aceituna negra Oxidada. .....	110
Figura 4. 4. Superficie - Respuesta para el comportamiento de la formación de acrilamida en función de dos factores, tiempo y temperatura de horneado.....	115
Figura 4. 5. Superficie - Respuesta para el comportamiento de la formación de compuestos fenólicos en función de dos factores, tiempo y temperatura de horneado. ....	122

## Índice de tablas

Tabla 1. 1. Clasificación de los compuestos fenólicos Harborne (1989).....	45
Tabla 3. 1. Marcas y Lotes utilizados en el estudio .....	70
Tabla 3. 2. Esquema de análisis realizados sobre las muestras de aceitunas. ....	75
Tabla 3. 3. Valores de los parámetros en las mediciones realizadas por el método de Compresión (TPA) .....	81
Tabla 3. 4. Valores de los parámetros en las mediciones realizadas de punción .....	82
Tabla 3. 5. Preparación de DPPH.....	83
Tabla 3. 6. Experimentos realizados para la consecución de la optimización del proceso de horneado de aceitunas. ....	89
Tabla 4. 1. Análisis fisicoquímico en las aceitunas negras oxidadas. ....	94
Tabla 4. 2. Control final del color. ....	99
Tabla 4. 3. Control de la Textura por ensayo de punción. ....	101
Tabla 4. 4. Control de la Textura por ensayo de compresión (TAP). ....	103
Tabla 4. 5. EC 50 DPPH. ....	105
Tabla 4. 6. Perfil Compuestos fenólicos Pasta de Aceituna. ....	107
Tabla 4. 7. Perfil Compuestos fenólicos Salmuera de Aceituna. ....	108
Tabla 4. 8. Valores de la superficie de respuesta para la formación de acrilamida en aceituna. .....	114
Tabla 4. 9. Compuestos fenólicos presentes en las aceitunas estudiados mediante HPLC....	118
Tabla 4. 10. Valores de los parámetros de ajuste y del test ANOVA para el comportamiento de polifenoles en el horneado de aceituna.....	121
Tabla A1. 1. Datos referidos a los 24 patrones analizados (preparación independiente por triplicado para concentración). ....	140
Tabla A1. 2. Determinación de la reproducibilidad. ....	141
Tabla A1. 3. Determinación de la repetitividad. ....	142
Tabla A1. 4. Determinación de la recuperación.....	143

## Índice de Ecuaciones

Ecuación 1. 1. Saturación para un determinado color o tonalidad $C^*$ .....	49
Ecuación 1. 2. Color básico de un objeto según su posición angular $H^*$ .....	49
Ecuación 3. 1. Cálculo de la Acidez total. ....	76
Ecuación 3. 2. Porcentaje de NaCl .....	78
Ecuación 3. 3. DPPH remanente. ....	84
Ecuación 3. 4. Recta para el Análisis de 5-HMF. ....	88
Ecuación A. 1 Límite de detección y de cuantificación. ....	140

## **Índice de Abreviaturas**

RRL: Cromatografía líquida de rápida resolución

UHPLC: Cromatografía líquida de ultra alta presión

EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria

DPPH: 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo

%: Porcentaje

INTAEX: Instituto Tecnológico Agroalimentario de Extremadura

HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia

t/ha: tonelada /hectárea

UE: Unión Europea

BOE: Boletín Oficial de Estado

COI: Consejo Oleícola Internacional

DAD: Detectores de serie de diodos

MS: Espectrómetro de masas

FLD: Detectores de fluorescencia

IARC: Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer

GC: Cromatografía de gases

MS: Espectrometría de masas

SIM: Monitorización de iones seleccionados

aw: Actividad de agua

RM: Reacción de Maillard

ADN: Ácido desoxirribonucleico

TDI: Ingesta diaria tolerable

BMDL<sub>10</sub>: Límite mínimo de confianza para la dosis de referencia

MOE: Margen de exposición

APPCC: Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos

FDE: Asociación europea Food and Drink Europe

EUPPA: Asociación Europea de Transformadores de la Patata

LC-MS: Cromatografía líquida con espectrometría de masas

HMF: Hidroximetilfurfural

RSM: Metodología de superficie de respuesta

DOE: Diario Oficial del Estado

DCC: Diseño Central Compuesto

PCA: Plate Count Agar

VRBG: Agar Bilis Glucosa Rojo Neutro Cristal Violeta

VRBA: Agar Bilis Lactosa Rojo Neutro Cristal Violeta

MYP: *Bacillus Cereus* Agar

IOOC: Internacional Olive Oil Council

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

DE: Desviación estándar

ND: No detectado

## INDICE

RESUMEN.....	4
RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	12
AGRADECIMIENTOS .....	15
Índice de figuras.....	16
Índice de tablas.....	18
Índice de Ecuaciones.....	19
Índice de Abreviaturas .....	20
1. INTRODUCCIÓN .....	27
1.1. Historia de la aceituna de mesa .....	27
1.1.1. Sus orígenes .....	27
1.1.2. Situación actual del olivo.....	28
1.1.3. Encuadramiento taxonómico y descripción botánica del cultivo del olivo .....	29
1.2. Definición de Aceitunas de Mesa.....	30
1.3. Producción y consumo a nivel mundial.....	31
1.3.1. Producción de aceituna en España.....	32
1.3.2. Producción de aceituna de mesa en Portugal.....	33
1.3.3. Evolución del consumo a nivel mundial de Aceitunas de Mesa.....	33
1.4. Procesados de Aceituna de Mesa.....	35
1.4.1. Procesos básicos de elaboración .....	35
1.4.2. Formas de presentación.....	35
1.4.3. Procedimientos de preparación de aceitunas de mesa .....	36
1.4.3.1. Aceitunas verdes de estilo español.....	37
1.4.3.2. Aceitunas maduras .....	39
1.4.3.3. La fermentación natural Aceitunas .....	39
1.4.3.4. Aceitunas negras oxidadas (California o estilo americano).....	41
1.5. Compuestos fenólicos de la aceituna y su importancia .....	44
1.6 Parámetros de calidad en la aceituna de mesa.....	46
1.6.1. Parámetros físico-químicos.....	46
1.6.2. Microbiológicos .....	47

1.6.3. Sensoriales .....	47
1.6.4. Instrumentales .....	47
1.6.4.1. Color.....	47
1.6.4.2. Textura .....	50
1.7. Acrilamida .....	53
1.7.1. Formación de acrilamida.....	54
1.7.2. Física y química de la reacción de Maillard .....	55
1.7.2.1. Etapas de la reacción de Maillard .....	55
1.7.3. Precursores y mecanismo de formación de acrilamida.....	57
1.7.3.1. Métodos de Reducción de Acrilamida. ....	57
1.7.4. Prevención de la formación de acrilamida.....	58
1.7.5. ¿Existe una “dosis tolerable” de acrilamida?.....	59
1.7.6. ¿Qué alimentos contribuyen a la exposición a la acrilamida? .....	60
1.7.6.1. ¿Se puede reducir la exposición a la acrilamida en los alimentos?.....	61
1.7.7. Métodos para la detección de acrilamida.....	62
1.8. Hidroximetilfurfural .....	63
1.9. Metodología de superficie de respuesta.....	63
1.9.1. Diseño Central Compuesto (DCC) .....	64
2. OBJETIVOS.....	68
3. MATERIAL Y MÉTODOS .....	70
3.1. Material.....	70
3.1.1. Materia prima.....	70
3.1.2. Equipos .....	71
3.2. Métodos .....	75
3.2.1. Control de parámetros físico-químicos.....	76
3.2.1.1. Determinación de la acidez libre.....	76
3.2.1.2. Medida del pH.....	77
3.2.1.3. Contenido de polifenoles totales .....	77
3.2.1.4. Control de cloruros.....	78
3.2.1.5 Determinación de azúcares reductores.....	78

3.2.1.6. Medición de grados Brix .....	79
3.2.2. Control calidad microbiológica.....	80
3.2.3. Control instrumental .....	80
3.2.3.1. Determinación del color instrumental de la Aceituna.....	80
3.2.3.2. Determinación de la textura Aceituna.....	80
3.2.3.3. Medición de la actividad antioxidante .....	82
3.2.3.5. Perfil de compuestos fenólicos en Salmuera.....	84
3.2.3.6. Perfil de compuestos fenólicos en Aceituna. ....	85
3.2.3.7. Análisis de acrilamida en Salmuera y Aceituna.....	86
3.2.3.8. Análisis de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF).....	87
3.3. Estudio del efecto del horneado de la aceituna oxidada en la producción de acrilamida .....	88
3.3.1. Diseño experimental .....	88
3.3.1.1. Selección de la muestra experimental .....	88
3.3.1.2. Diseño experimental del horneado.....	89
3.3.1.3. Estudio de horneado sobre aceitunas comerciales .....	90
3.3.2. Control de los parámetros analíticos.....	90
3.3.2.1. Determinación de la humedad.....	90
3.3.2.2. Determinación del contenido en acrilamida de la aceituna horneada.....	90
3.3.2.3 Medición del perfil de compuestos fenólicos de la aceituna horneada.....	90
3.4. Análisis estadístico de los datos .....	91
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	93
4.1. Análisis fisicoquímico en las aceitunas negras oxidadas .....	93
4.1.1. Control de la acidez libre .....	93
4.1.2. Control del pH.....	93
4.1.3. Control de cloruros .....	95
4.1.4. Control de los polifenoles totales en la salmuera.....	96
4.1.5. Control de azúcares reductores de la salmuera .....	96
4.1.6. Control de grados Brix de la salmuera.....	96
4.1.7. Control del color .....	97
4.1.8. Control de la textura.....	100

4.2. Recuento microbiológico de las aceitunas comerciales .....	104
4.3. Parámetros instrumentales .....	104
4.3.1. Aceitunas comerciales .....	104
4.3.1.1. Medición de la actividad antioxidante en Aceituna y Salmuera. ....	104
4.3.1.2. Identificación de los compuestos fenólicos en Aceituna y Salmuera .....	106
4.3.1.3. Contenido en acrilamida en Salmuera y Aceituna .....	109
4.3.1.4. Contenido de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) .....	112
4.3.2. Efecto del horneado sobre la producción de Acrilamida .....	113
4.3.2.1 Efecto del horneado sobre la humedad .....	113
4.3.2.2. Formación de acrilamida durante el horneado .....	113
4.3.2.3. Comportamiento de los compuestos fenólicos presentes en la aceituna durante el horneado .....	118
5. CONCLUSIONES .....	126
6. BIBLIOGRAFÍA.....	128
ANEXO 1. Optimización de la separación cromatográfica de la acrilamida.....	139

# **1. INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Historia de la aceituna de mesa

### 1.1.1. Sus orígenes

Los orígenes del olivo se remontan muy atrás en la historia. Es un árbol milenario cuyo cultivo se extendía ampliamente por toda la zona mediterránea, abarcando Europa, África y Asia Menor, adquiriendo gran importancia para los pueblos fenicio, romano y árabe. La expansión de su cultivo a América se produjo en el siglo XVI gracias a los colonizadores españoles.

La aceituna se utilizó inicialmente para la extracción de aceite, sin embargo, existen referencias que datan del siglo I en las que ya se cita su consumo directo. Es el caso de los famosos escritos de Columela donde el gaditano recogía diferentes métodos de preparación de aceitunas de mesa: en salmuera, aliñadas con hinojo, con hojas de lentisco y vinagre, etc.

La aceituna de mesa ha sido un alimento importante dentro de la dieta mediterránea. De hecho, era un componente básico en el sustento diario de los jornaleros del campo andaluces y extremeños durante los siglos XIX y XX. (Asociación Española de Exportadores e Industriales de Aceitunas de Mesa, 2017).

La preparación a escala industrial de las primeras aceitunas de mesa en España, "verdes al estilo español o sevillano" comenzó a finales del siglo XIX en la provincia de Sevilla, en las localidades de Dos Hermanas, Alcalá de Guadaíra, Morón y Arahal, entre otras. El olivo, siempre ha sido un elemento fundamental, para el medio ambiente, de una gran parte de España. Su nicho ecológico es vital para una parte de la fauna ibérica, su resistencia al fuego, su función contra la erosión y, en consecuencia, contra la desertización y la casi exclusiva capacidad de resistencia a la sequía pone, junto con la vid, la única nota verde a muchas comarcas españolas durante los meses de verano. El zumo de las aceitunas tiene tales propiedades nutricionales que han hecho que se consagre como la grasa más perfecta, la más apropiada por su composición en ácidos grasos mono y poliinsaturados para preservar la salud (prevención de arteriosclerosis, el infarto, algunos tipos de cáncer, mejor funcionamiento del hígado, etc.), favorecer el metabolismo, dificultar la formación de colesterol "malo" y favorecer la del "bueno". De todas las grasas que existen en el mundo es la única que se obtiene por presión. Sin disolventes ni calentamientos, sin aditivos ni sofisticaciones tecnológicas. Es la que da mejor y más sabores, porque cada variedad de aceituna tiene los suyos propios. En España se conservan la raíz latina, derivada de oleum, el catalán: oli y el valenciano olio; en el resto de España de lengua castellana

y gallega ha quedado, derivado del árabe, aceite; y aún en Portugal, en la Península Ibérica, también azeite.

Su cultivo se remonta al Neolítico, mucho antes de conocerse la palabra escrita, 3.000 a 4.000 años a.C. Se han encontrado hojas de olivo en los yacimientos pliocénicos de Mongardino (a 18 km de Bolonia) y huesos del mismo fruto en las estaciones neolíticas de El Garcel, en España. Muchos historiadores como De Candolle, consideran que proviene de Siria, del Asia Menor, y del Oriente Próximo, donde creció originalmente en abundancia al estado salvaje. Sin embargo, también crecían olivos salvajes en el Norte de África, España y en Grecia; lo que hace incierto el exacto origen del olivo. La transformación del olivo silvestre en cultivado se debe a los pueblos de Siria. En España se le sitúa en toda la región mediterránea, sobre todo en Turdetania y en la Bética.

Se han producido avances y retrocesos que, no obstante, han supuesto una presencia permanente y una colonización creciente por el olivar de todos los territorios peninsulares donde las condiciones ambientales (clima y suelo) permiten su cultivo. Tras la época romana, la importancia del olivar parece remitir en el mundo visigodo. Durante la dominación árabe, el olivar se consolida en determinadas áreas como El Aljarafe, y surgen nuevas zonas de cultivo diferenciadas como el olivar del Reino Nazarí. Tanto los autores latinos, como los árabes y cristianos, testimonian la presencia del olivar en esta comarca sevillana. También, las formas específicas de cultivo del olivar nazarí, conservadas posteriormente en tierras de moriscos, han llegado hasta nuestros días, como la variedad Lechín de Granada y la asociación de olivos y naranjos.

### **1.1.2. Situación actual del olivo**

El hábitat del olivo se concentra en las latitudes 30° y 45°, tanto en el hemisferio norte como en el hemisferio sur, en regiones climáticas del tipo Mediterráneo, caracterizado por un verano seco y caluroso (Picornell Buendía & Melero Martínez, 2013).

El intervalo óptimo de temperaturas para el desarrollo del olivo sería entre los 10° y los 30°C. Si la temperatura es superior a 35°C, el olivo cierra los estomas para controlar la temperatura y esto hace que su crecimiento menor (Lopes, 2011)

En la actualidad, en el mundo, existen alrededor de 8,2 millones de ha de olivos; sin embargo, algunos autores estiman una superficie mundial de olivares de, aproximadamente, 10 millones de ha. Estas cifras, suponiendo un rendimiento mundial promedio de poco más de 1 t/ha, proporciona 10 millones toneladas, de las cuales el 90%, aproximadamente, se destina a

la extensión de aceites y el 10% restante se consume como aceituna de mesa. Entre los principales países cultivadores del olivo, figuran: España (2,6 millones ha), Túnez (1,54 millones ha), Italia (1,14 millones ha), Turquía (0,88 millones ha), Grecia (0,69 millones ha), Marruecos (0,41 millones ha), Siria (0,41 millones ha), Portugal (0,32 millones ha) y Argelia (0,20 millones ha). También, son cultivares de olivos, además del resto de la Cuenca Mediterránea, países como Estados Unidos, Argentina, Chile, Uruguay, Brasil, Perú, Méjico, Afganistán, Irán, Irak, Angola, República de África del Sur y Australia. La producción mundial olivícola se concentra, principalmente, en la Cuenca Mediterránea. Los países mediterráneos concentran alrededor del 80% de la producción mundial, donde la producción es liderada por España, seguida por Italia y Francia. España produce el 35-40% de la producción mundial (y el 45-49 % de la correspondiente a la UE). Las cooperativas olivareras que realizan la molienda controlan del orden del 70% de la producción del aceite español. La mayor parte de la producción cooperativa se localiza en Andalucía (más del 80%), es decir, las cooperativas españolas controlan del orden del 25% de la producción mundial. De la situación del mercado mundial del aceite de oliva, emerge claramente el papel de líder de la UE, con cerca del 75% de la producción y el 70% del consumo.

### **1.1.3. Encuadramiento taxonómico y descripción botánica del cultivo del olivo**

El olivo, pertenece al orden *Oleales*, familia *Oleaceae Hoffm. & Link*, género *Olea L.* y especie *Olea europaea L.* (Estrada Cabezas, 2011). La familia botánica *Oleaceae*, comprende especies de plantas distribuidas por las regiones tropicales y templadas del mundo. Las plantas de esta familia son mayormente árboles y arbustos, a veces trepadores. Muchas de ellas producen aceites esenciales en sus flores o frutos. Hay unas 35 especies en el género *Olea*. Incluida en la especie *Olea europaea L.*, están todos los olivos cultivados y, también, los acebuches u olivos silvestres. Generalmente, se considera que los olivos cultivados pertenecen a la variedad sativa (*Hoffm. & Link*) Lehr y los olivos silvestres (acebuches), a la variedad *syvestris* (Mill.) Lehr. *Olea europaea L.*, el olivo, es la única especie de la familia *Oleaceae* con fruto comestible (Marçal Nogueira, 2012).

El olivo (*Olea europaea L.*) es muy importante en los países mediterráneos. La aceituna, no puede ser consumida en su estado natural debido a su amargor, necesita sufrir algunas alteraciones que lo hagan agradable al paladar. En el procesamiento de las aceitunas, existen varios métodos para retirar el sabor amargo (debido generalmente a la oleuropeína). Los métodos más conocidos son aceitunas verdes al estilo sevillano, aceitunas negras oxidadas al

estilo californiano y aceitunas negras naturales al estilo griego (Tofalo, Schirone, Perpetuini, Suzzi, & Corsetti, 2012)

En el mercado europeo hay un crecimiento en la producción de alimentos fermentados y funcionales, como consecuencia existe un aumento en el estudio de los mismos demostrando que poseen beneficios para la salud. Se cree que el 25% de la dieta europea y 60% de la de los países en desarrollo sea constituida por alimentos fermentados, debido a la importancia de la fermentación en la conservación de los alimentos y en la mejora de sus propiedades sensoriales (Leroy & De Vuyst, 2004).

La aceituna contiene grasas insaturadas principalmente ácido oleico, fibra alimentar, betacarotenos, vitaminas E, C y B, calcio, hierro y magnesio, en menor proporción compuestos fenólicos. La actividad antioxidante de los compuestos fenólicos disminuye el riesgo de enfermedades cardiacas, y de algunos tipos de cáncer e inflamaciones. (Prata, 2015).

Las aceitunas de mesa son consumidas tanto como aperitivos como mezcladas en las comidas (ensaladas, pizzas, pan de aceitunas en Portugal, etc...)

## **1.2. Definición de Aceitunas de Mesa**

Existen diferentes definiciones de Aceitunas de mesa, no obstante, similares entre ellas:

1. Se entiende por “Aceitunas de mesa” el producto preparado a partir de frutos sanos de variedades de olivo cultivado (*Olea europaea L.*), que han alcanzado un grado de maduración apropiado para su procesamiento y que han sido elegidas por producir frutos cuyo volumen, forma, proporción de pulpa respecto al hueso, delicadeza de la pulpa, sabor, firmeza y facilidad para separarse del hueso los hacen particularmente aptos para la elaboración; sometido a tratamientos para eliminar el amargo natural y conservado mediante fermentación natural y/o tratamiento térmico, y/o por otros medios, para evitar su deterioro y para asegurar la estabilidad del producto en condiciones apropiadas de almacenamiento a temperatura ambiente, con o sin conservantes; envasado con un medio de cobertura líquido apropiado (Codex Alimentarius Commission, 2013).
2. En España: Es el fruto de determinadas variedades del olivo cultivado (*Olea europaea sativa Hoffg. Link.*), sano, obtenido en el estado de madurez adecuado y de calidad tal que, sometido a las elaboraciones adecuadas, proporcione un producto listo para el consumo y de buena conservación (BOE (Boletín Oficial del Estado) Real Decreto 679, 2016)

3. También de acuerdo con la (Normas Portuguesas, 1987), se debe tener en cuenta la selección de cultivos apropiados para la preparación de aceitunas de mesa, así como saber que los frutos tratados con plaguicidas cuyos residuos no pueden ser eliminados o reducidos a niveles seguros no debe ser utilizados.

Según su coloración, dependiendo del grado de maduración del fruto, las aceitunas de mesa se catalogan en los siguientes tipos:

1. Verdes: son las obtenidas de frutos recogidos en el ciclo de maduración anterior al envero y cuando han alcanzado su tamaño normal. Estas aceitunas serán firmes, sanas, y no tendrán otras manchas distintas de las de su pigmentación natural. La coloración del fruto podrá variar del verde al amarillo paja.

2. De color cambiante: son las obtenidas de frutos con color rosado, rosa vino o castaño, recogidos durante el envero, antes de su completa madurez.

3. Negras naturales: son las obtenidas de frutos recogidos en plena madurez o poco antes de ella, pudiendo presentar, según la zona de producción y la época de la recogida, color negro rojizo, negro violáceo, violeta, negro verdoso o castaño oscuro (Codex Alimentarius Commission, 2013).

Añadimos un tipo más según el (BOE (Boletín Oficial del Estado) Real Decreto 679, 2016).

4. Negras: son las obtenidas de frutos que, no estando totalmente maduros, han sido oscurecidos mediante oxidación.

### **1.3. Producción y consumo a nivel mundial**

El área mediterránea es la principal área productora de aceitunas (98% de la producción mundial (Ghanbari , Anwar , M. Alkharfy, Gilani , & Saari, 2012). La producción mundial de aceitunas ultrapasa los 18 millones de toneladas por año, siendo el 90% destinado a la obtención de aceite y el 10% a la producción de aceitunas de mesa (Prata, 2015). El valor de la aceituna reside en la importancia económica y social del aceite y también de su consumo como aceitunas de mesa. Debido a sus características organolépticas y su composición fisicoquímica, es muy apreciada en la gastronomía. La Unión Europea es el principal productor mundial y exporta aceitunas a regiones no productoras como por ejemplo América del norte. En 2011/2012, España fue líder europeo en la producción de aceitunas de mesa, dando 520 600 toneladas, seguida de Grecia, Italia y Portugal con 9 000 toneladas (Consejo Oleícola Internacional, 2011).

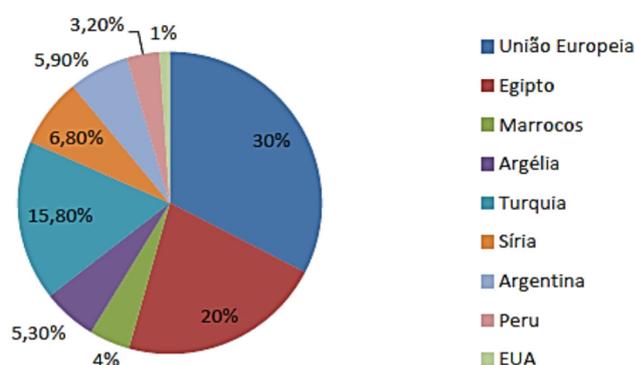


Figura 1. 1. Principales países productores de aceituna de mesa (COI)

Entre 2002 y 2012 hubo un aumento progresivo en la producción mundial de la aceituna de mesa (Consejo Oleícola Internacional, 2012).

### 1.3.1. Producción de aceituna en España

Actualmente, cerca de 2.580.577 ha están dedicadas en España al cultivo del olivo, de las cuáles 1.851.157 ha están cultivadas en secano y 729.420 ha están cultivadas en regadío (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2012), representando más de una cuarta parte de la superficie mundial dedicada a esta especie. En total son más de 300 millones de olivos que se cultivan en España, aunque su distribución entre las diferentes comunidades autónomas es muy desigual. El olivar se encuentra, principalmente, en Andalucía donde se dedican al cultivo del olivo cerca de 1,5 millones ha. Además, la productividad de sus plantaciones alcanza las mayores cotas, produciendo más del 80 % de las 7 millones toneladas de aceitunas que se recogen en España en años de buena cosecha (Muñoz, Belaj, Barranco, & Rallo, 2004) Aproximadamente, un 92 % de la aceituna producida se moltura para la extracción del aceite y, solamente, un 8 %, se dedica a su aderezo para aceituna de mesa. La principal zona productora se sitúa en la diagonal que une el Noreste de Jaén con el Sudeste de Sevilla, que incluye la Subbética cordobesa, el Norte de Málaga y el Oeste de Granada.

España es el principal país productor de aceite de oliva y, solamente, Italia la ha desplazado del primer lugar durante algunos períodos cortos. El contraste existente entre una superficie en disminución y una producción creciente, pone de manifiesto que, el olivar español ha estado sometido a un proceso de renovación que está dando lugar al aumento de su productividad. (Picornell Buendía & Melero Martínez, 2013).

### 1.3.2. Producción de aceituna de mesa en Portugal

Portugal es el cuarto país en la unión Europea con mayor producción de aceitunas de mesa, después de España, Grecia e Italia. En los últimos 10 años, la producción nacional media anual fue de 12.000 toneladas (valores entre las 8.000 toneladas (2005/2006) y las 10.200 toneladas (2006/2007)). La campaña de producción de 2005/2006 obtuvo un superávit convirtiéndose Portugal en país exportador con producción media de 11.000 toneladas y consumo medio de 7.000 toneladas (Consejo Oleícola Internacional, 2011) (Marçal Nogueira, 2012).

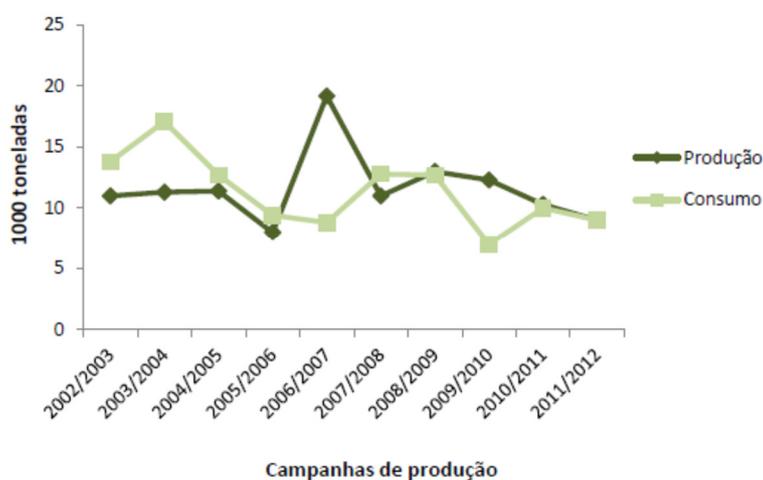


Figura 1. 2. Evolución de la producción en Portugal en el tiempo

Las principales regiones productoras de aceitunas de mesa son Alentejo (25%) y Trás-os-Montes (54 %). Las regiones de Ribatejo, Beira Litoral y Beira Interior son segundas en el ranking de producción (Prata, 2015).

### 1.3.3. Evolución del consumo a nivel mundial de Aceitunas de Mesa

El consumo mundial de aceitunas de mesa durante los últimos años se multiplica por 2,7 aumentando un 182,0% durante el periodo 1990/91 – 2016/17. La figura 1.1 ilustra esta evolución; el mayor incremento del consumo se constata en los principales productores miembros del COI, en algunos de estos países aumentan fuertemente sus producciones y como consecuencia el consumo, entre ellos, se encuentra Egipto que pasa de consumir 11.000 toneladas en 1990/91 a 400.000 en 2016/17. Argelia pasa durante este periodo de 14.000 toneladas a 244.000 toneladas y Turquía de 110.000 a 350.000 toneladas. Los demás países, aunque aumentan lo hacen en menores proporciones.

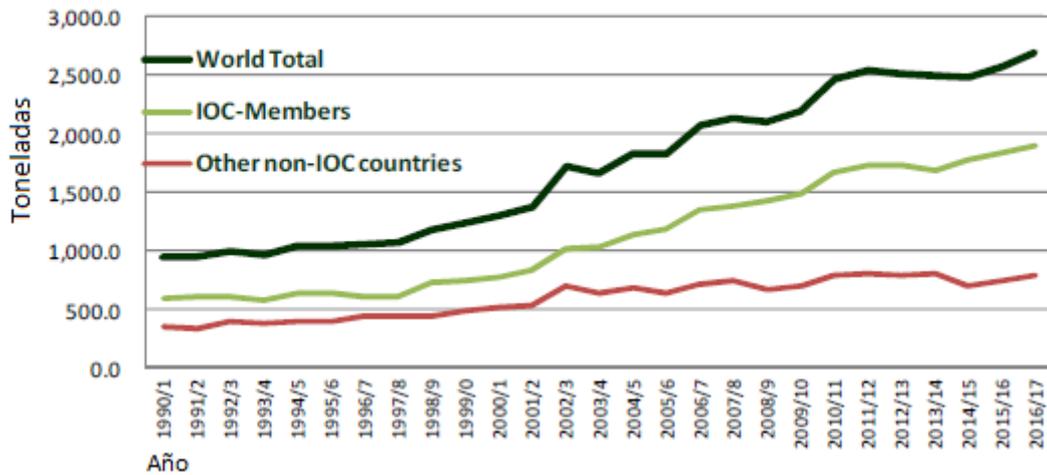


Figura 1. 3. Evolución del consumo mundial de aceitunas de mesa por grupos de países (toneladas). Hasta el 31 de diciembre de 2017

El consumo en los países de la Unión Europea aumenta en este periodo un 78,4% pasando de 346.500 toneladas en 1990/91 a 618.000 toneladas en 2016/17. La figura 1.3 ilustra el consumo de aceitunas de mesa por habitante y por año, observamos que el principal productor, España (figura 1.4), es el primer consumidor con 4,1kg seguido Chipre con 3,1kg Malta 1,9kg seguido de Grecia y Luxemburgo con 1,8kg respectivamente, Bulgaria e Italia 1.7 y Rumanía 1,1kg. Entre 0,9kg y 0,5kg se encuentran (en orden decreciente Francia, Suecia, Bélgica, Eslovaquia, Austria, Reino Unido y Dinamarca). Los demás países de la Unión Europea que su consumo está entre 0,4kg y 0,2kg son (Eslovenia, Lituania, Finlandia, República Checa, Irlanda, Países Bajos, Polonia, Estonia, Hungría, Croacia y Letonia).

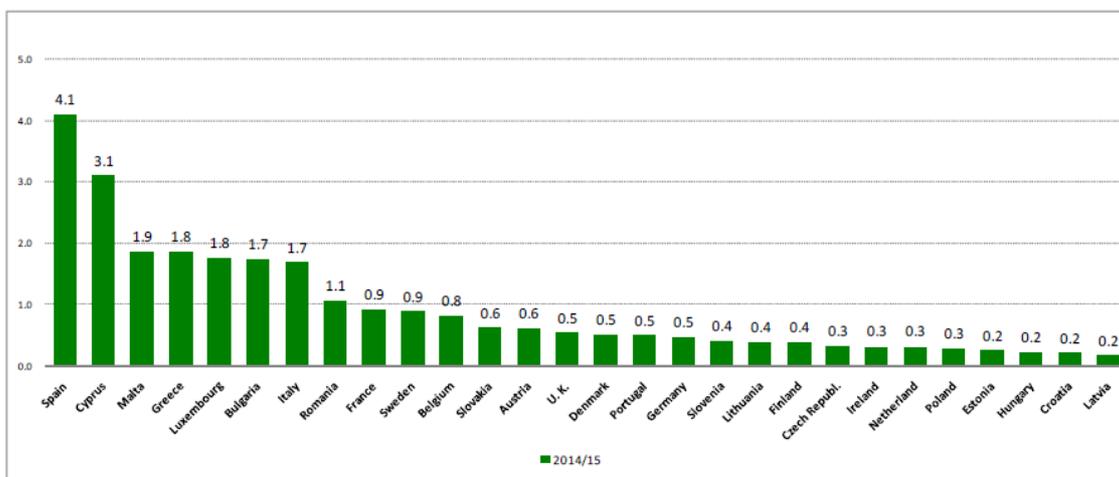


Figura 1. 4. Consumo en kg de aceitunas de mesa por habitante/año en 2015 en los países de la Unión Europea

## **1.4. Procesados de Aceituna de Mesa**

### **1.4.1. Procesos básicos de elaboración**

Los procesos básicos de elaboración de las aceitunas son:

1. Aderezo: es el proceso por el que las aceitunas verdes, de color cambiante o negras naturales, son sometidas a un tratamiento alcalino para eliminar el principio amargo y acondicionadas posteriormente en salmuera en la que sufren una fermentación parcial o completa.

2. En salmuera: es el proceso por el que las aceitunas verdes, de color cambiante o negras naturales, son tratadas directamente con una salmuera, donde sufren una fermentación completa o parcial.

3. Aliñado: es el proceso de añadir a la salmuera condimentos o especias, eventualmente vinagre, y cualquier otro producto alimenticio.

4. Oxidación: es el proceso por el cual las aceitunas de los tipos verde y de color cambiante, que en una fase previa se conservan en salmuera, fermentadas o no, son ennegrecidas por oxidación en medio alcalino.

5. Deshidratación: es el proceso por el que las aceitunas pierden parte de su humedad por tratamiento con sal seca, aplicación de calor o cualquier otro proceso tecnológico.

6. Otros procesos de elaboración: las aceitunas pueden elaborarse de formas diferentes o complementarias de las antes indicadas, siempre que los frutos utilizados respondan a los requisitos establecidas en la presente norma de calidad (BOE (Boletín Oficial del Estado) Real Decreto 679, 2016).

### **1.4.2. Formas de presentación**

Las aceitunas de mesa destinadas al consumidor final; pueden presentarse de una de las siguientes formas:

1. Aceitunas enteras o con hueso: aceitunas que conservan su forma original y no se les ha sacado el hueso.

2. Aceitunas deshuesadas o sin hueso: aceitunas a las que se ha sacado el hueso y conservan prácticamente su forma original.

3. Aceitunas rellenas: aceitunas deshuesadas, rellenas con uno o más productos alimenticios como pimienta, cebolla, almendras, apio, anchoa, cáscara de naranja o limón,

avellana, alcaparra, sin carácter limitativo, o con sus pastas preparadas para relleno, en las que se puede cerrar el espacio de relleno con la parte correspondiente de la aceituna seccionada.

4. Aceitunas segmentadas: aquellas que han sido cortadas o troceadas

En nuestro ámbito de estudio la mayor parte de las usadas serán deshuesadas.

### **1.4.3. Procedimientos de preparación de aceitunas de mesa**

La transformación de las aceitunas tiene como objetivo principal la eliminación del amargor de los frutos hidrolizando los compuestos fenólicos, especialmente oleuropeína (Niaounakis & Halvadakis, 2006), el compuesto fenólico más abundante en las aceitunas sin procesar (Parinos, Stalikas, Giannopoulo, & Pilidis, 2007). Hay varios métodos diferentes, por región (Arroyo López, Querol, Bautista Gallego, & Garrido Fernández, 2008), que puede resultar en diferentes fermentaciones, pero que en su conjunto se deben a la actividad microbiana esencialmente *Enterobacteriaceae*, bacterias del ácido láctico y las levaduras, la cual permite modificaciones en el aroma y el sabor del producto final, sino también de su calidad (Tofalo, Schirone, Perpetuini, Suzzi, & Corsetti, 2012).

Los métodos de elaboración de aceitunas de mesa de mayor importancia a nivel internacional son la fermentación natural de aceitunas (estilo griego), aceitunas verdes (estilo sevillano o español) y las aceitunas negras oxidadas (estilo californiano o americano) Además de los aspectos culturales, la elección del método de procesamiento debe tener en cuenta el cultivo, el estado de maduración y la tecnología de procesamiento disponible.

Las preparaciones industriales más importantes de la aceituna de mesa son:

1. Aceitunas verdes tratadas con álcali (denominadas de estilo español), que representan alrededor del 50-60% de la producción;
2. Aceitunas maduras por oxidación alcalina (el llamado californiano);
3. Aceitunas no tratadas o salteadas directamente (verdes, de color, o naturalmente negras).

También hay muchas otras maneras tradicionales / industriales de procesar aceitunas de mesa distribuidas en todo el mundo. Los principales estilos de procesamiento según el volumen de producción son:

#### ***1.4.3.1. Aceitunas verdes de estilo español***

En este tipo de elaboración (figura 1.5), los frutos verdes son tratados con álcali, lavados y puestos en salmuera donde se someten a fermentación con ácido láctico. El tratamiento de lejía consiste en una solución de NaOH (18-35 g/l), que penetra hasta 2/3 de la carne de oliva. El objetivo principal del proceso de eliminación del amargor es la hidrólisis química de la oleuropeína, que se transforma en ácido elenólico e hydroxytirosol. El tratamiento de lejía también favorece la solubilización de los componentes de oliva (azúcares, minerales, ácidos orgánicos, etc.) de la carne de oliva en el líquido. A continuación, se lavan las aceitunas para eliminar el exceso de álcali y salmuera en una solución de NaCl 100-120 (g/l), que se enriquece rápidamente con los nutrientes lixiviados de la carne. La fermentación de este estilo de elaboración de los olivos suele ser espontánea, con predominio de bacterias lácticas y levaduras. A lo largo de la fermentación, el proceso principal es la transformación de los azúcares en ácido láctico, que cae el pH hasta valores que hacen que el producto sea seguro (por debajo de 4,5) mediante la prevención de crecimiento de microorganismos indeseables (*Clostridium* y enterobacterias). La mayor parte de las aceitunas se comercializan a continuación como deshuesadas, picadas / rellenas con diversos productos de origen vegetal o animal, o aceitunas picadas / en rodajas.

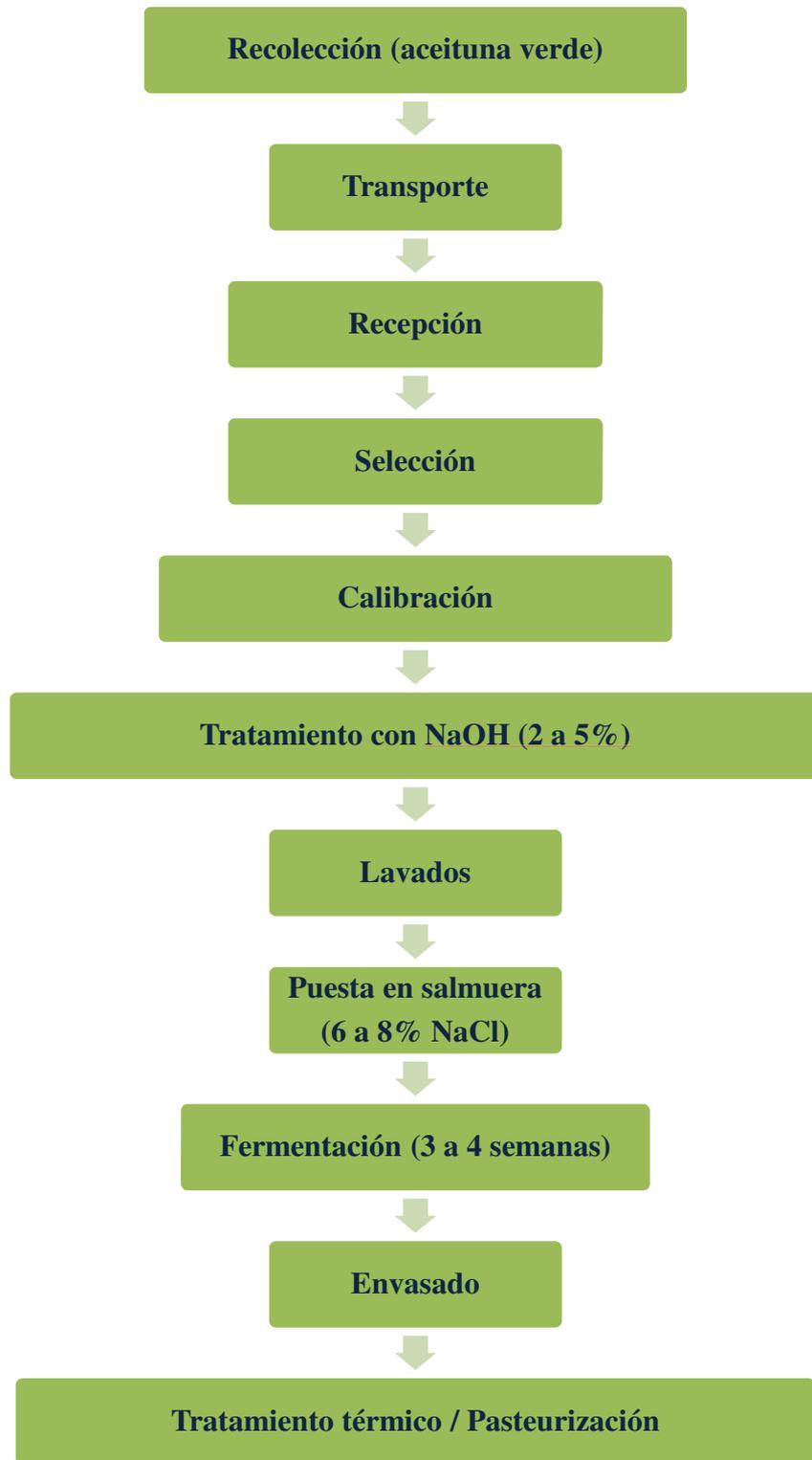


Figura 1. 5. Diagrama de procesamiento de las Aceitunas verdes de estilo español (Adaptado (Sánchez Gómez, García García, & Rejano Navarro, 2006)

### ***1.4.3.2. Aceitunas maduras***

En este tipo de elaboración, los frutos verdes o de color se almacenan en salmuera o soluciones ácidas o directamente oscurecidos por oxidación en medio alcalino. El almacenamiento de las aceitunas durante largos períodos de tiempo se puede conseguir en diversas soluciones de mantenimiento a temperatura ambiente. En el caso de las aceitunas conservadas en soluciones de NaCl (50 a 70 g l<sup>-1</sup>), las salmueras deben ser acidificadas con ácido acético o suplementados con cloruro de calcio para evitar el ablandamiento de oliva. Las etapas iniciales de este tipo de almacenamiento están dominadas por bacterias Gram-negativas, pero después de 4-5 días, las bacterias lácticas empiezan a aparecer y los otros grupos de microorganismos disminuyen. Este período en salmuera puede combinarse con la aplicación de un proceso aeróbico, que favorece el crecimiento de levaduras oxidativas y reduce la posibilidad de deterioro. Por el contrario, en soluciones ácidas, el almacenamiento se consigue mediante una combinación de ácidos (láctico o acético) y conservantes de alimentos (sorbato o benzoato) o también mediante un proceso aeróbico sin conservantes. Con este sistema, las bacterias Gram-negativas y el crecimiento de levaduras se reducen marcadamente, mientras que el crecimiento de bacterias acéticas y bacterias lácticas es claramente favorecido. El proceso de oscurecimiento consiste en una serie de tratamientos alcalinos, que penetran progresivamente en la pulpa de la aceituna de hasta casi el hueso, con períodos de lavado entre ellos para eliminar el exceso de álcali. A continuación, se añade una solución de gluconato ferroso o lactato durante 10 - 24 h para fijar el color negro. El hydroxytirosol y el ácido cafeico son los principales responsables de la formación de color durante el oscurecimiento. Las aceitunas se envasan a continuación en salmuera (20-50 g l<sup>-1</sup> NaCl) con gluconato ferroso o lactato añadido. El producto tiene un pH final por encima de 4,6 y su conservación sólo se logra mediante esterilización. Las presentaciones comerciales más comunes en el comercio minorista son aceitunas enteras y deshuesadas (Arroyo López, García García , Rodríguez Gómez, & Garrido Fernández, 2016)

### ***1.4.3.3. La fermentación natural Aceitunas***

Para la preparación de la fermentación natural de aceitunas, los frutos deben ser cosechados en madurez conveniente, con una textura suficientemente firme (Pereira, et al., 2006). Sin embargo, dependiendo de la zona de producción y el tiempo de la cosecha, la fruta puede tener coloraciones que van desde el verde a rojo oscuro y también son ideales para la preparación de este tipo de aceitunas (Arancibia Araya, 2014). Después de la recolección, se

transportan las aceitunas a la unidad industrial tan pronto como sea posible con el fin de evitar su deterioración, allí son seleccionadas (para eliminar la fruta con defectos), calibradas y después lavadas con agua para eliminar la suciedad del suelo.

A continuación, las aceitunas se colocan directamente en una salmuera, sin ningún proceso previo para eliminar su amargor, con una concentración de sal que puede variar entre 8 y 10% , mientras que en las zonas más frías se pueden usar concentraciones más bajas cerca de 6% (Marçal Nogueira, 2012), comienza así una fermentación natural y espontánea, que puede darse en condiciones anaeróbicas o condiciones aeróbicas, y de las que es responsable sobre todo una levadura microflora compleja, cuya actividad es estimulada por la gran cantidad de sal. Sin embargo, también interactúan bacterias Gram-negativas y bacterias ácido-lácticas que son parcialmente inhibida debido a la presencia de compuestos fenólicos. Durante el proceso de fermentación, la hidrólisis de la oleuropeína se atribuye a pH ácido y la actividad de  $\beta$ -glucosidasa producida por la levadura (Marçal Nogueira, 2012).

La fermentación de estas aceitunas es lenta debido a la lenta difusión de los compuestos solubles a través de la piel de las aceitunas hacia el exterior, así como a la lenta solubilización de la propia oleuropeína en la salmuera, cuando se hayan agotado todos los sustratos fermentables (principalmente azúcares).

La fracción fenólica de aceitunas es de suma importancia en lo que respecta a sus características físicas y sensoriales, revelando además propiedades antioxidantes y antimicrobianas y es fundamental tener en cuenta que los principales compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva negro antes de someterse a fermentación natural son oleuropeína, el hydroxytyrosol, el hydroxytyrosol -4- $\beta$ - glucósido, tyrosol, y salidroside verbascosídeo (Marçal Nogueira, 2012).

Después del proceso de oxidación de las aceitunas se pueden envasar en una nueva salmuera y ser comercializadas, se debe garantizar la preservación después de embalar por pasteurización o esterilización del producto, o la adición de conservantes tales como sorbato de potasio o sorbato de sodio.

Cabe señalar que las aceitunas obtenidos por el método de fermentación natural, con o sin aromas, tienen un sabor más pronunciado frutas y conservan una ligera amargura, debido principalmente a la presencia de polifenoles residuales, lo que resulta en un producto de alto valor nutritiva, con una textura y color característico. (Marçal Nogueira, 2012).

#### ***1.4.3.4. Aceitunas negras oxidadas (California o estilo americano)***

Las aceitunas utilizadas para la preparación de aceitunas negras oxidadas pueden ser cosechadas en períodos varían ampliamente y pueden tener diferentes estados de maduración (Marçal Nogueira, 2012) (Prata, 2015).

Antes de procesar las aceitunas pueden ser almacenadas durante 2 a 6 meses, dependiendo de los requisitos de producción, en una salmuera con una concentración de NaCl de 5 a 10% o ellos pueden ser sometidos directamente a los procesos de oxidación sin ningún tipo de conservación previa (Ghanbari , Anwar , M. Alkharfy, Gilani , & Saari, 2012)

Las aceitunas se someten a tratamientos sucesivos con una solución de hidróxido de sodio (NaOH), durante períodos variables de tiempo, por lo que se produce una penetración progresiva de la piel a la pulpa y, por último, al núcleo. Entre cada tratamiento aceitunas son ventilados a través del aire por los pasos de líquido, de modo que se oxidan de manera uniforme (Arroyo., 2010). La concentración de la solución de NaOH depende de la madurez de la fruta, el cultivar, la temperatura del tratamiento y la penetración deseada.

Después de lavar con agua para eliminar el exceso de NaOH y bajar el pH de la pasta a aproximadamente 8, sales de hierro se añaden como gluconato ferroso o lactato ferroso, para mejorar y el mantenimiento de las aceitunas negras (Pereira, et al., 2006) (Arroyo López , Querol, Bautista Gallego, & Garrido Fernández, 2008)

Por último, las aceitunas se eligen y se envasan en salmuera en diferentes contenedores, que contiene todavía una pequeña cantidad de una de las sales mencionadas de hierro, con el fin de evitar el deterioro del color negro. Puede garantizar la conservación del producto final, sometiéndolo a la esterilización por calor (Ghanbari , Anwar , M. Alkharfy, Gilani , & Saari, 2012), la adición de ácidos como el ácido láctico o el ácido glucónico, que lo convierten en un producto acidificado (pH <4,6) o pasteurizaciones.

Las aceitunas pueden ser empacados con diversas formas, tales como un todo, sin hueso, cortada o pasta de aceitunas (Arroyo López , Querol, Bautista Gallego, & Garrido Fernández, 2008).

La calidad de la textura de la pulpa de la aceituna está directamente influenciada por su contenido en polisacáridos y péptidos. Durante el procesamiento y almacenamiento de aceitunas la pectina se hidroliza por enzimas pépticas, causando una disminución en la firmeza de la fruta.

El mesocarpio está compuesto principalmente de agua, de 70 a 75%, y una fracción lipídica que va desde 12 a 30% dependiendo de la madurez de la aceituna y de la matriz. Tiene

un contenido relativamente bajo de azúcar (2-5%), glucosa predominante (1 a 3% en peso de pulpa) y fructosa (0,1 a 1,1%) en comparación con la sacarosa y manitol, y proteínas (3%), siendo el resto consistente en fibra mineral.

La mayoría de los ácidos grasos son monoinsaturados, y su proporción depende de factores genéticos y también de las condiciones ambientales. El ácido oleico (C18: 1) es el ácido graso más abundante en las aceitunas de mesa, seguido de ácido palmítico (C16: 0) y ácido linoleico (C18: 2), en el que el contenido de ácidos grasos saturados de menos de 15 % del total de lípidos.

Los ácidos orgánicos tienen actividad metabólica y resultan en la formación y la transformación de otros compuestos (Ghanbari , Anwar , M. Alkharfy, Gilani , & Saari, 2012). Sin embargo, el contenido de ácidos orgánicos, tales como oxálico, succínico, málico y cítrico, puede variar desde 1,2 hasta 2,1% en peso de materia seca de la pulpa y aumenta su concentración hasta la madurez. Se observa que el ácido láctico, ácido acético y ácido propiónico son los que predominan en la salmuera, en contra de la principal que se encuentra en la pulpa, que son los ácidos cítrico y málico.

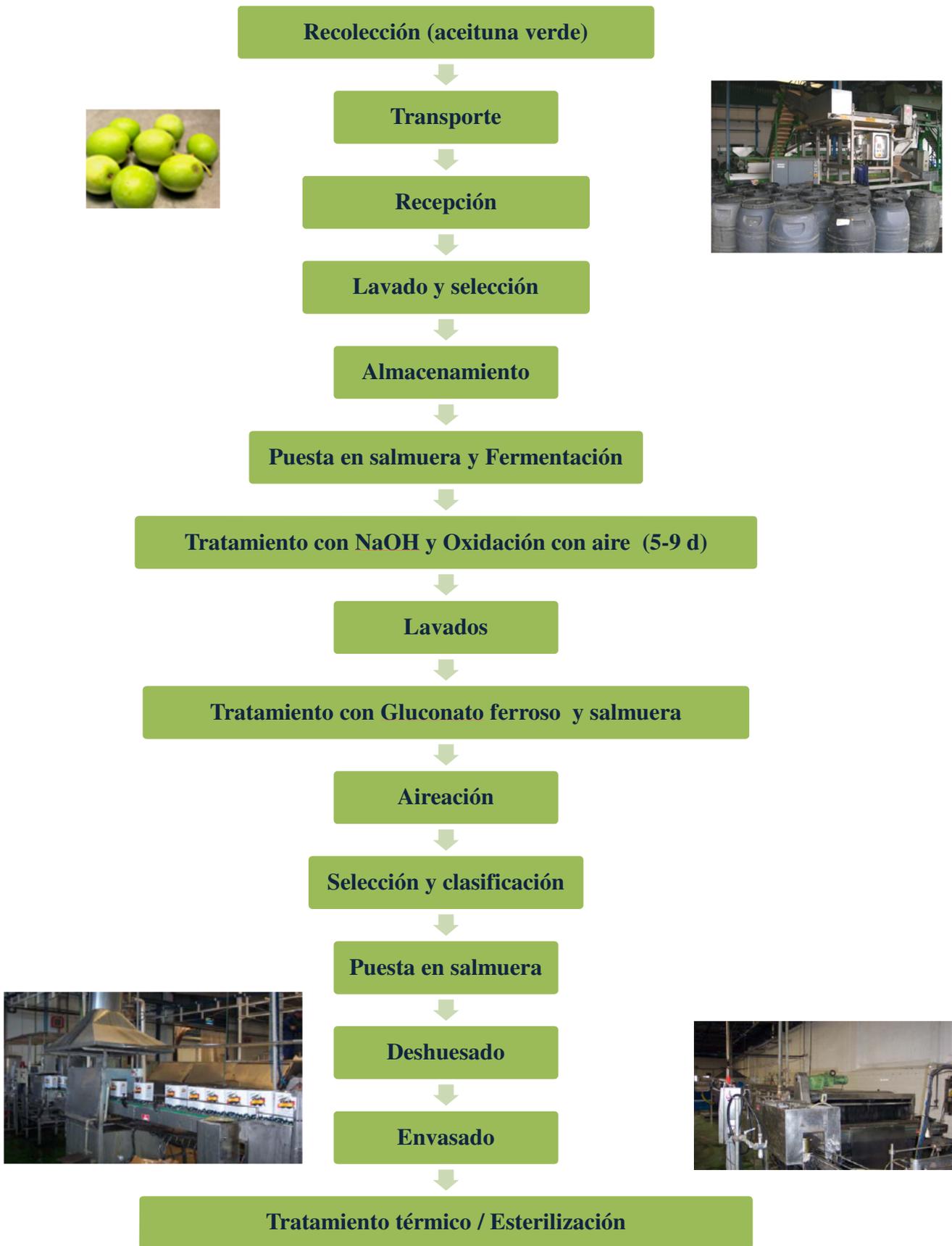


Figura 1. 6. Diagrama de procesamiento de las Aceitunas negras oxidadas (California o estilo americano)

## 1.5. Compuestos fenólicos de la aceituna y su importancia

El término «compuestos fenólicos» engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. Únicamente, algunos compuestos fenólicos de la familia de los ácidos fenoles no son polifenoles, sino monofenoles.

Los compuestos fenólicos influyen en las características sensoriales de la aceituna, y también tienen gran importancia en las propiedades químicas, organolépticas y nutricionales. El mesocarpio y la semilla de la aceituna contienen compuestos fenólicos

Los polifenoles, antioxidantes naturales, son uno de los principales metabolitos secundarios, que representan aproximadamente 2,0 a 2,5% de la pulpa (Pereira, et al., 2006) (Carrasco Pancorbo, y otros, 2005). La disminución de la concentración de oleuropeína promueve el aumento de otros compuestos tales como el Hydroxytyrosol, que se convierte en el compuesto principal fenólico en las aceitunas de mesa transformadas, así como Tyrosol, Lutein-7-glucoside, ácido cafeico, o-vainillina, p-coumarico, Verbascosido y ácido Gálico.

Tradicionalmente para referirse a los compuestos fenólicos presentes en la aceituna se ha empleado el término “polifenoles”, sin embargo, hoy en día parece más adecuado denominarlos “compuestos fenólicos” ya que el término “polifenol” parece indicar que existen varios grupos hidroxilo en un mismo anillo de benceno, o sugerir la presencia de varios grupos fenol en la misma molécula, lo cual no siempre es cierto como ocurre, por ejemplo, en el 4-hidroxifeniletanol.

Así, la mayoría de las metodologías propuestas se han centrado en la optimización de los métodos de cromatografía de líquidos (Carrasco Pancorbo, y otros, 2005) (Bayram, Ozcelik, Schultheiss, Frank, & Rimbach, 2013). Las columnas de fase inversa, principalmente C18 son las más utilizadas, aunque su uso como fase estacionaria conlleva un gran tiempo de análisis como consecuencia de su inherente apolaridad. Para reducir este tiempo de análisis se han utilizado distintas alternativas como la cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC) (Suarez, Macià, Romero, & Motilva, 2008), la cromatografía líquida de rápida resolución (RRLC) (Dinelli, et al., 2009) y el uso de herramientas quimiométricas (Marini, Bucci, Magrí, & Magrí, 2010).

Los detectores más utilizados en la región del ultravioleta-visible son los detectores de serie de diodos (DAD), junto con el espectrómetro de masas (MS) (Bernal, Mendiola, Ibáñez, & Cifuentes, 2011) También han sido publicados trabajos donde se lleva a cabo la

cuantificación de compuestos fenólicos utilizando detectores de fluorescencia (FLD) (Selvaggini, et al., 2006)

Se han llegado a identificar más de 8000 compuestos fenólicos con estructura muy variada, por lo que su clasificación es una tarea compleja. Una clasificación ampliamente aceptada es la que fue hecha por (Harborne, 1989) en la que se agrupa a los compuestos fenólicos en base al número de átomos de carbono que contienen, tal y como se puede ver en la Figura 1.7. De entre todas las familias de fenoles, el grupo de los flavonoides es el mayoritario lo que ha hecho que en algunas ocasiones se lleguen a clasificar los compuestos fenólicos en dos grandes grupos: flavonoides y no flavonoides (Crozier, Jaganath, & Clifford, 2009)

Tabla 1. 1. Clasificación de los compuestos fenólicos Harborne (1989)

Número de átomos de carbono	Estructura	Clasificación
6	C <sub>6</sub>	Fenoles Simples, Benzoquinonas
7	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos Fenólicos
8	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetofenona, Acido Fenilacético
9	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Acidohidroxicinámico, Cromonas, Coumarinas Isocoumarinas, Polipropenos
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftoquinonas
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xantonas
14	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Estilbenos, Antraquinonas
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Flavonoides, Isoflavonoides
18	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanós, Neolignanós
30	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Biflavonoides
n	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Ligninas
	(C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Catecolmelanina
	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	(Taninos Condensados)

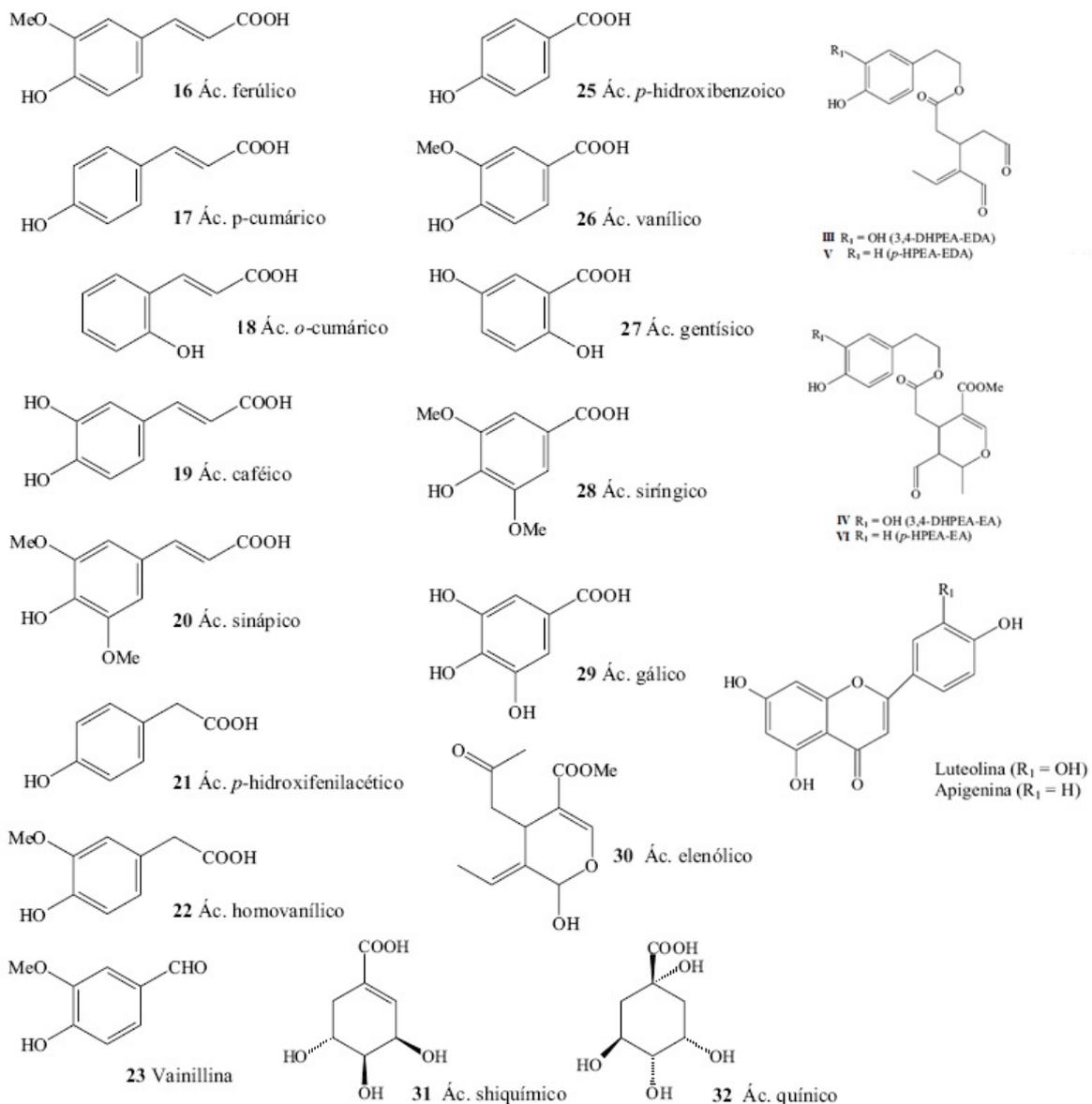


Figura 1. 7.Estructuras químicas de ácidos fenólicos

## 1.6 Parámetros de calidad en la aceituna de mesa

### 1.6.1. Parámetros físico-químicos

En las aceitunas de mesa, se emplean diferentes métodos para permitir la conservación del producto durante un tiempo adecuado de comercialización. Hay diferentes parámetros físico-químicos que inciden directamente sobre el crecimiento microbiano y sobre la conservación de un alimento. En aceitunas, tres parámetros muy importantes que afectan a la conservación del producto son: pH, Acidez libre, Contenido en sal. Por ello, en la legislación

se establecen valores máximos de pH y mínimos de acidez libre y contenido en cloruro sódico (BOE (Boletín Oficial del Estado Real Decreto 1230), 2001), que aseguren la correcta conservación de las aceitunas aderezadas o curadas en salmuera. Ambos parámetros se miden en el líquido de gobierno. También serán importantes controlar la cantidad de azúcares reductores y con relación a esto los grados brix.

### **1.6.2. Microbiológicos**

La aceituna y el líquido de gobierno donde es conservada debe estar esterilizada a fin de preservar la calidad del producto sin gérmenes patógenos o sus toxinas.

### **1.6.3. Sensoriales**

Debe presentar buen aspecto, color y olor con el fin de que sea palatable.

### **1.6.4. Instrumentales**

#### ***1.6.4.1. Color***

El color de un alimento es un parámetro muy importante a la hora de su elección. Las personas tienden a preferir alimentos con mayor intensidad cromática, lo que indica un color más vivo que el color original del alimento, esta intensidad de los alimentos disminuye durante el proceso de descomposición. Por lo tanto, los cambios de color que ocurren durante el proceso de descomposición de alimentos son cualitativamente lo opuesto a la preferencia de color del alimento. Este resultado implica que la preferencia del color de los alimentos puede tener una asociación significativa con la tendencia humana a seleccionar alimentos más frescos y no contaminados usando la percepción visual, que puede estar influenciada tanto por rasgos heredados como por el aprendizaje empírico. Los resultados son fundamentalmente interesantes y prácticamente útiles en diversos campos de la industria alimentaria y la ingeniería (Sun Man, Kyoung-Taek, Seong Hyun, & Jang Kun, 2013). Las aceitunas negras antes mencionadas (las de la lata de toda la vida) nada tienen que ver con las aceitunas que adquieren dicho color por su estado de madurez, las primeras adquieren ese color negro uniforme, por un proceso de oxidación artificial en el que se utiliza un medio alcalino (disoluciones de lejía en diferentes porcentajes). Estos cambios de pigmentación en la aceituna pueden tomarse como parámetro del estado de maduración.

Primeramente, la aceituna es de color verde, pasando a un color de tono amarillento al ir perdiendo la clorofila. Es este compuesto el que aporta un color verde al fruto.

A continuación, y debido a la acumulación de antocianinas (pigmentos hidrosolubles que se hallan en las vacuolas de las células vegetales) las aceitunas comienzan a colorearse progresivamente de un tono rojizo a violáceo, para terminar en el negro.

La calidad sensorial de las aceitunas de mesa viene determinada por una serie de características clasificadas por los órganos sensoriales. El color y el sabor son las principales cualidades que contribuyen a la aceptación por parte del consumidor. El color puede interferir en la valoración de otros atributos sensoriales, por lo que puede ser examinado mediante un análisis instrumental. La percepción visual de un alimento es muy importante a la hora de consumirlo. El aspecto o apariencia externa hace que un producto sea o no más apetecible para un consumidor, o al menos le predispone a percepciones de sensaciones agradable, de ahí que sea muy importante que tenga un color propio de la preparación en cuanto a color, su homogeneidad y su brillo (Augusto, 2017)

La determinación del color instrumental se realizó al inicio de los análisis. Se llevó a cabo con un colorímetro Konica Minolta Spectrophotometer CM-600d determinando las coordenadas CIE

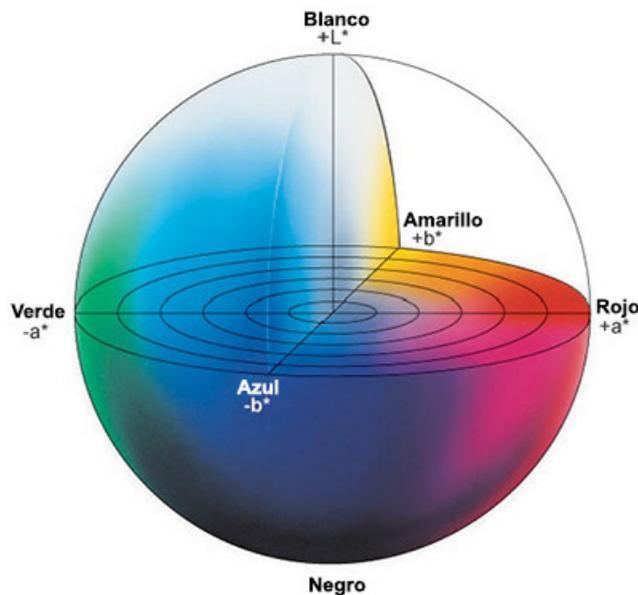


Figura 1. 8. Espacio de color cielab

En el espacio de color CIE 1976-L\*a\*b\* (CIELAB), estos tres atributos se representan con las variables claridad (L\*), croma (C\*ab) y tono (hab) Figura 1.9. De esos tres atributos, contribuyen a la cromaticidad el tono de manera cualitativa, y la saturación, de manera cuantitativa. El espacio de color CIELAB es un sistema coordinado cartesiano definido por tres coordenadas colorimétricas L\*, a\*, b\* magnitudes adimensionales (unidades CIELAB). La coordenada L\* recibe el nombre de claridad y puede tomar valores entre 0, correspondiente al negro, y 100, para el blanco. Las coordenadas colorimétricas a\* y b\* forman un plano perpendicular a la claridad. La coordenada a\* define la desviación del punto acromático correspondiente a la claridad, hacia el rojo si  $a^* > 0$ , hacia el verde si  $a^* < 0$ . Análogamente la coordenada b\* define la desviación hacia el amarillo si  $b^* > 0$ , y hacia el azul si  $b^* < 0$ . El conjunto a\*, b\* junto con la Luminosidad L\* definen el color de un estímulo.

A partir de ellas se definen dos magnitudes colorimétricas nuevas mediante las expresiones siguientes:

$$\text{Ecuación: } C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

Ecuación 1. 1. Saturación para un determinado color o tonalidad C\*.

$$\text{Ecuación: } H^* = \arctan(b^*/a^*)$$

Ecuación 1. 2. Color básico de un objeto según su posición angular H\*

El croma, C\*ab, es el atributo de la percepción visual conforme al que un área parece saturada respecto a un determinado color o tonalidad. Tiene valor 0 para estímulos 13 acromáticos y, por lo general, no pasa de 150 aunque puede superar ese valor para estímulos monocromáticos

El tono, hab, es el color básico de un objeto (azul, amarillo...) definido por su posición angular en un espacio de color cilíndrico. Los valores, por tanto, varían entre 0° y 360°, y para estímulos acromáticos ( $a^* = 0$ ,  $b^* = 0$ ) es una magnitud no definida. Ambos términos también definen la cromaticidad del color del estímulo, y junto con la claridad determinan las coordenadas cilíndricas o angulares.

#### **1.6.4.2. Textura**

Un punto importante a la hora de aceptar o rechazar un alimento es su textura, ya que ésta es una mezcla de los elementos relativos a la estructura del mismo y la manera como se relacionan con los sentidos fisiológicos. En la actualidad se han realizado diversos estudios encaminados todos a detallar las principales características texturales de los distintos alimentos sólidos y semisólidos. El análisis del perfil de textura es un excelente procedimiento instrumental, que simula la masticación de la mandíbula; ayuda a medir y a cuantificar parámetros tales como: dureza, gomosidad, masticabilidad, elasticidad, cohesividad entre otros, que se relacionan a su vez con variables como la tasa de deformación aplicada y la composición del producto (Torres, Gonzalez-Morelo, & Acevedo Correa, 2015)

En la actualidad, el método instrumental comúnmente utilizado es el análisis del perfil de textura (TPA), que imita las condiciones a que se somete el material durante el proceso de masticación (Bourne, 1978) (Scott Blair, 1958). Los parámetros de compresión obtenidos con TPA han sido utilizados en salchichas de carne cocida por muchos autores como índices para determinar la calidad del producto terminado o para determinar las modificaciones de las propiedades texturales debido a las formulaciones establecidas de manera parcial (García, Cáceres, & Selgas, 2006)

La medida instrumental de la textura fue propuesta como una alternativa a la evaluación sensorial con el fin de superar los principales inconvenientes de esta, debido a la gran variabilidad en los resultados, la dificultad de la ejecución de las pruebas y a las peculiaridades de la interpretación de los resultados. Sin embargo, es necesario que las medidas obtenidas con métodos instrumentales puedan correlacionarse con las respuestas de jueces de análisis sensorial, con el fin de validar la técnica instrumental utilizada. La textura cumple una función primordial en la industria alimentaria. Es una cualidad importante de calidad que influye en los hábitos alimenticios, la salud oral y la preferencia del consumidor; en el procesamiento y manipulación de alimentos, puede tomarse como índice de deterioro.

El texturómetro es un equipo que mediante una célula de carga similar a la que posee una balanza, es capaz de adquirir simultáneamente datos de fuerza, distancia y tiempo. El análisis de las curvas y los puntos críticos de las gráficas que da el equipo definirá el análisis de textura. Como cualquier balanza, tiene un límite de carga que afecta también a la sensibilidad del equipo. En nuestro caso la célula de carga no debe sobrepasar los 30 kg de fuerza.

El aparato consta de un cuadro de mandos básico que permite el movimiento manual de la célula de carga, así como los controles para la detención de emergencia del equipo. En la

célula de carga se encuentra el orificio donde se acoplan a rosca los diferentes tipos de sondas. El calibrado del equipo se realiza colocando una pesa de 2 kg sobre el chasis, donde va colocada la célula de carga, después de haber retirado la sonda. Finalmente, se colocará en primer lugar el portasondas y seguidamente la sonda deseada.

Para la adquisición de medidas se ha utilizado el programa *Exponent*. El equipo permite crear métodos con las condiciones operatorias fijas, llamados “proyectos” y cuyos archivos tienen extensión “.prj”. Además, para mayor facilidad, el equipo tiene preconfigurados muchos proyectos para alimentos, en los que indica qué sonda hay que utilizar y cómo hay que realizar las medidas. Una vez fijado el proyecto se ejecuta el ensayo.

#### 1.6.4.2.1. Ensayo de punción

El ensayo de punción consiste en la inserción de una sonda de aguja en el equipo obteniéndose valores de diferentes parámetros:

- a) Fuerza de rotura
- b) Distancia de rotura
- c) Energía de rotura
- d) Módulo de elasticidad

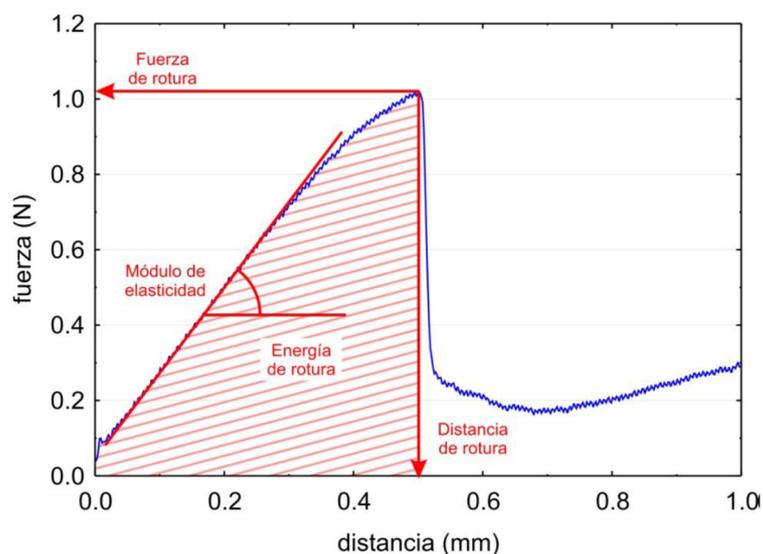


Figura 1. 9. Esquema de parámetros textura punción

La *fuerza de rotura* es la fuerza necesaria para perforar la piel de la aceituna, expresada en Newton (N). La *distancia de rotura* es el recorrido que hace la aguja hasta perforar la piel,

expresada en milímetros (mm). La *energía de rotura* es la fuerza que ha sido aplicada para recorrer la distancia de rotura, expresada en miliJulios (mJ). El *módulo de elasticidad* se puede definir como la fuerza que ha sido necesaria aplicar por cada milímetro recorrido por la aguja, expresado en Newton por milímetro (N/mm).

La velocidad de punción de la aguja se fijó en 0,50 mm/s

#### 1.6.4.2.2. Ensayo de compresión

El ensayo de compresión consiste en el uso de una sonda de compresión de 20 mm de diámetro obteniéndose los parámetros:

- a) Fuerza de rotura
- b) Distancia de rotura
- c) Energía de rotura
- d) Módulo de elasticidad

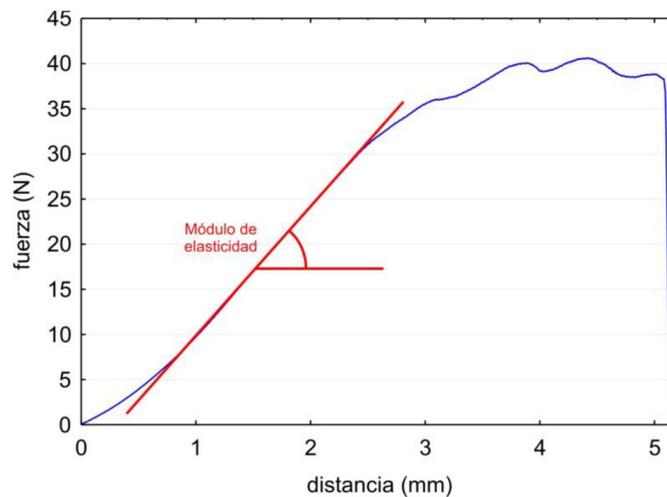


Figura 1. 10. Esquema de parámetros textura compresión

Como resultado se obtuvieron valores del *módulo de elasticidad* que relaciona la fuerza aplicada con la deformación de la muestra, expresado en Newton por milímetro (N/mm).

## 1.7. Acrilamida

La acrilamida es una sustancia química que se crea de forma natural en productos alimenticios que contienen almidón durante procesos de cocción cotidianos a altas temperaturas (fritura, cocción, asado y también durante procesos industriales a partir de 120°C y a baja humedad) (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2016)

La acrilamida es un compuesto orgánico de bajo peso molecular, altamente soluble en agua. Se utiliza entre otras cosas como un producto químico industrial y en la producción de poliacrilamida ( EFSA, 2015)

Se forma principalmente gracias a los azúcares y aminoácidos (sobre todo, la asparagina) que están presentes de forma natural en muchos alimentos. El proceso químico que causa esto se conoce como la reacción de Maillard, que también oscurece los alimentos y afecta al sabor. (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2016)

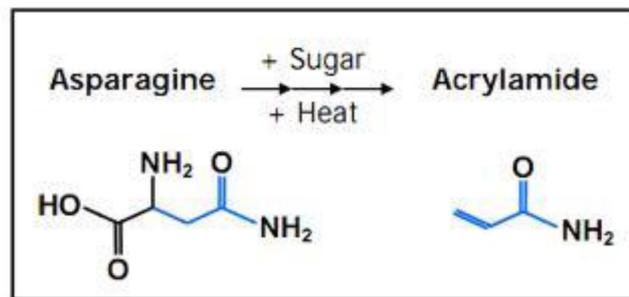


Figura 1. 11. Formación de acrilamida.

La acrilamida se encuentra clasificada como “probable carcinógeno para los humanos” (Grupo 2A) por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) en base a los estudios realizados con animales. En este momento no está claro que estos resultados pueden extrapolarse al hombre.

Es también un componente del humo del tabaco, y un agente intermedio en la síntesis de poliacrilamidas, sustancias usadas como floculantes en el tratamiento de las aguas y en la industria del papel. Se encuentra en determinados alimentos tras su preparación o procesado a altas temperaturas como, por ejemplo, al cocerlos, asarlos o freírlos.

Aunque es probable que la acrilamida haya formado parte de nuestra dieta desde que cocinamos los alimentos, las preocupaciones de seguridad que plantea esta sustancia desde su descubrimiento en alimentos en el año 2002 han empujado a los expertos mundiales a recomendar la reducción de su presencia en los alimentos.

La determinación analítica de Acrilamida en los productos alimenticios se realiza más frecuentemente mediante métodos de separación por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o por cromatografía de gases (GC) con detección espectrométrica de masas (MS), ya sea en modo de monitorización de iones seleccionados (SIM) o mediante espectrometría de masas en tándem (MS / MS) en modo de reacción múltiple (MRM) usando estándares marcados con isótopos.

Tras el consumo, el tracto gastrointestinal absorbe la acrilamida, se distribuye a todos los órganos y se metaboliza. La glicidamida es uno de los principales metabolitos que resulta de este proceso.

Los animales de laboratorio expuestos a la acrilamida de forma oral tienen más probabilidad de desarrollar mutaciones genéticas y tumores (en glándulas mamarias, testículos y glándulas tiroideas en ratas, y en las glándulas harderianas y mamarias, pulmones, ovarios, piel y estómago en ratones, entre otros). La glicidamida es la causa más probable de estos tipos de efectos adversos en animales. La exposición a la acrilamida puede provocar efectos nocivos en el sistema nervioso (incluyendo la parálisis de los cuartos traseros), en el desarrollo pre y postnatal y en la reproducción del macho.

Los resultados de los estudios en humanos proporcionan pruebas limitadas e inconsistentes en cuanto al aumento del riesgo de desarrollo de cáncer (en el riñón, el endometrio y los ovarios) relacionado con la exposición a la acrilamida a través de la dieta. En dos estudios se informa de la relación inversa entre la exposición a la acrilamida y el peso al nacer y otros marcadores de crecimiento fetal. Los expertos de la EFSA han concluido en su evaluación científica sobre acrilamida en alimentos que son necesarias más investigaciones para confirmar estos resultados de los estudios en humanos. Los estudios sobre la exposición de los trabajadores a la acrilamida en el lugar de trabajo muestran un riesgo aumentado de padecer irregularidades en el sistema nervioso. (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2016)

### **1.7.1. Formación de acrilamida**

La acrilamida se puede formar a temperaturas elevadas por varias reacciones, dependiendo de las características del alimento. La cantidad formada depende del tipo de alimento y de las condiciones (temperatura y tiempo) de calentamiento. La reacción más importante y común es una reacción química del tipo de la reacción de Maillard, entre un azúcar reductor, típicamente la glucosa, y la asparragina, por lo que los contenidos de estas sustancias

son críticos. En los derivados de cereales el factor limitante suele ser la asparragina libre, mientras que en las patatas lo es el contenido de azúcares reductores.

La reacción de la glucosa con la asparragina da lugar a la formación de un enlace entre el carbono carbonílico del azúcar y el nitrógeno del grupo amina de la asparagina. (Calvo, 2002)

### **1.7.2. Física y química de la reacción de Maillard**

Durante el calentamiento de los alimentos, los azúcares reductores reaccionan con aminoácidos iniciando una cascada de eventos químicos que conducen al pardeamiento de los alimentos a través de la generación de compuestos reactivos como monocarbonilos y dicarbonilos (Echeverri R, 2014)

Esta reacción se constituye como una reacción de pardeamiento no enzimático, donde las condiciones de pH, temperatura y actividad de agua (*aw*) son específicas para la producción de los distintos compuestos coloreados, hace referencia a varias reacciones simultáneas formando compuestos insolubles y coloreados denominados melanoidinas y otros subproductos (Echeverri R, 2014).

Para que esta reacción ocurra es necesario que se cuente con dos factores principales:

1. Un grupo amino (NH<sub>2</sub>) libre proveniente de aminoácidos (siendo más reactivos la lisina, arginina, histidina, triptófano y asparagina en menor proporción) o proteínas con grupo amino terminal.

2. Grupo carbonilo de un azúcar reductor

Esta reacción se puede favorecer por las condiciones de la matriz del alimento o por el procesamiento, los cuales aceleran o disminuyen la formación de las melanoidinas y subproductos. Además, se ve favorecida a pH alcalinos.

#### ***1.7.2.1. Etapas de la reacción de Maillard***

Etapa inicial: Comienza con una reacción de condensación entre el grupo carbonilo, normalmente de un azúcar reductor, aunque también puede ser un compuesto carbonílico generado en la etapa intermedia de la reacción de Maillard o procedente de la oxidación lipídica, y un grupo amino libre de un aminoácido, péptido o proteína originándose una base de Schiff. Por ciclación, la base de Schiff se transforma rápidamente en la glicosilamina N-sustituida

correspondiente. Cuando la base de Schiff es una aldósilamina N-sustituída, se forma la 1-Amino-1-deoxi-2-cetosa mediante el denominado rearrreglo de Amadori, siendo esta etapa irreversible. Sin embargo, cuando la molécula es una cetosilamina-N-sustituída se forma una 2-amino-2-deoxi-2-cetosa y se le conoce como reorganización de Heyns (Echeverri R, 2014). El primer paso en la producción de acrilamida es la formación de una base de Schiff entre el carbonilo y el grupo  $\alpha$ -amino de la asparagina por medio de la deshidratación del compuesto de N-glicosil.

Etapa avanzada: Los productos de Amadori y Heyns se descomponen dependiendo del pH, la actividad de agua, la presencia de metales divalentes o la temperatura, dando lugar a la formación de diferentes compuestos intermedios responsables del aroma que caracterizan a los alimentos cocinados. A pH neutro o ligeramente ácido, y en condiciones de baja actividad de agua, la reacción predominante es una enolización-1,2 que da lugar a la formación de furfural.

Cuando el azúcar reductor implicado es una pentosa o hidroximetilfurfural en el caso de una hexosa. Por el contrario, a pH básicos tiene lugar una enolización-2,3 formándose reductonas y una variedad de productos de ruptura tales como acetol, piruvaldehído y diacetilo, todos ellos de gran reactividad, lo que hace que participen en nuevas reacciones con otros productos intermedios de la reacción. El producto de Amadori puede degradarse también vía oxidativa hacia compuestos carbonílicos (ruta de Namiki). Los compuestos dicarbonílicos producidos, mediante la degradación de Strecker pueden reaccionar con aminoácidos y dar lugar a la formación de aldehídos con un carbono menos,  $\alpha$ -aminocetonas, y eliminación de CO<sub>2</sub>. Estos aldehídos también juegan un papel importante en el aroma y sabor de los alimentos cocinados (Echeverri R, 2014)

Etapa final: Engloba un gran número de reacciones que incluyen ciclaciones, deshidrataciones, reorganizaciones y condensaciones originando dos clases diferentes de compuestos: los compuestos aromáticos volátiles, siguiendo la vía paralela de Strecker, y las melanoidinas.

Las melanoidinas son polímeros coloreados producidos por reacciones de condensación de compuestos con grupos aminos procedentes de las etapas intermedias de la RM como pirroles N-sustituídos, 2-formilpirroles N-sustituídos, y 2-furaldehído. La estructura de las melanoidinas varía dependiendo de las condiciones en las que haya tenido lugar la reacción, así como del tipo de alimento, además, poseen menor solubilidad que los productos de la reacción de Maillard de partida (Echeverri R, 2014)

### **1.7.3. Precursores y mecanismo de formación de acrilamida**

La vía más importante para la formación de Acrilamida en los alimentos es la ruta asparagina a través de la reacción de Maillard la asparagina es un aminoácido abundante en papas y cereales, el cual es un participante crucial en la producción de acrilamida al reaccionar con el grupo carbonilo de un azúcar reductor como la fructosa o glucosa.

#### Formación de acrilamida

De acuerdo con el proceso al que sean sometidos:

##### Proceso de horneado

Durante el proceso de horneado, ocurre simultáneamente una transferencia de calor y de masa que produce cambios físicos y químicos en el alimento, como son cambios de volumen, evaporación de agua y formación de la corteza. Tal como ocurre en el proceso de fritura, la temperatura y la humedad son parámetros críticos.

#### ***1.7.3.1. Métodos de Reducción de Acrilamida.***

##### Métodos biológicos

La forma más eficaz de reducir acrilamida en los alimentos es reducir la asparagina y los azúcares reductores, los cuales son precursores de acrilamida. Como se sabe estos compuestos están bajo control genético y por lo tanto los niveles pueden variar entre las especies de alimentos. Por lo tanto, la mejora de las concentraciones de asparagina libre y azúcares reductores llevaría a contribuir de manera significativa a la disminución de niveles de acrilamida en los alimentos.

##### Métodos físicos

Consiste en desarrollar procesos en los cuales se modifiquen la temperatura, el tiempo, la humedad durante la transformación. Como se sabe, hay una relación entre la temperatura y el tiempo para la formación de acrilamida en los alimentos. Es por esto por lo que una alternativa en las papas fritas es disminuir la temperatura o el tiempo de fritura utilizando vacío. La reducción del contenido inicial de agua también puede ayudar a reducir la formación de acrilamida en grasa, mientras que el mantenimiento de un cierto nivel de humedad sería bueno para la reducción de acrilamida en los alimentos secos.

## Métodos químicos

Se tiene información que diversos tratamientos anteriores al procesamiento de alimentos extraen aminoácidos libres y azúcares que participan en la formación de acrilamida. La adición de aminoácidos, tales como glutamina, alanina, lisina, cisteína, es uno de los métodos más empleados para disminuir químicamente la formación de acrilamida. Otro de los factores que influye en su formación es el pH interno de la matriz, por lo tanto, el aumento de la acidez por debajo de pH 6 mediante la inmersión de alimentos como las papas fritas en tampones de fosfato y citrato pueden disminuir la formación de acrilamida en los alimentos (Echeverri R, 2014).

Las sustancias antioxidantes también han demostrado eficacia en el control de formación la acrilamida, actúan por medio de la dispersión de electrones libres reactivos a partir de radicales libres producidos en la reacción de Maillard (Friedman, 2008).

### **1.7.4. Prevención de la formación de acrilamida**

La acrilamida se absorbe con facilidad en el tubo digestivo, es neurotóxica, genotóxica, cancerígena, puede alcanzar a los fetos y también pasa a la leche materna. Una vez formada, la acrilamida es estable, y no desaparece en proporciones significativas, salvo en almacenamientos muy prolongados (meses, en el caso del café tostado).

Los alimentos con mayores contenidos de acrilamida son las patatas fritas al estilo tradicional (300 microgramos por kilogramo de media) las patatas chips (unos 700 microgramos por kg) las galletas (350 microgramos por kg) y el café (300 microgramos de acrilamida por kg). La ingesta promedio diaria para adultos se ha estimado entre 0,3 y 3 microgramos de acrilamida por kg de peso y día, con ingestas máximas de 5,1 microgramos de acrilamida por kg de peso y día. La ingestión diaria de los niños, por kg de peso, puede llegar a triplicar estas cifras.

Dados los riesgos que presenta la acrilamida, los organismos internacionales responsables de temas de salud han recomendado que se reduzca el contenido de esta sustancia en los alimentos procesados. Sin embargo, no se ha fijado hasta el momento un límite legal.

La selección de la materia prima condiciona los contenidos de azúcares reductores y de asparagina. En teoría, es posible reducir mucho la formación de acrilamida tratando las materias primas con asparaginasa antes del procesado térmico. En la práctica, su uso presenta problemas técnicos según el alimento, e implica además una elevación de los costes. Otros compuestos amínicos que compitan con la asparagina en la reacción también pueden reducir

la formación de acrilamida. La aproximación con más posibilidades de éxito es la modificación (temperatura y tiempo) de las condiciones de procesado, dadas las grandes diferencias que se observan en un mismo alimento dependiendo de la procedencia.

Los métodos utilizados en el procesamiento de aceitunas maduras de estilo californiano generan acrilamida. Las aceitunas maduras de estilo californiano contienen niveles más altos de acrilamida en comparación con las aceitunas griegas y aceitunas españolas (en las que no se detecta este compuesto), lo que indica que las temperaturas más altas usadas para esterilizar las aceitunas maduras y negras de California son necesarias para la formación de acrilamida.

El procesado previo al almacenamiento en salmuera influye en la formación de acrilamida proporcional al tiempo. La acrilamida aumenta durante los primeros 30 días de almacenamiento. Los tiempos de almacenamiento más largos de salmuera (> 30 días) resultan en niveles más bajos de acrilamida en el producto terminado.

La presencia de iones de calcio en la solución de salazón de pre-procesamiento da como resultado niveles más altos de acrilamida en productos acabados. La oxidación durante el procesamiento y la neutralización de las aceitunas antes de la esterilización aumenta significativamente la formación de Acrilamida en los productos acabados. Por el contrario, el tratamiento con lejía disminuye los niveles de acrilamida en el producto final.

Los resultados indican que los pasos específicos en el procesamiento de aceitunas maduras negras de California pueden manipularse para mitigar la formación de acrilamida en productos acabados (Charoenprasert, 2014)

#### **1.7.5. ¿Existe una “dosis tolerable” de acrilamida?**

La acrilamida y su metabolito, la glicidamida, son genotóxicas y carcinógenas. Puesto que cualquier nivel de exposición a una sustancia genotóxica podría dañar de forma potencial el ADN y conllevar la aparición de cáncer, los científicos de la EFSA concluyen que no pueden establecer una ingesta diaria tolerable (TDI) de acrilamida en alimentos.

En su lugar, los expertos de la EFSA estimaron el rango de la dosis en el que la acrilamida presenta más probabilidad de causar una pequeña pero apreciable incidencia de tumores (llamado efecto neoplásico) u otros efectos adversos potenciales (neurológicos, en el desarrollo pre y postnatal y en la reproducción masculina). El límite mínimo de este rango se denomina Límite mínimo de confianza para la dosis de referencia (BMDL<sub>10</sub>).

- Para los tumores, los expertos seleccionaron un BMDL<sub>10</sub> de 0,17 mg/kg de peso corporal/día.
- Para otros efectos, los cambios neurológicos más relevantes que se observaron fueron aquellos con un BMDL<sub>10</sub> de 0,43 mg/kg de peso corporal/día.

Comparando el BMDL<sub>10</sub> con la exposición de los humanos a la acrilamida a través de la dieta, los científicos pueden indicar un “nivel de peligro sanitario” conocido como margen de exposición (MOE). (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2016).

El enfoque basado en el margen de exposición (MOE) proporciona una indicación del nivel de peligro sanitario sobre la presencia de una sustancia en los alimentos sin cuantificar el riesgo. El uso del MOE puede ayudar a los gestores del riesgo a definir las posibles acciones necesarias para mantener la exposición a dichas sustancias tan baja como sea posible.

El Comité Científico de la EFSA declara que un MOE de 10.000 o mayor para las sustancias genotóxicas y cancerígenas presenta un nivel bajo de peligro para la salud pública. Los MOE para los efectos de la acrilamida relacionados con el cáncer varían entre 425 para consumidores medios adultos y 50 para los consumidores extremos bebés (tabla 30, página 210 de la opinión de EFSA). Estos rangos indican un peligro potencial para la salud pública.

Para las sustancias no genotóxicas, un MOE de 100 o más normalmente indica que no existe peligro para la salud pública. Los MOE para los efectos neurológicos de la acrilamida varían entre 1075 para un consumidor medio adulto y 126 para bebés con una ingesta elevada. Los expertos de la EFSA concluyeron que, para estos efectos, los niveles actuales de exposición a través de la dieta no presentan un peligro para la salud, aunque para bebés y niños con una alta exposición a través de la dieta, el MOE se acerca a los valores que pueden presentar peligro para estos efectos (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2016).

#### **1.7.6. ¿Qué alimentos contribuyen a la exposición a la acrilamida?**

Los principales contribuyentes varían según la edad:

**Adultos:** Los productos derivados de las patatas fritas (incluyendo las patatas fritas y las patatas asadas) representan hasta el 49% de la exposición media en adultos, el café un 34% y el pan blanco un 23%, son las fuentes de alimentación principales en adultos, seguidos por las galletas, las galletas saladas y el pan crujiente y otros productos derivados de las patatas.

**Niños (> 1 año) y adolescentes:** los productos derivados de las patatas fritas (excepto las patatas chips y los aperitivos) presentan hasta un 51% de toda la exposición a través de la dieta. El pan blando, los cereales de desayuno, las galletas y otros productos derivados de los cereales o de las patatas pueden contribuir hasta con un 25%. Los alimentos procesados para bebés con cereales representaban hasta el 14% de la exposición para los bebés. Los pasteles y los productos de confitería hasta el 15% para niños y adolescentes, y las patatas chips y los aperitivos el 11% para los adolescentes.

**Bebés (< 1 año):** los alimentos para bebés que no son elaborados a base de cereales, los que han sido elaborados a base de cereales (sobre todo biscotes y galletas) y otros productos derivados de las patatas contribuyen con un 60%, 30% y 48%, respectivamente.

Aunque algunas categorías de alimentos, como las patatas fritas o los aperitivos y los sucedáneos del café, contienen niveles relativamente elevados de acrilamida, su contribución global a la exposición a través de la dieta es limitada si se sigue una dieta normal variada. (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2016).

#### ***1.7.6.1. ¿Se puede reducir la exposición a la acrilamida en los alimentos?***

Aunque la evaluación de riesgo de EFSA no se centra en este aspecto, los expertos de la EFSA revisaron los estudios y datos científicos disponibles sobre cómo la elección de ingredientes, el método de almacenamiento y la temperatura a la que se cocinan los alimentos influyen en la cantidad de acrilamida en diferentes tipos de alimentos.

A nivel de industrias alimentarias, en la UE se consideró que la aplicación de buenas prácticas durante el procesado de determinados alimentos debería ser efectiva y reducir la formación de acrilamida en el producto final, de modo que la Comisión Europea avaló una serie de medidas voluntarias para la industria en este sentido (Caja de Herramientas de Acrilamida) de cara a tenerlas en cuenta en sus sistemas de Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (APPCC). Esta Caja de Herramientas ha sido elaborada por la asociación europea Food and Drink Europe (FDE) en colaboración con las autoridades nacionales y la Comisión Europea y ha sido actualizada por última vez en 2013.<sup>1</sup> Algunos extractos de esta Caja de Herramientas se han trasladado a folletos informativos para ayudar a los operadores económicos a ponerlos en práctica. Actualmente existen folletos para galletas y crackers,

---

<sup>1</sup> Durante la corrección de este trabajo se publicó un nuevo REGLAMENTO (UE) 2017/2158 DE LA COMISIÓN de 20 de noviembre de 2017 por el que se establecen medidas de mitigación y niveles de referencia para reducir la presencia de acrilamida en los alimentos.

productos de panadería, cereales de desayuno, patatas fritas de bolsa, patatas fritas y alimentos infantiles.

Por otra parte, a nivel de consumidores existen recomendaciones de fritura elaboradas por la industria para reducir los contenidos de acrilamida en las patatas prefritas ([www.goodfries.eu](http://www.goodfries.eu)). Estas recomendaciones han sido publicadas por la Asociación Europea de Transformadores de la Patata (EUPPA) como una nueva herramienta sobre cómo cocinar mejor las patatas fritas destinada a profesionales y consumidores para reducir su contenido en acrilamida. Además, la Aecosan ha elaborado unas recomendaciones para el cocinado a nivel nacional destinadas a la reducción de acrilamida que incluye alimentos del ámbito doméstico, entre ellos, las patatas fritas.

Además de en alimentos, la acrilamida está presente en el tabaco, que además es una fuente de exposición no dietética para los fumadores y los no fumadores (fumadores pasivos). Para los fumadores, el tabaco es una fuente de exposición de acrilamida más significativa que los alimentos.

Como la acrilamida tiene una gran variedad de usos industriales no alimentarios, también puede darse el caso de que algunas personas se expongan en el lugar de trabajo mediante absorción epidérmica o inhalación. (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, 2016).

#### **1.7.7. Métodos para la detección de acrilamida**

Se han publicado en revistas científicas varios métodos analíticos que describen el análisis de acrilamida en alimentos (Wenzl, De-la-Calle, & Anklam, 2003). Estos métodos se basan principalmente en el empleo de la Espectrometría de Masas (MS) antecedido de una separación cromatográfica por LC (Ono, et al., 2003).

La elección del mejor método cromatográfico ha sido fundamental ya que se pretendía que los resultados finales obtenidos fueran de la máxima calidad debido a la importancia que tiene el resultado que se obtenga respecto a la seguridad alimentaria. Por tanto, se realizó una búsqueda bibliográfica de los métodos analíticos que empleaban otros investigadores para la puesta a punto y validación del método de determinación de la acrilamida.

Se ha desarrollado un método analítico sensible, robusto y de un costo razonable, que pueda cuantificar acrilamida en aceitunas negras oxidadas con bajos niveles de detección (ng/g). Debido a la alta solubilidad y alta reactividad de la acrilamida, hace que no sea fácilmente detectable (Jezuseek & Schieberle, 2003). En los últimos años se han desarrollado

diferentes métodos de análisis para determinar el contenido en acrilamida en diversos productos agroalimentarios. La mayoría son métodos clásicos basados en la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) o técnicas cromatográficas con gas (Cromatografía Gaseosa) (Bologna, Andrawes, Barvenik, Lentz, & Sojka, 1999).

Haciendo una revisión bibliográfica, observamos que en el año 2002 se publica uno de los primeros métodos de análisis de la acrilamida aplicado a diversos alimentos tanto cocidos como procesados. Este método se basó en el uso de la cromatografía líquida con espectrometría de masas (LC-MS/MS) (Rosen & Hellenäs, 2002)

### **1.8. Hidroximetilfurfural**

Un precursor de la Acrilamida es el Hidroximetilfurfural (HMF), es considerado un importante contaminante químico de neoformación en productos de panadería y galletería además del café y el cacao, debido a su alto potencial toxicológico y a su concentración elevada en estos alimentos. El HMF es un aldehído cíclico formado tanto a través de la RM como de la deshidratación de los azúcares (caramelización). El HMF está ampliamente distribuido en la dieta occidental y se ha identificado en una gran variedad de alimentos procesados (Arribas, 2009).

### **1.9. Metodología de superficie de respuesta**

La metodología de superficie de respuesta, RSM por sus siglas en inglés, es un conjunto de técnicas matemáticas y estadísticas basadas en el ajuste de los datos experimentales a una ecuación polinómica, la cual debe describir el comportamiento de una serie de datos con el objetivo de realizar previsiones estadísticas. La superficie representada por dicho polinomio se llama superficie de respuesta.

Antes de aplicar la metodología RSM, es necesario elegir adecuadamente un diseño de experimentos (DOE), un conjunto de experimentos definidos por una matriz compuesta por combinaciones a diferentes niveles de las variables estudiadas. El objetivo de un diseño experimental es obtener la máxima información posible con el menos número de experimentos.

Para la construcción de un diseño experimental se llevan a cabo las siguientes etapas interrelacionadas:

- a. En primer lugar, definir el objetivo que se pretende: encontrar unas condiciones óptimas, seleccionar las variables más importantes que influyen en un sistema determinado en estudio,

encontrar una región estable de la respuesta, conseguir un compromiso entre varias respuestas, etc.

b. A continuación fijar las variables que se estudiarán y controlarán en el diseño (factores o variables de diseño) y sus niveles y rango de variación. Además, se fijarán las variables que se medirán para interpretar los resultados de los distintos experimentos y evaluar su precisión (variables de respuesta).

c. Por último se procederá a la elección de un diseño adecuado al objetivo propuesto, al número de factores y a la precisión de las medidas. En el supuesto de que dos o más diseños se ajusten a las necesidades propuestas, la elección será en función del mínimo coste económico y temporal que requiera el diseño.

Existen diferentes tipos de diseños experimentales. Los diseños estándares más frecuentemente utilizados son: Diseño Factorial Completo, Diseño Factorial Fraccionado, Diseño de Box-Behnken y Diseño Central Compuesto (DCC), es este último procedimiento el que se ha empleado para el diseño experimental.

### **1.9.1. Diseño Central Compuesto (DCC)**

Se considera una extensión del diseño factorial completo a dos niveles, en concreto es un diseño de primer orden ( $2^f$ ) ampliado con puntos adicionales, centrales y axiales, con el fin de permitir la estimación de los coeficientes de regresión de un modelo polinómico de segundo orden. Este diseño es una alternativa al diseño factorial, con la gran ventaja de que el número de experiencias es menor.

Está compuesto de tres tipos distintos de experimentos:

1. Muestras en el hipercubo que cruzan los niveles superiores e inferiores de las variables de diseño.
2. Muestras centrales que son las réplicas de los experimentos que cruzan los niveles medios de todas las variables.
3. Muestras estrella, que son los experimentos que cruzan los niveles medios de todas las variables excepto de una con los niveles extremos (estrella) de esta última. Estas son específicas de este tipo de diseño.

Un diseño DCC con sólo dos factores vendría representado por la Figura 1.12:

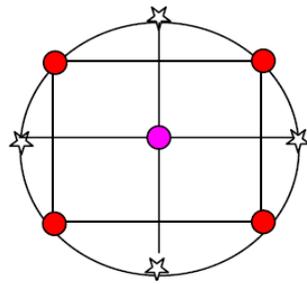


Figura 1. 12. DCC para dos factores. Muestras en el cubo (●), Muestras estrellas (☆) y Muestra central (●)

Una vez realizados los experimentos determinados por el tipo de diseño elegido, se procede a la determinación de los coeficientes polinómicos del modelo experimental. Del estudio del mismo puede deducirse no sólo la forma de dependencia de la respuesta con las variables consideradas, sino las condiciones óptimas buscadas. Habitualmente se realiza un Análisis de la Varianza (ANOVA), con el que se comprueba la significancia del modelo, la utilidad de las interacciones y los términos cuadrados, la calidad del ajuste del modelo y, en último término, la bondad de la superficie de respuesta. Para ello, se utiliza el software informático Design Expert,

La bondad de la superficie de respuesta la indica el ANOVA a través de los parámetros: coeficiente de determinación,  $R^2$  (R-Square), falta de ajuste del modelo cuadrático (Lack of Fit) y comprobación del modelo cuadrático (Model Check Quadratic). Estos dos últimos parámetros tienen unos determinados valores “p” para un nivel de confianza del 95%, de tal forma que, un valor de p inferior a 0,05 para comprobación del modelo cuadrático indica que la parte cuadrática del modelo es significativa, es decir, que las interacciones y términos cuadrados incluidos en el modelo son útiles; un valor de p superior a 0,05 para falta de ajuste del modelo indica que la pérdida o falta de ajuste del modelo no es significativa. Por otra parte, el  $R^2$  interesa que sea lo más cercano a 1 posible. El ANOVA que presenta un buen valor de  $R^2$  lleva asociado un buen valor de comprobación del modelo cuadrático y falta de ajuste del modelo y, en definitiva, que la superficie de respuesta es válida para elegir el punto óptimo, que generalmente son las condiciones de las variables que maximizan la respuesta elegida. En el caso del mapa de contorno se puede deducir una zona alrededor del punto óptimo donde la respuesta no presenta una diferencia significativa respecto a la respuesta máxima, dicha zona será interesante puesto que describe unos valores de las variables que pueden ser considerados como óptimos también. El ANOVA, además, presenta los valores “p” para cada uno de los factores y las interacciones entre ellos, de forma que un valor de p inferior a 0,05 indica que ese factor o interacción influye de forma significativa.

El estudio de los residuos permite la detección de posibles outliers (muestras que no se ajustan al modelo) y, por último, la visualización de las superficies o de las gráficas de contornos, posibilita una interpretación final. Normalmente se utiliza en un screening cuyo objetivo final es la eliminación de factores no significativos, para optimizar sólo los factores significativos.

## **2. OBJETIVOS**

## 2. OBJETIVOS

El presente trabajo analiza un producto alimentario, las aceitunas de mesa negras oxidadas, un tipo de aceituna con una gran aceptación por los consumidores en muchos países y que sirve de base como ingrediente para diversos alimentos procesados como la pizza. Las producciones y exportaciones de este tipo de aceituna están en plena ascensión por su gran uso para elaborar otros alimentos procesados como pizzas y otros. La preocupación de la EFSA, como autoridad europea de seguridad alimentaria, por la presencia de acrilamida en los alimentos le ha llevado en el año 2015 a incluir las aceitunas negras oxidadas en su informe anual. En él se recomienda analizar el contenido en ese compuesto tóxico e intentar disminuir su concentración en este tipo de aceitunas. También es importante determinar la influencia que tienen tratamientos térmicos posteriores, como el horneado, sobre la producción de acrilamida en este producto, ya que una de las aplicaciones más habituales de las aceitunas negras oxidadas es la elaboración de pizzas.

Es por todo ello que se ha planteado realizar un estudio para caracterizar las aceitunas negras oxidadas que se comercializan en España y Portugal, analizando la presencia de un compuesto tóxico, la acrilamida en este producto y determinando el efecto del horneado sobre su concentración.

Para alcanzar este objetivo general, se plantean diferentes objetivos particulares:

1. Caracterizar, mediante análisis físico-químicos e instrumentales, aceitunas negras oxidadas comerciales de España y Portugal.
2. Analizar la concentración de acrilamida en aceitunas negras oxidadas comerciales.
3. Determinar la influencia de tratamientos de horneado de aceitunas negras oxidadas sobre la concentración de acrilamida.
4. Analizar los resultados obtenidos y llevar a cabo la toma de decisiones.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. Material

##### 3.1.1. Materia prima

Aceitunas negras oxidadas: para el estudio se utilizaron aceitunas de fueron 15 marcas comerciales, 11 españolas y 4 portuguesas.

Tabla 3. 1. Marcas y Lotes utilizados en el estudio

Marca	Código	Lote	Hora	Caducidad	Calibre
1	FN1	L541F	09:50	10/10/2018	240/360
2	FB2	630C	15:30	27/07/2019	160/180
3	EC3	L-6260A	07:31	09/2019	180/220
4	DI4	617B	09:07	26/04/2018	240/260
5	SE5	L-6219	16:06	06/08/2020	240/260
6	CR6	014L209016	21:04	27/07/19	261/290
7	LE7	L:05/04/19 16	09:57	05/04/19	200/260
8	CA8	014L104016	21:19	13/04/19	240/260
9	AL9	L-04/08/21			
10	HC10	L06/10/19 1613:32:16		06/10/19	180/220
11	SP11	L-05/08/21			
12	QA12	L 030986		11/2018	
13	CO13	LP 338 P22	13:46	03-12-2019	291-320
14	MA14	LD6091203		09/2019	261/290
15	OS15	P.0 27-10-2016 LP 301 P21	12:58	10/2018	



Figura 3. 1. Frascos comerciales usados en el estudio

### 3.1.2. Equipos

**Peso:** Las pesadas de precisión se llevaron a cabo en una balanza METTLER TOLEDO modelo AB54-S, de precisión +/-0,0001 g

**pH:** Para la medición del pH se utilizó un pH-metro de electrodo combinado de la marca CRISON, modelo Basic20



Figura 3. 2. pH-metro CRISON, modelo Basic20. Fuente: Laboratorio de Nutrición y Bromatología de la Escuela de Ingenierías Agrarias

**Colorímetro:** Para determinar las coordenadas de color del espacio CIELAB (L\*: luminosidad, a\*: coordenada rojo-verde y b\*: coordenada amarillo-azul) se utilizó el colorímetro Konica Minolta Spectrophotometer CM-600d

**Polifenoles:** Para determinar el contenido de polifenoles se utilizó un espectrofotómetro UV/VIS de la serie BIOMATETM 3 de Thermo Scientific



Figura 3. 3. Espectrofotómetro UV/VIS de la serie BIOMATETM 3 de Thermo Scientific.  
Fuente: Laboratorio de Nutrición y Bromatología de la Escuela de Ingenierías Agrarias.

Para las diferentes determinaciones también se utilizaron distintos materiales de uso general de laboratorio, como matraces, probetas, buretas, pipetas Pasteur, placas Petri, etc.

### **Material para ensayos microbiológicos**

Recuento de Bacterias aerobias mesófilas: Se empleó medio Plate Count Agar (PCA) a 30°C

Recuento de Bacterias ácido-lácticas: Para el recuento de bacterias ácido-lácticas se empleó (MRS) a 37°C en anaerobiosis.

Recuento de Enterobacterias totales: El medio de cultivo utilizado fue el Agar Bilis Glucosa Rojo Neutro Cristal Violeta (VRBG) a 30°C

Recuento de Enterobacterias lactosa positivas (coliformes): El medio de cultivo utilizado fue el Agar Bilis Lactosa Rojo Neutro Cristal Violeta (VRBA) a 37°C

Recuento de Bacillus: Se empleó *Bacillus Cereus* Agar (MYP) a 30°C

Recuento de levaduras: Se utilizó el medio el medio YEPD (extracto de levadura 1%, peptona de carne 2% y glucosa 2% y agar bacteriológico 2%) a 30°C

Recuento de Pseudomonas (Agar Pseudomona): Se utilizó el medio Agar *Pseudomonas* P a 30°C



Figura 3. 4. Kit de Medios de cultivos preparados.

Los medios de cultivo para el análisis microbiológico se prepararon en agitadores magnéticos con calefacción de SELECTA, mod. AGIMATIC-E para posteriormente ser esterilizados, al igual que las soluciones y material de laboratorio en el autoclave de SELECTA mod. PRESOCLAVE 75 (exceptuando VRBA y VRBG que no necesitan autoclavado).



Figura 3. 5. Preparación de Medios de cultivos.

Se utilizaron micropipetas BIOHIT Proline de volúmenes 0,5-10  $\mu$ l 5-50  $\mu$ l; 50-200  $\mu$ l, 200-1.000  $\mu$ l y de 1-5 ml; y micropipetas PLURIPET KARTELL de 0,1-2  $\mu$ l, 0,5-10  $\mu$ l y de 2-20  $\mu$ l y puntas de plástico para pipetas, agitadores de tubos HEIDOLPH, Mod. Reax-top, placas Petri y mechero Bunsen.

### **Fenoles individuales:**

La determinación y cuantificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo en un sistema HPLC 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

### **Acrilamida:**

Las muestras se analizaron utilizando un cromatógrafo de líquidos Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies), acoplado con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6460 (Agilent Technologies).

### **Hidroximetilfurfural**

El equipo utilizado fue un cromatógrafo de líquido 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipado con una bomba cuaternaria, un desgasificador, un muestreador termostatzado y un detector DAD (Diode Array).

### **Humedad**

El equipo utilizado fue una estufa a 100 °C.

### **Horneado**

El equipo utilizado para el Horneado fue una mufla Nabertherm modelo L9/c19.



Figura 3. 6. Mufla usada para el horneado de la Aceituna.

### 3.2. Métodos

Tabla 3. 2. Esquema de análisis realizados sobre las muestras de aceitunas.

<b>ANÁLISIS</b>	<b>DETERMINACIONES</b>	<b>MUESTRA</b>
<b>FISICO-QUÍMICO</b>	Determinación de la acidez libre	SALMUERA
	Medida del pH	SALMUERA
	Contenido de polifenoles totales	SALMUERA
	Control de cloruros	SALMUERA
	Control de azúcares reductores	SALMUERA
	Medición de grados Brix	SALMUERA
<b>MICROBIOLOGICO</b>	Control calidad microbiológica	SALMUERA
<b>INSTRUMENTAL</b>	Determinación del color instrumental	ACEITUNA
	Determinación de la textura	ACEITUNA
	Medición de la actividad antioxidante	SALMUERA ACEITUNA
	Perfil de compuestos fenólicos	SALMUERA ACEITUNA
	Contenido en Hidroximetil-furfural	ACEITUNA
	Contenido en acrilamida	SALMUERA ACEITUNA

### 3.2.1. Control de parámetros físico-químicos

#### 3.2.1.1. Determinación de la acidez libre

La forma de determinar la acidez titulable o libre en la salmuera de fermentación de las aceitunas de mesa fue utilizando el método 15.017 (IOOC. Internacional Olive Oil Council Method , 1990) mediante titulación directa de la muestra. La muestra de 10 ml de salmuera se valoró con una solución de sosa Dornic (NaOH 0,1N) añadiendo como indicador fenolftaleína hasta producirse el viraje a un color rosado manteniéndose al menos durante diez segundos.

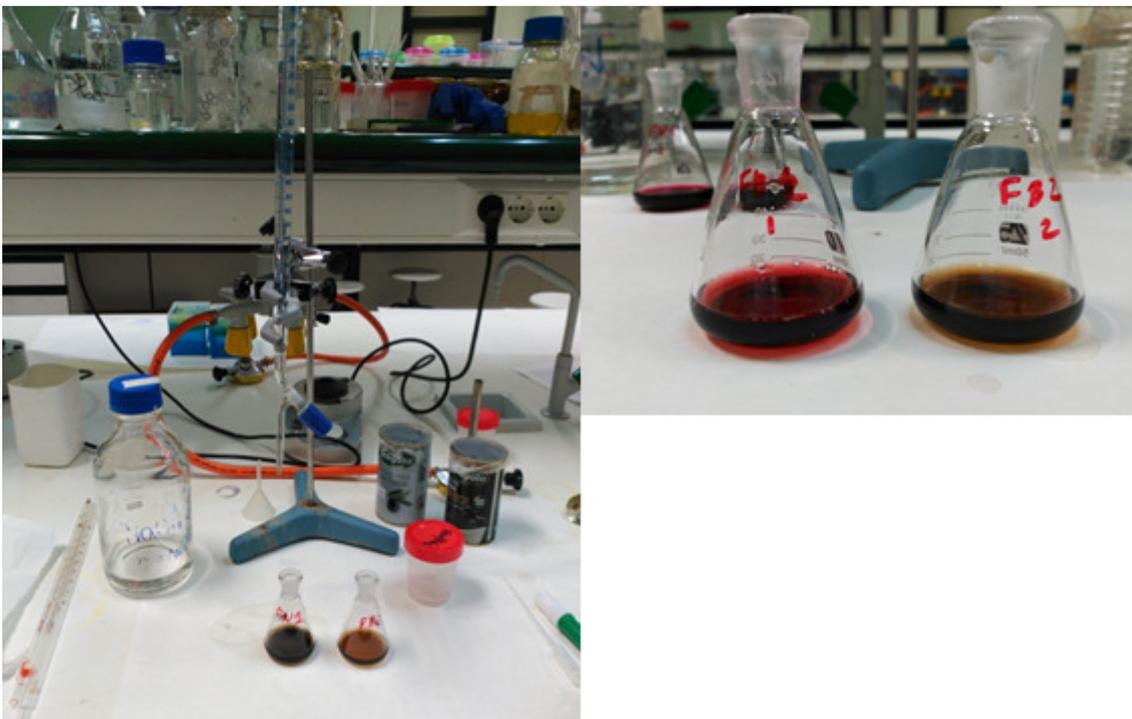


Figura 3. 7. Determinación de la acidez libre en la salmuera.

Con el volumen gastado de NaOH en cada determinación se calculó mediante la ecuación la acidez total expresada como gramos de ácido láctico por 100 ml de salmuera (p/v), realizándose cada muestra por duplicado.

$$\text{Ecuación: } \textit{Acidez total} = 0,9 * N * V \frac{\textit{g ácido láctico}}{100 \textit{ ml salmuera}}$$

V: volumen gastado de NaOH 0,1N / N: Normalidad NaOH 0,1N

Ecuación 3. 1. Cálculo de la Acidez total.

### 3.2.1.2. Medida del pH

Para determinar el pH de las muestras se analizaron las mismas directamente al abrir el frasco comercial que contenía a las aceitunas de mesa, midiéndose mediante un pHmetro de electrodo combinado de la marca CRISON, modelo Basic20. Cada muestra se analizó por duplicado.

### 3.2.1.3. Contenido de polifenoles totales

El método que se utilizó para la determinación de fenoles fue el de Folin Ciocalteu. La determinación mediante la reacción de Folin-Ciocalteu se basa en la oxidación de los compuestos polifenólicos de la salmuera por el reactivo Folin-Ciocalteu, dando una coloración azul directamente proporcional al contenido de polifenoles y medible a 750 nm por espectrofotometría UV/VIS. En un matraz aforado de 25 ml se introdujeron 10 ml de agua destilada, 0,1ml de salmuera, 1ml de reactivo Folin-Ciocalteu, tras 3 minutos se añadieron 2 ml de carbonato y se enrasó hasta 25ml con agua destilada. Se agitó el matraz para homogeneizar y se esperó 1 hora en ausencia de luz para estabilizar la reacción. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia a 750 nm (750 A) en un espectrofotómetro UV/VIS serie BIOMATE™ 3 de Thermo Scientific con una cubeta de 1 cm frente a un blanco preparado con agua destilada.

Cada muestra se realizó por duplicado realizando tres mediciones de cada duplicado. Se realizó una recta de calibrado para cada espectrofotómetro con ácido gálico con concentraciones de 0 g/L; 0,1 g/L; 0,25 g/L; 0,5 g/L; 0,75 g/L y 1g/L partiendo de una solución madre de 1g/l de ácido gálico.

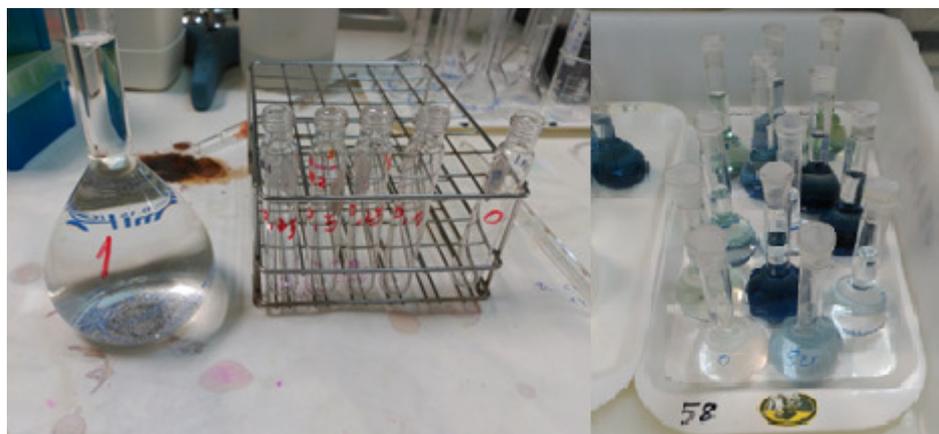


Figura 3. 8. Realización de la curva de ácido gálico.

### 3.2.1.4. Control de cloruros

Se determinó la concentración de NaCl de la salmuera mediante el método de Mohr (1986). Para ello, se valoró la muestra con nitrato de plata. El resultado se expresó como porcentaje en peso de NaCl existente en 100 ml de la muestra de salmuera. Cada muestra se realizó por duplicado.

$$\% \text{ NaCl} = 1.V \text{ (gasto de nitrato de plata)}$$

Ecuación 3. 2. Porcentaje de NaCl



Figura 3. 9. Determinación de cloruros.

### 3.2.1.5 Determinación de azúcares reductores

Se determinó la concentración de azúcares reductores presentes en la salmuera según el método de Luff-Schoorl. Para ello, se realizó una preparación de la muestra de salmuera; a 25 ml de salmuera se le añadieron 5 ml de la disolución de Carrez I (150 ml de cianoferrato (II) de potasio/l) y 5 ml de Carrez II (230 g de acetato de cinc/l), enrasando con agua destilada hasta 250 ml.

A continuación, se realizó la valoración según el método de Luff Schoorl, se tomaron 25 ml de la muestra preparada y se le añadieron 25 ml del reactivo de Luff-Schoorl. Se calentó en baño de arena a reflujo hasta ebullición, dejando bullir durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se enfrió rápidamente, se añadieron 3 g de yoduro potásico y 25 ml de ácido sulfúrico 6N. Por último, se valoró con tiosulfato 0,1 N, hasta viraje utilizando almidón como indicador. Se realizó una valoración en blanco. El resultado se expresó en gramos de azúcares/100ml de muestra.



Figura 3. 10. Determinación de azúcares reductores. Fuente: Laboratorio de Nutrición y Bromatología de la Escuela de Ingenierías Agrarias.

### 3.2.1.6. Medición de grados Brix

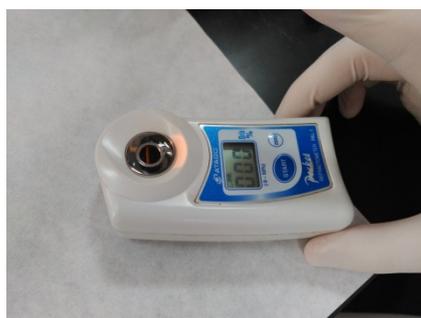


Figura 3. 11. Refractómetro.

Para la medición de grados Brix usamos un refractómetro digital Atago PAL 1.

### 3.2.2. Control calidad microbiológica

Las siembras se realizaron en campanas de flujo laminar TELSTAR mod. AV-100 y AH-100.

Para ello se tomaron muestras de salmuera directamente en la apertura del frasco comercial y en condiciones de asepsia, para evitar la contaminación de la muestra.



Figura 3. 12. Placas de cultivo.

### 3.2.3. Control instrumental

#### 3.2.3.1. *Determinación del color instrumental de la Aceituna*

Para ello se realizaron las medidas de color en la superficie de las aceitunas mediante un colorímetro Konica Minolta Spectrophotometer CM-600d. Se midió la reflectancia con un ángulo sobre la vertical de visión de  $0^\circ$  con iluminante tipo D65. El análisis de color se realizó determinando las coordenadas del espacio CIELAB ( $L^*$ : luminosidad;  $a^*$ : coordenada roja-verde y  $b^*$ : coordenada amarillo-azul) calculándose la cromaticidad global de la muestra, saturación o intensidad del color ( $C^*$ ) y el ángulo de Hue (ángulo con el que un vector irradia dentro de un cuadrante del rojo ( $0^\circ$ ) al verde ( $90^\circ$ )) (Konica Minolta, 1993) o tono ( $H^*$ ).

La determinación se realizó en la apertura del frasco comercial y se analizaron todas las aceitunas del frasco.

#### 3.2.3.2. *Determinación de la textura Aceituna*

En la determinación de la textura de las aceitunas se utilizó un texturómetro modelo TA.TX2 (Stable Micro System©, U.K.), de la marca ANAME.



Figura 3. 13. Texturómetro modelo TA.TX2 (Stable Micro System©, U.K.). Laboratorio de Nutrición y Bromatología de la Escuela de Ingenierías Agrarias. Fuente: Elaboración propia.

La monitorización de la textura de las aceitunas se llevó a cabo mediante el texturómetro TA.TX2 Figura 3.13. En cada análisis se tomaron todas las aceitunas de cada frasco comercial. La mitad se usaron para determinar la textura por el método de punción y la mitad por el método de compresión. Para cada muestra se analizó la dureza que se cuantificó como la fuerza máxima alcanzada durante la punción del fruto. Los datos obtenidos con esta determinación fueron fuerza máxima expresada en kg, distancia en mm y pendiente de la curva obtenida. En las tablas se recogen los valores de los distintos parámetros empleados en las mediciones efectuadas.

Tabla 3. 3. Valores de los parámetros en las mediciones realizadas por el método de Compresión (TPA)

Parámetros	Valores
Velocidad del ensayo (mm/s)	0,5
Profundidad (Distancia) (mm)	4
Fuerza de Activación (N)	0,04903

Tabla 3. 4. Valores de los parámetros en las mediciones realizadas de punción

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

### 3.2.3.3. Medición de la actividad antioxidante

Se determinó la actividad antioxidante en la salmuera y en las aceitunas negras. Consiste en determinar la capacidad de captura del radical libre DPPH<sup>\*</sup> por parte de los compuestos antioxidantes, adaptación de (Brand-Williams, Cuvelier, & Berset, 1995).

Preparación de reactivos:

DPPH (60  $\mu$ M) 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.

Pesar 0.0059 g de DPPH en un zapato y disolver poco a poco en un vaso de precipitado con metanol HPLC, a continuación, ir trasvasando a un matraz aforado de 250 ml hasta enrasar. Una vez preparada en el matraz aforado, tapar con papel de aluminio y parafilm para evitar la luz y que el metanol se evapore y varíe la concentración de la disolución. La disolución de DPPH debe conservarse en frigorífico y cuando tenga que utilizarse reservar en un vaso de precipitado la cantidad que vayamos a utilizar y conservar en frigorífico el resto. Este vaso de precipitado en todo momento debe estar cubierto con papel de aluminio y parafilm, aunque lo tengamos fuera del frigorífico porque se esté utilizando. El bote con el DPPH sólido se guarda en frigorífico, al igual que la disolución de 60  $\mu$ M.



Figura 3. 14. Preparación de DPPH.

En la determinación de la actividad antioxidante de la salmuera se prepararon distintas concentraciones en un volumen final de 30  $\mu\text{l}$  (desde 30  $\mu\text{l}$  de MeOH HPLC (será nuestro control) hasta 30  $\mu\text{l}$  de muestra).

Las concentraciones usadas fueron las indicadas en la Tabla 3.5.

Tabla 3. 5. Preparación de DPPH.

<b>%</b>	<b>Diluciones</b>
<b>10 %</b>	(3 $\mu\text{l}$ muestra, 27 $\mu\text{l}$ MeOH HPLC)
<b>16,66 %</b>	(5 $\mu\text{l}$ muestra, 25 $\mu\text{l}$ MeOH HPLC)
<b>26,66 %</b>	(8 $\mu\text{l}$ muestra, 22 $\mu\text{l}$ MeOH HPLC)
<b>33,33 %</b>	(10 $\mu\text{l}$ muestra, 20 $\mu\text{l}$ MeOH HPLC)
<b>50 %</b>	(15 $\mu\text{l}$ muestra, 30 $\mu\text{l}$ MeOH HPLC)
<b>66,66 %</b>	(20 $\mu\text{l}$ muestra, 10 $\mu\text{l}$ MeOH HPLC)
<b>83,33 %</b>	(25 $\mu\text{l}$ muestra, 5 $\mu\text{l}$ MeOH HPLC)
<b>100 %</b>	(30 $\mu\text{l}$ muestra, 0 $\mu\text{l}$ MeOH HPLC)

Adicionar a cada cubeta 1,17 ml de DPPH, volumen final de 1,2 ml en la cubeta. Transcurridos 30 min desde la adición del metanol a la primera cubeta, medir la absorbancia y anotar en un papel.

La absorbancia fue medida a 520 nm en el equipo Thermo Scientific Appliskan<sup>®</sup>.



Figura 3. 15. Preparación de DPPH y medida de la absorbancia.

Las medidas quedan recogidas en un software informático.

Una menor absorbancia de la mezcla de reacción indica una mayor actividad de eliminación de radicales libres. Las pruebas se realizaron por duplicado. Para cada extracto fenólico, se calculó la concentración que proporcionaba el 50% de inhibición (IC 50) a partir del gráfico del porcentaje restante de DPPH frente a la concentración del extracto. El porcentaje restante de DPPH se calculó usando la siguiente ecuación:

$$\%DPPH_{rem} = (A_{sample} / A_{control}) \times 100$$

### Ecuación 3. 3. DPPH remanente.

A<sub>sample</sub> y A<sub>control</sub> se refieren a la absorbancia a 520 nm de DPPH en la muestra y soluciones de control, respectivamente.

Para la medición de la actividad antioxidante en la aceituna, se realizó una extracción y posteriormente se procedió de la misma forma que para la salmuera.

#### ***3.2.3.5. Perfil de compuestos fenólicos en Salmuera***

La determinación y cuantificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo en un sistema HPLC 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipado con una bomba cuaternaria, un desgasificador, un muestreador automático, una columna con compartimento termostatzado provisto de detectores de diode array (DAD) y fluorescencia (FLD). La columna analítica utilizada fue una Gemini-NX C18 110 amstrong (150 mm longitud x 4,6 mm diámetro interno 3 μm tamaño partícula) de Phenomenex (Torrance, USA). La temperatura de trabajo de la columna fue de 40 °C con un flujo constante de 1mL/min y un volumen de inyección de 10 μL. Las fases móviles fueron agua (Fase A) y acetonitrilo (fase B), conteniendo cada una de ellas 0.1 % v/v ácido fórmico. El gradiente utilizado fue de 97:3 durante 1 minuto, 65:35 t=30 min, 50:50 t=33 min y 100 %B desde t=34 min hasta el final del cromatograma.

## Identificación y cuantificación de polifenoles

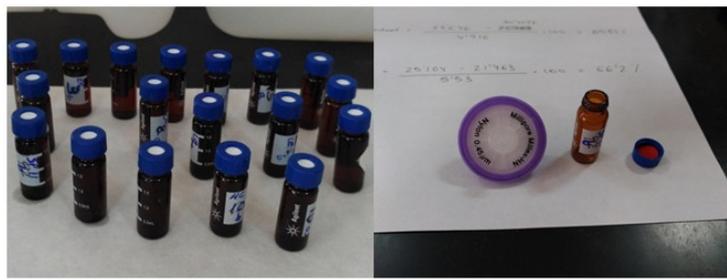


Figura 3. 16. Preparación de muestras para su medida en HPLC.

La detección y cuantificación que se llevó a cabo fue a fluorescencia (hidroxityrosol, tyrosol y oleuropeína); 280 nm (ácido gálico y orto-vainillina); 320 nm (ácido cafeico, ácido p-cumárico y verbascósido), 350 nm (luteolina-7-*O*-glucósido)

Después de lograr una separación completa y la resolución de los picos cromatográficos, cada tiempo de retención de los estándares polifenólicos se confirmó mediante la adición de 10  $\mu$ L de un patrón a otro patrón que contenía el conjunto de todos los analitos objeto de estudio y el registro de los cromatogramas.

Por otra parte, las áreas de los picos se utilizaron como señal analítica. La cuantificación se realizó mediante la introducción de las áreas de los picos en la ecuación de calibración de los patrones.

### ***3.2.3.6. Perfil de compuestos fenólicos en Aceituna.***

Mismo procedimiento que para la salmuera a partir del vial preparado después de la extracción.

Procedimiento de extracción:



Figura 3. 17. Extracción.

Para la extracción de los compuestos fenólicos se pesó en balanza analítica ( $\pm 0,0001\text{g}$ ), aproximadamente, 2 gramos de aceituna triturada y se le añadió 10,0 mL de metanol, que contiene una concentración NaF 2mM para inhibir la enzima polifenoloxidasas.

Posteriormente, los tubos se introdujeron en un baño de ultrasonido a 4°C durante 30 minutos. Los extractos resultantes se centrifugaron durante 10 minutos a 10000 rpm a 4°C. Por último, los sobrenadantes se filtraron con filtros de jeringa de nylon de 0,45 $\mu\text{m}$  en viales propios para HPLC.

### ***3.2.3.7. Análisis de acrilamida en Salmuera y Aceituna***

#### Extracción acrilamida en pasta de aceituna y salmuera

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

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

- A continuación, se trasvasa a un Falcon de 15 ml y se centrifuga a 4°C 30 minutos a 3500 rpm.
- Con ayuda de una pipeta Pasteur de plástico se retira la capa superior y se desecha. Con pipeta Pasteur de cristal se toma una alícuota de la fase acuosa de aproximadamente 5 ml y se filtra mediante un filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$ .
- Se acondiciona un cartucho Telos con 4 ml de MeOH seguido de 4 ml de agua Milli-Q. Se pasan 3 ml de la muestra y se eluye con 3 ml de agua Mili-Q directamente en el cartucho Scharlab, el cual ha sido previamente acondicionado de igual modo que el Telos (4 ml de MeOH seguido de 4 ml de agua Mili-Q). Se recoge directamente la muestra en un vial, se toma exactamente 1 mL y se analiza mediante LC-MS-QQQ.
- Tras el análisis se adiciona al vial 20  $\mu\text{l}$  de 250  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de acrilamida y se analiza de nuevo. Esto se repite dos veces.

Nótese que este método de extracción diluye el contenido de acrilamida 5 veces.

Teniendo en cuenta esto, los límites de detección y cuantificación se sitúan en:

$$\text{LOD}=1,38 \mu\text{g/kg}$$

$$\text{LOQ}=4,60 \mu\text{g/kg}$$

### Análisis HPLC / MS-MS

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

El sistema se hizo funcionar isocráticamente con un flujo de 0,25 ml / min de disolvente A al 95% (0,1% ácido fórmico en agua Milli-Q) y 5% de disolvente B (0,1% ácido fórmico en metanol).

La acrilamida se ionizó utilizando la fuente de iones Agilent Jet Stream registrada en modo de iones positivos. Los parámetros de la fuente de iones se fijaron de la siguiente manera: temperatura del gas: 340 ° C, flujo de gas: 12 l.h<sup>-1</sup>, nebulizador: 40 psi, temperatura del gas de envoltura: 400 ° C, flujo de gas de envoltura: 12 l.h<sup>-1</sup>, Voltaje del capilar: +2,5 kV, voltaje de la boquilla: 300 V y delta EMV: 300.

El manejo de la adquisición de datos y el control del instrumento fueron realizados por la versión del software MassHunter B.07.00 (Agilent). Se utilizó el modo de Monitoreo de Reacción Múltiple (MRM) para recolectar datos espectrales de masa de transiciones de iones precursor y producto, la transición MRM principal para cuantificación (72,1 → 55,1) y una transición adicional para cualificación (72,1 → 44,2). El voltaje del fragmento era 50 V y la energía de la colisión era 9 y 20 V respectivamente.

#### **3.2.3.8. Análisis de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF)**

La concentración de 5-HMF del líquido de gobierno se realizó siguiendo el método descrito por (De Vleeschouwer, Van Der Plancken, Van Loey, & Hendrickx, 2010). Dado que solo existen límites legales para mieles, tomaremos estos como referencia (15-40 mg/kg).

Este ensayo, tiene como objeto determinar el contenido en 5-HMF del líquido de gobierno de las aceitunas de mesa, directamente sin diluir, filtrado con filtros de jeringa de 0,45  $\mu\text{m}$ . Esto se realizó mediante HPLC acoplado a un detector Diodo Array (UV-DAD).

- El equipo utilizado fue un cromatógrafo de líquido 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipado con una bomba cuaternaria, un desgasificador, un muestreador termostatzado y un detector DAD (Diode Array). La columna empleada fue una Gemini-NX-C18 (150mm x 4,6 mm i.d x mm; 3  $\mu$ m tamaño partícula) de Phenomenex (Torrance, USA) a 25°C. La fase móvil fue una solución de metanol (calidad HPLC) en agua al 7,5 % y la velocidad de flujo de 0,7 mLmin<sup>-1</sup>(modo isocrático). La cantidad de muestra inyectada fueron 10  $\mu$ L. El 5-HMF se identificó a 280 nm y se cuantificó utilizando la curva de calibración externa basada en el área del pico, a 8,8 min, con un patrón de 5-HMF (sigma-aldrich) de pureza  $\geq$  95% GC. Para la preparación de los patrones se partió una disolución madre de 100 mg/L.
- Disolvemos 10 mg de patrón 5-HMF y lo llevamos a 100 mL con disolución metanol en agua 7,5% v/v (100 mg/L)
- A partir de esta disolución madre de 100 mg/L, preparamos los patrones de concentraciones de 0,5 a 10 mgL<sup>-1</sup>, obteniéndose la siguiente recta:

$$\text{Área} = 97,80 \times \text{mg/L} - 2,71$$

$$\text{Correlación: } 0,99983$$

Ecuación 3. 4. Recta para el Análisis de 5-HMF.

Esta tarea se realizó por la empresa Comaro mediante la subcontratación de la UEX. El análisis del hidroximetilfurfural se realizó de Diciembre de 2016 a Febrero 2017.

### **3.3. Estudio del efecto del horneado de la aceituna oxidada en la producción de acrilamida**

#### **3.3.1. Diseño experimental**

##### ***3.3.1.1. Selección de la muestra experimental***

La muestra seleccionada para llevar a cabo el experimento del horneado se basó en el resultado de los análisis realizados en laboratorio, siendo la de menor cantidad de Acrilamida la seleccionada para nuestro experimento.

### 3.3.1.2. Diseño experimental del horneado

Para la optimización mediante la metodología de superficie de respuesta se precisa de un diseño de experimentos. Este diseño experimental, así como la optimización se realizaron con el paquete de software denominado Design-Expert® v.10 (Stat-Ease, Inc. Minneapolis, USA). Una vez seleccionadas las variables que afectan en el proceso de forma significativa, se procedió a la optimización.

Para ello, se utilizó un DCC que consiste en la combinación de un diseño Factorial Completo con 6 muestras adicionales en forma de estrella, que nos permiten añadir los niveles necesarios para desarrollar un modelo cuadrático. El tiempo y la temperatura de horneado fueron elegidas como variables independientes. El tiempo empleado en el horneado fue optimizado entre 8 y 22 minutos, mientras que la temperatura se estableció entre 165 y 250°C. Las variables dependientes o respuestas son el contenido en acrilamida y el contenido individual de cada uno de los compuestos fenólicos estudiados.

Para el proceso de optimización, se realizaron los experimentos proporcionados por el programa, mostrados en la tabla 3.6.

Tabla 3. 6. Experimentos realizados para la consecución de la optimización del proceso de horneado de aceitunas.

	<b>Factor 1</b>	<b>Factor 2</b>
<b>Run</b>	<b>A: Tiempo</b>	<b>B: Temperatura</b>
<b>1</b>	8	207
<b>2</b>	22	208
<b>3</b>	22	208
<b>4</b>	10	232
<b>5</b>	8	207
<b>6</b>	10	178
<b>7</b>	15	208
<b>8</b>	10	178
<b>9</b>	15	165
<b>10</b>	15	250
<b>11</b>	20	232
<b>12</b>	20	178
<b>13</b>	15	208
<b>14</b>	15	165
<b>15</b>	20	178
<b>16</b>	20	232
<b>17</b>	15	250
<b>18</b>	10	232
<b>19</b>	15	208

### ***3.3.1.3. Estudio de horneado sobre aceitunas comerciales***

Se realizaron los ensayos descritos anteriormente, en total 19 ensayos a los distintos tiempos facilitados por el diseño.

Para el horneado usamos una mufla Nabertherm modelo L9/c19 colocando nuestra muestra previamente pesada y loncheada. Para cada horneado se usaron 50 gramos de aceituna. Una vez horneado y antes de triturar se pesaron nuevamente las muestras para calcular el agua perdida en el proceso.

### **3.3.2. Control de los parámetros analíticos**

#### ***3.3.2.1. Determinación de la humedad***

Se pesaron 4 cápsulas en vacío, posteriormente se pesaron 5 gramos de masa de aceituna fresca en cada capsula, las 4 capsulas se colocaron en estufa a 100 grados durante 24 horas. Posteriormente se sacaron, se dejaron enfriar un poco y se pesaron nuevamente.

#### ***3.3.2.2. Determinación del contenido en acrilamida de la aceituna horneada***

Las muestras se analizaron utilizando un cromatógrafo de líquidos Agilent 1290 Infinity II (Agilent Technologies), acoplado con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 6460 (Agilent Technologies). El volumen de inyección fue de 3  $\mu$ L y la elución se realizó usando una columna de HPLC de fase inversa Zorbax XDB-C18 (3,5  $\mu$ m, 150 mm x 2,1 mm) a 30 ° C.

#### ***3.3.2.3 Medición del perfil de compuestos fenólicos de la aceituna horneada***

La determinación y cuantificación de los compuestos fenólicos se llevó a cabo en un sistema HPLC 1100 Series (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipado con una bomba cuaternaria, un desgasificador, un muestreador automático, una columna con compartimento termostatzado provisto de detectores de diode array (DAD) y fluorescencia (FLD). La columna analítica utilizada fue una Gemini-NX C18 110 amstrong (150 mm longitud x 4,6 mm diámetro interno 3  $\mu$ m tamaño partícula) de Phenomenex (Torrance, USA). La temperatura de trabajo de la columna fue de 40 °C con un flujo constante de 1mL/min y un

volumen de inyección de 10  $\mu$ L. Las fases móviles fueron agua (Fase A) y acetonitrilo (fase B), conteniendo cada una de ellas 0.1 % v/v ácido fórmico. El gradiente utilizado fue de 97:3 durante 1 minuto, 65:35 t=30 min, 50:50 t=33 min y 100 %B desde t=34 min hasta el final del cromatograma.

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

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

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

Para el diseño del horneado y su evaluación se utilizó en programa Design-Expert® v.10 (Stat-Ease, Inc. Minneapolis, USA).

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **4.1. Análisis fisicoquímico en las aceitunas negras oxidadas**

En la tabla 4.1 se muestran los parámetros fisicoquímicos realizados en las aceitunas negras oxidadas muestreadas en las distintas empresas de estudio.

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

Se determinó la acidez de las aceitunas muestreadas encontrándose diferencias significativas en los valores de las mismas entre las distintas empresas elaboradoras de aceitunas negras oxidadas (tabla 4.1). Los datos de acidez dieron lugar a dos subconjuntos. Las aceitunas mostraron un rango de acidez que osciló de 0,1 a 0,25.

La mayoría de las aceitunas presentaron acidez muy baja excepto la muestra 4 y 5 que presentaron valores de 0,25. En el proceso de elaboración de las aceitunas negras no se produce fermentación previa al oscurecimiento, por tanto, estos datos son normales y bajos. En estudios llevados a cabo por Piga *et al.* (2005) se obtuvieron valores un poco más altos que los nuestros, de 0,22- 0,37 en aceitunas negras de mesa

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

Se determinó el pH de las aceitunas muestreadas encontrándose diferencias significativas en los valores de pH entre las distintas empresas elaboradoras de aceitunas negras oxidadas. Las aceitunas mostraron un rango de pH que osciló de 5,75 representado por la muestra número 14 a 7,71 representado por la muestra número 7. En estudios de otros autores (Tang, et al., 2016) se han encontrado valores similares a los que se muestran en la tabla; estos autores obtuvieron valores de pH medios finales de 6,5.

Tabla 4. 1. Análisis fisicoquímico en las aceitunas negras oxidadas.

MUESTRA	pH	ACIDEZ	CLORUROS %NaCl	AZUCARES REDUCTORES	GRADOS BRIX	POLIFENOLES TOTALES g/L salmuera
1	6,47 ± 0,042 c,d	0,1 ± 0 a	2,65 ± 0,495 b,c	ND	3,8 ± 0 d	0,564 ± 0,011 e,f
2	6,835 ± 0,021 g	0,15 ± 0,071 a,b	2,45 ± 0,071 a,b,c	ND	3,7 ± 0 d	0,582 ± 0,009 f
3	6,565 ± 0,007 e	0,2 ± 0 a,b	2,85 ± 0,212 c	ND	4,433 ± 0,321 e	0,44 ± 0,033 d
4	6,59 ± 0,028 e	0,25 ± 0,071 b	2,25 ± 0,071 a,b,c	ND	3,8 ± 0 d	1,117 ± 0,129 j
5	5,975 ± 0,007 b	0,25 ± 0,071 b	2,85 ± 0,071 c	ND	4,6 ± 0 e,f	0,572 ± 0,112 f
6	6,715 ± 0,007 f	0,1 ± 0 a	2,25 ± 0,071 a,b,c	ND	3,767 ± 0,058 d	0,314 ± 0,022 a,b
7	7,71 ± 0,014 h	0,2 ± 0 a,b	1,95 ± 0,071 a,b	ND	3,3 ± 0 b	0,56 ± 0,011 e,f
8	6,57 ± 0 e	0,2 ± 0 a,b	1,7 ± 0,141 a	ND	3,033 ± 0,058 a	0,342 ± 0,033 b,c
9	6,85 ± 0,042 g	0,1 ± 0 a	2,65 ± 0,071 b,c	ND	4,4 ± 0 e	0,24 ± 0,04 a
10	6,725 ± 0,007 f	0,1 ± 0 a	2,05 ± 0,071 a,b	ND	3,3 ± 0 b	0,418 ± 0,014 c,d
11	6,505 ± 0,007 d,e	0,1 ± 0 a	2,85 ± 0,071 c	ND	4,733 ± 0,058 f	0,393 ± 0,006 b,c,d
12	5,925 ± 0,021 a,b	0,1 ± 0 a	2,2 ± 0,424 a,b,c	ND	3,4 ± 0 b,c	0,683 ± 0,016 g
13	6,91 ± 0,028 g	0,1 ± 0 a	2 ± 0 a,b	ND	3 ± 0 a	0,472 ± 0,004 d,e
14	5,755 ± 0,007 a	0,1 ± 0 a	2,15 ± 0,071 a,b,c	ND	3,6 ± 0 c,d	0,871 ± 0,016 h
15	6,395 ± 0,021 c	0,1 ± 0 a	2,1 ± 0 a,b,c	ND	3,8 ± 0 d	1,003 ± 0,011 i

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las aceitunas procedentes de distintas marcas. Se representa la media ± DE de experimentos independientes realizados por duplicado. ND: No detectado.

### 4.1.3. Control de cloruros

Se determinaron los cloruros de las aceitunas muestreadas encontrándose diferencias significativas en los valores de las mismas entre las distintas empresas elaboradoras de aceitunas negras oxidadas. Las aceitunas mostraron un rango de cloruros que osciló de 1,7 % de NaCl la marca número 8 a 2,85 % de diversas marcas. Las aceitunas negras oxidadas fueron esterilizadas, no existe legislación que las obligue a tener un pH específico, un % de NaCl o una acidez. Estos valores son estipulados por la empresa según sus propios criterios. El pH se intenta mantener neutro para conservar el color negro intenso. El % NaCl se conserva en esos valores para que el producto sea aceptado por el consumidor.

Indicar que en el proceso de elaboración de las aceitunas negras no se produce fermentación previa al oscurecimiento; por tanto, se considera que estos datos se encuadran en lo normal.

Según (Estrada Cabezas, 2011) las aceitunas elaboradas por el sistema tradicional, una vez envasadas, se deben conservar ajustando los niveles de acidez y de sal entre 0,5-0,7 % y 5-7 %, respectivamente. Este mismo autor indica que en las aceitunas pasteurizadas, sea cual fuere su tipo y preparación, podrá reducirse el contenido en cloruro sódico de la salmuera al 2 %, debiendo tener como límite máximo de pH el de 4,3. Además, para las aceitunas esterilizadas, como en las del presente estudio, no se limita ni el contenido mínimo de cloruro sódico de la salmuera, ni el máximo de pH de ésta. Al ser este un producto esterilizado, la limitación de sal y de pH no es absolutamente necesaria para asegurar la asepsia del mismo.

La preparación para la venta de aceituna consiste en cambiar el líquido de gobierno por una salmuera entre 4 y 6 % de concentración salina y pH 4,0. Para esto último, es recomendable la utilización de ácido láctico.

Sin embargo, según (Preedy & Watson, 2010) el producto enlatado final tiene propiedades sensoriales muy diferentes de las frutas fermentadas obtenidas por otros procesos. Los valores de pH están entre 5.8 y 7.9, (semejantes a los obtenidos en este estudio) y el contenido de NaCl está entre 1% y 3% (también concordantes a nuestros resultados). Debido a estas características químicas, que no garantizan la seguridad, las aceitunas oscurecidas por oxidación deben esterilizarse para evitar cualquier posibilidad de crecimiento de patógenos transmitidos por los alimentos

#### **4.1.4. Control de los polifenoles totales en la salmuera.**

La determinación del contenido de fenoles se realizó mediante el índice de Folin-Ciocalteu (Singleton & Rossi, 1965). Se determinaron los polifenoles totales de las aceitunas muestreadas encontrándose diferencias significativas en los valores de las mismas entre las distintas empresas elaboradoras de aceitunas negras oxidadas. Las que mayores valores presentan son la 4: 1,12 g/L y la 15 1 g/L y la que menos valor presenta es la 9 con 0,24 g/L Como indica (Malheiro, Guedes de Pinho, Casal, & Bento, 2011) y (Tura, y otros, 2007) el contenido fenólico depende de la variedad y de los tratamientos realizados durante el procesado de las aceitunas; desconocemos el origen y la variedad de nuestras muestras por lo que no podemos deducir si la diferencia en fenoles se debe a esto o a otra causa.

#### **4.1.5. Control de azúcares reductores de la salmuera**

Se determinaron los azúcares reductores de las 15 marcas de aceitunas muestreadas por el método de Luff-Schoorl. En ninguna de las muestras analizadas se detectó la presencia de azúcares reductores, probablemente debido al tratamiento previo realizado para la oxidación de las aceitunas.

Estos datos concuerdan con el estudio de (Tuna & Akpınar-Bayizit, 2009) en el que indica que los tratamientos con lejías y los sucesivos lavados retiran la mayor parte de los componentes solubles como azúcares reductores y ácidos orgánicos de la aceituna.

#### **4.1.6. Control de grados Brix de la salmuera**

Los grados Brix permiten determinar el cociente total de materia seca disuelta en un líquido, o sólidos solubles totales (habitualmente se relaciona con concentración de azúcares, de ácidos o de sales). De las muestras analizadas la de mayor concentración de soluto disuelto es la marca número 11 con el valor 4,73 °Brix (4,73 gramos de sólidos solubles por cada 100 gramos de disolución total); la marca con menor valor es la número 13 con 3°Brix. Como era de esperar, se puede observar una correlación entre las marcas con mayores °Brix y mayor concentración de Cloruros.

#### 4.1.7. Control del color

Según los resultados obtenidos y mostrados en la tabla 4.2, las aceitunas comerciales presentaron diferencias significativas para el parámetro “a\*” (“+a\*” rojo; “-a\*” verde). Todas las aceitunas tuvieron valores positivos respecto al parámetro “a\*”, presentando tonalidades tendentes al rojo. Las aceitunas de las muestras número 1 (0,28) y número 8 (2,77) y 9 (2,69), presentaron los menores y mayores valores respectivamente.

Según (Ramírez, 2015) determinaron el color en las aceitunas de mesa al estilo español obteniendo valores de “a\*” de 3,78 (más tendente al rojo), en comparación con las nuestras presentan un valor poco superior para ser las nuestras negras.

En el parámetro “b\*” (“+b\*” amarilla; “-b\*” azul), las aceitunas de la muestra 1 (2,50) y la 8 y la 9 (10,74) y (12,67) presentaron los menores y mayores valores respectivamente, no obstante, presentan como es supuesto tonalidades menos amarillas como sería en el caso de aceitunas verdes según Rodríguez-Gómez *et al.*, (2013) con valores de “b\*” de 34,1.

(Ramírez, 2015) en el parámetro “b\*” obtuvo valores de 36,68 (más amarillo), bastante superior a los nuestros, esto se debe a que sus aceitunas eran verdes y las nuestras son negras.

En el parámetro “L\*” (claridad siendo 0: negro y 100: blanco). Nuestras muestras presentan luminosidades bajas en torno a los 20, siendo la muestra 8 (12,59) la de menor valor y la muestra 2 (21,84) la de mayor luminosidad.

Ramírez *et al.*, (2015), también determinó la Luminosidad siendo las aceitunas en comparación con las de nuestro estudio más luminosas con “L\*” cercanos a 55.

Por tanto, existe una relación entre los parámetros “a\*” y “L\*” siendo las aceitunas con tonalidades “más rojas”: marcas 8 y 9 con a\* más positivo las que menor luminosidad presentan, con valores de 12,59 y 13,43 respectivamente.

(García M. M., 2010) obtuvo valores para todos los parámetros de color diferentes a los de nuestro estudio (tabla 4.2),

Los valores del parámetro “a\*” fueron superiores (entre 3,4 y 4,2), para el parámetro “b\*” los valores fueron muy superiores en comparación con los del presente estudio y para la “L\*” ocurre lo mismo siendo los valores superiores con 51 y 54 unidades.

Piga *et al.* (2005) obtuvieron valores similares a nuestro estudio con luminosidades en torno a los 20.

En la tabla 4.2 también se muestra la media de los valores para cada parámetro medido en las distintas marcas comerciales,

En cuanto al parámetro “H\*”, hue, no se obtuvieron diferencias significativas entre las diferentes marcas comerciales.

Por último, para el parámetro “C\*”, croma, si hubo diferencias significativas entre las distintas marcas comerciales, la marca 1 tuvo el menor valor 2,52 y la que obtuvo el mayor valor fue la marca 9 con un valor de 12,67.

No obstante, se observa una relación entre los diferentes parámetros del espacio CIELAB, siendo siempre la marca 1 la de valor más bajo en a\*, b\* y C\* y las de mayor valor las marcas 8, 9, 10 y 11. Siendo por tanto inverso al parámetro L\*

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

Tabla 4. 2. Control final del color.

Muestra	L*(D65)	a*(D65)	b*(D65)	C*(D65)	h(D65)
1	19,076 ± 1,969 f,g	0,278 ± 0,106 a	2,502 ± 0,393 a	2,519 ± 0,397 a	83,782 ± 2,014 j
2	21,845 ± 2,737 i	0,888 ± 0,213 b	3,63 ± 0,796 b	3,737 ± 0,82 b	76,246 ± 1,334 e,f
3	17,694 ± 1,849 c,d,e	1,242 ± 0,304 d	4,978 ± 0,777 c,d	5,133 ± 0,818 c,d	76,103 ± 1,916 e,f
4	20,878 ± 2,393 h,i	1,257 ± 0,271 d	4,561 ± 0,85 c	4,732 ± 0,886 c	74,632 ± 1,305 c
5	20,009 ± 1,897 g,h	1,105 ± 0,245 c,d	4,628 ± 0,679 c	4,759 ± 0,711 c	76,668 ± 1,458 f
6	18,47 ± 1,913 e,f	1,163 ± 0,201 d	4,917 ± 0,644 c,d	5,054 ± 0,667 c,d	76,731 ± 1,157 f
7	16,462 ± 2,93 c	1,897 ± 0,524 f	7,275 ± 2,526 e	7,523 ± 2,57 e	74,896 ± 2,111 c,d
8	12,592 ± 3,723 a	2,769 ± 0,849 i	10,739 ± 2,427 f	11,102 ± 2,517 f	75,587 ± 2,623 d,e
9	13,426 ± 3,88 a	2,687 ± 0,867 i	12,674 ± 2,849 h	12,971 ± 2,912 h	78,029 ± 2,741 g
10	17,181 ± 3,227 c,d	2,155 ± 0,702 g	11,582 ± 3,322 g	11,785 ± 3,379 f,g	79,456 ± 1,682 h
11	15,103 ± 3,898 b	2,436 ± 0,726 h	11,898 ± 3,219 g,h	12,151 ± 3,278 g	78,329 ± 1,794 g
12	19,149 ± 3,126 f,g	1,147 ± 0,418 d	5,269 ± 1,508 c,d	5,396 ± 1,552 c,d	77,929 ± 2,437 g
13	18,279 ± 3,401 d,e,f	1,53 ± 0,445 e	5,231 ± 1,568 c,d	5,454 ± 1,616 c,d	73,52 ± 2,267 b
14	19,954 ± 2,607 g,h	0,903 ± 0,297 b,c	5,414 ± 1,113 d	5,494 ± 1,128 c,d	80,522 ± 2,504 i
15	19,013 ± 2,842 f,g	1,799 ± 0,46 f	5,487 ± 1,417 d	5,778 ± 1,478 d	71,763 ± 2,068 a
<b>Significancia</b>	Significativo 0,000	Significativo 0,000	Significativo 0,000	Significativo 0,000	Significativo 0,000

Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las aceitunas procedentes de distintas marcas. Se representa la media ± DE de experimentos independientes realizados por duplicado.

#### **4.1.8. Control de la textura**

Se realizaron dos estudios diferentes de textura, uno de penetración o punción, y otro de compresión, que nos permitieron analizar la textura de las aceitunas comerciales estudiadas.

##### Ensayo de punción

Para el parámetro “Fuerza máxima” (indicativo de la resistencia que presenta la piel a la penetración de la sonda) hubo diferencias significativas entre las distintas marcas comerciales. El mayor valor de la fuerza máxima correspondió a la marca 15 (0,36 kg), y el menor valor correspondió a la marca 6 con 0,079 kg (tabla 4.3).

En el parámetro “Distancia” (indicativo de la elasticidad de la piel de la aceituna) según la tabla se dieron diferencias entre las distintas marcas comerciales con valores entre 1,865 y 3,992 mm, siendo la marca 1 la que obtuvo el mayor valor de distancia y la marca 15 la que obtuvo el menor valor de distancia, por lo que las aceitunas de esta marca fueron las que presentaron una piel con menor elasticidad.

Por último, para la “Pendiente” (relacionada con la consistencia de la pulpa) se obtuvieron diferencias significativas estando los valores en el rango de 0,01 a 0,104 kg/mm, entre la marca 6 con el menor valor y la marca 15 con el mayor valor, por tanto, las aceitunas de la marca 6 fueron las que presentaron un mayor ablandamiento.

La fuerza de la piel y la pulpa disminuye al aumentar el tiempo de madurez (Sexton, 1997) (Heredia A. F.-B., 1990) (Heredia A. G.-B., 1993) mide la fuerza de corte máxima con un método de compresión de corte y encontró que disminuyó durante la maduración de aceitunas.

Tabla 4. 3. Control de la Textura por ensayo de punción.

MUESTRA	Fuerza 1 kg	Distancia 1 mm	Pendiente F-T 1:2 kg/mm	Area F-T 1:2	Media F 1:2
1	0,173 ± 0,079 b,c,d	3,992 ± 0,011 b	0,022 ± 0,01 a,b	0,672 ± 0,314 b,c,d,e	0,084 ± 0,039 b,c,d,e
2	0,222 ± 0,081 d,e	3,847 ± 0,234 b	0,029 ± 0,012 a,b,c	0,918 ± 0,327 d,e,f	0,121 ± 0,045 e,f,g
3	0,132 ± 0,082 a,b,c	3,583 ± 1 b	0,026 ± 0,037 a,b,c	0,504 ± 0,337 a,b	0,064 ± 0,042 a,b,c
4	0,258 ± 0,079 e,f	3,932 ± 0,198 b	0,033 ± 0,01 b,c	1,171 ± 0,417 f	0,148 ± 0,051 f,g,h
5	0,085 ± 0,04 a	3,776 ± 0,897 b	0,017 ± 0,024 a,b	0,337 ± 0,178 a	0,042 ± 0,022 a,b
6	0,079 ± 0,025 a	3,979 ± 0,024 b	0,01 ± 0,003 a	0,301 ± 0,104 a	0,038 ± 0,013 a
7	0,202 ± 0,048 c,d,e	3,919 ± 0,198 b	0,026 ± 0,006 a,b,c	0,86 ± 0,213 c,d,e,f	0,11 ± 0,026 d,e,f
8	0,182 ± 0,05 b,c,d,e	3,987 ± 0,023 b	0,023 ± 0,006 a,b	0,703 ± 0,197 b,c,d,e	0,088 ± 0,025 c,d,e
9	0,15 ± 0,117 a,b,c,d	3,864 ± 0,466 b	0,02 ± 0,014 a,b	0,55 ± 0,464 a,b,c	0,069 ± 0,058 a,b,c,d
10	0,226 ± 0,073 d,e	3,933 ± 0,208 b	0,029 ± 0,01 a,b,c	0,951 ± 0,341 e,f	0,121 ± 0,044 e,f,g
11	0,107 ± 0,045 a,b	3,987 ± 0,016 b	0,013 ± 0,006 a,b	0,426 ± 0,191 a,b	0,053 ± 0,024 a,b,c
12	0,328 ± 0,109 f,g	2,045 ± 0,647 a	0,09 ± 0,04 d	0,552 ± 0,213 a,b,c	0,148 ± 0,061 f,g,h
13	0,356 ± 0,084 g	3,908 ± 0,195 b	0,045 ± 0,011 c	1,516 ± 0,401 g	0,193 ± 0,049 i
14	0,308 ± 0,069 f,g	1,941 ± 0,77 a	0,088 ± 0,033 d	0,612 ± 0,273 a,b,c,d	0,158 ± 0,043 g,h,i
15	0,361 ± 0,074 g	1,865 ± 0,826 a	0,104 ± 0,024 d	0,699 ± 0,469 b,c,d,e	0,179 ± 0,04 h,i

Resultados de ensayos de textura en aceitunas según marca comercial. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las aceitunas procedentes de distintas marcas. Se representa la media ± DE de experimentos independientes realizados por duplicado.

## Ensayo de compresión

Para el parámetro “Fuerza máxima” (indicativo de la resistencia que presenta la piel a la penetración de la sonda) hubo diferencias significativas entre las distintas marcas comerciales, pudo verse que el mayor valor de la fuerza máxima correspondió a la marca 15 (2,347), y el menor valor correspondió a la marca 6 con 0,087 kg.

En el parámetro “Distancia” (indicativo de la elasticidad de la piel de la aceituna) según la tabla se dieron diferencias entre los distintos fermentadores con valores entre 2,484 y 2,953 mm, siendo la marca 2 la que obtuvo el mayor valor de distancia y la marca 6 la que obtuvo el menor valor de distancia, por lo que las aceitunas de esta marca fueron las que presentaron una piel con menor elasticidad.

Por último, para la “Pendiente” (relacionada con la consistencia de la pulpa) se obtuvieron diferencias significativas estando los valores en el rango de 0,034 a 0,903 kg/mm, entre la marca 6 con el menor valor y la marca 15 con el mayor valor, por tanto, las aceitunas de la marca 6 fueron las que presentaron un mayor ablandamiento.

Tabla 4. 4. Control de la Textura por ensayo de compresión (TAP).

MUESTRA	Fuerza 1 kg	Distancia 1 mm	Pendiente F-T 1:2 kg/mm	Area F-T 1:2	Media F 1:2
1	0,183 ± 0,059 a	2,656 ± 0,07 b,c,d	0,068 ± 0,021 a	0,223 ± 0,076 a	0,084 ± 0,027 a
2	0,323 ± 0,094 a	2,953 ± 0,182 f	0,108 ± 0,03 a	0,46 ± 0,153 a	0,155 ± 0,048 a
3	0,204 ± 0,114 a	2,811 ± 0,144 e	0,071 ± 0,04 a	0,26 ± 0,15 a	0,092 ± 0,053 a
4	0,361 ± 0,1 a	2,661 ± 0,066 b,c,d	0,134 ± 0,036 a	0,466 ± 0,14 a	0,175 ± 0,05 a
5	0,109 ± 0,042 a	2,75 ± 0,089 d,e	0,039 ± 0,015 a	0,135 ± 0,05 a	0,049 ± 0,018 a
6	0,087 ± 0,024 a	2,484 ± 0,082 a	0,034 ± 0,01 a	0,101 ± 0,028 a	0,04 ± 0,01 a
7	0,243 ± 0,069 a	2,638 ± 0,061 b,c	0,091 ± 0,025 a	0,299 ± 0,092 a	0,113 ± 0,034 a
8	0,178 ± 0,054 a	2,649 ± 0,102 b,c,d	0,066 ± 0,02 a	0,219 ± 0,069 a	0,083 ± 0,025 a
9	0,124 ± 0,056 a	2,679 ± 0,104 b,c,d	0,045 ± 0,02 a	0,157 ± 0,072 a	0,058 ± 0,026 a
10	0,281 ± 0,087 a	2,799 ± 0,063 e	0,099 ± 0,031 a	0,354 ± 0,112 a	0,127 ± 0,04 a
11	0,133 ± 0,067 a	2,684 ± 0,106 b,c,d	0,046 ± 0,025 a	0,163 ± 0,093 a	0,06 ± 0,033 a
12	2,137 ± 1,206 b	2,729 ± 0,155 c,d,e	0,794 ± 0,453 b	2,151 ± 1,28 b	0,803 ± 0,479 b
13	0,358 ± 0,108 a	2,493 ± 0,086 a	0,142 ± 0,042 a	0,426 ± 0,136 a	0,17 ± 0,052 a
14	2,34 ± 0,718 b	2,642 ± 0,08 b,c,d	0,882 ± 0,269 b	2,381 ± 0,831 b	0,902 ± 0,312 b
15	2,347 ± 0,854 b	2,615 ± 0,138 b	0,903 ± 0,331 b	2,324 ± 0,926 b	0,898 ± 0,362 b

Resultados de ensayos de textura en aceitunas según marca comercial. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las aceitunas procedentes de distintas marcas. Se representa la media ± DE de experimentos independientes realizados por duplicado.

## 4.2. Recuento microbiológico de las aceitunas comerciales

Al realizar el recuento microbiológico de Bacterias aerobias mesófilas, Bacterias ácido-lácticas, *Enterobacterias* totales, *Enterobacterias* lactosa positivas (coliformes), *Bacillus*, levaduras y de *Pseudomonas* (Agar *Pseudomonas*) no se observó crecimiento en los medios utilizados a ninguna de las diluciones. Este es un resultado esperable, pues los frascos son esterilizados antes de su comercialización y deben estar libre de microorganismos y sus esporas.

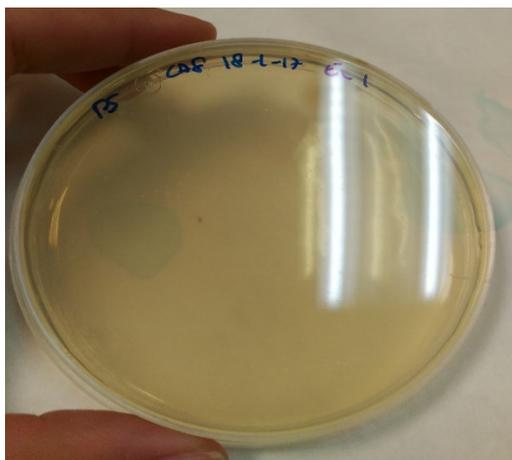


Figura 4. 1. Ejemplo de placa sembrada en Agar de *Pseudomonas* 18.01.2017 Dilución 10-1.

## 4.3. Parámetros instrumentales

### 4.3.1. Aceitunas comerciales

#### 4.3.1.1. Medición de la actividad antioxidante en Aceituna y Salmuera.

La actividad antioxidante se determinó mediante el método DPPH en la aceituna y en la salmuera. En Salmuera se observó una fuerte inhibición anti-radical representados los valores de  $EC_{50}$  en la tabla 4.5, encontrando diferencias entre marcas comerciales. Las marcas que presentaron actividad anti-radical más potente (valores de  $EC_{50}$  más bajos) fueron la número 4 ( $EC_{50} = 4,55 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), 12 ( $EC_{50} = 6,23 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Por el contrario, en la muestra 15 no se pudo cuantificar con el método DPPH teniendo una actividad anti-radical superior a la detectada por el método, mientras que las marcas con actividad más reducida fueron la marca 9 ( $EC_{50} = 39,17 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y la 11 ( $EC_{50} = 27,92 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ).

En Aceituna se observó una menor inhibición anti-radical, encontrando diferencias entre marcas comerciales. Las marcas que presentaron actividad anti-radical más potente (valores de  $EC_{50}$  más bajos) fueron la número 4 ( $EC_{50} = 34,39 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), la 14 ( $EC_{50} = 31,99 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y la 15 ( $EC_{50} = 23,33 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), mientras que las marcas con actividad más reducida fueron la marca

3 ( $EC_{50} = 193,56 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y la 13 ( $EC_{50} = 159,67\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) la marca 11 se pudo cuantificar con el método DPPH teniendo una actividad anti-radical inferior a la detectada por el método.

Tabla 4. 5. EC 50 DPPH.

Muestras	EC50 Salmuera $\mu\text{g/ml}$	EC50 Aceituna $\mu\text{g/ml}$
1	14,34	57,53
2	9,46	52,80
3	16,80	193,56
4	4,55	34,39
5	8,42	56,45
6	20,11	68,92
7	13,75	67,14
8	13,84	34,71
9	39,17	78,67
10	15,29	64,06
11	27,92	No cuantificable >
12	6,23	38,81
13	15,78	159,67
14	6,32	31,99
15	No cuantificable <	23,33

Observamos que nuestros resultados son semejantes a los obtenidos por (Boskou, y otros, 2006) con un  $EC_{50}$  del orden de dos unidades, a excepción de algunas muestras que presentan alta capacidad antioxidante. Estos resultados se encuentran correlacionados con la cantidad de compuestos fenólicos en las muestras, siendo la muestra con la mayor actividad antioxidante ( $EC$  menor) la que mayor cantidad de compuestos fenólicos presenta en el Análisis HPLC. Esto mismo ocurre con la de menor concentración de fenoles.

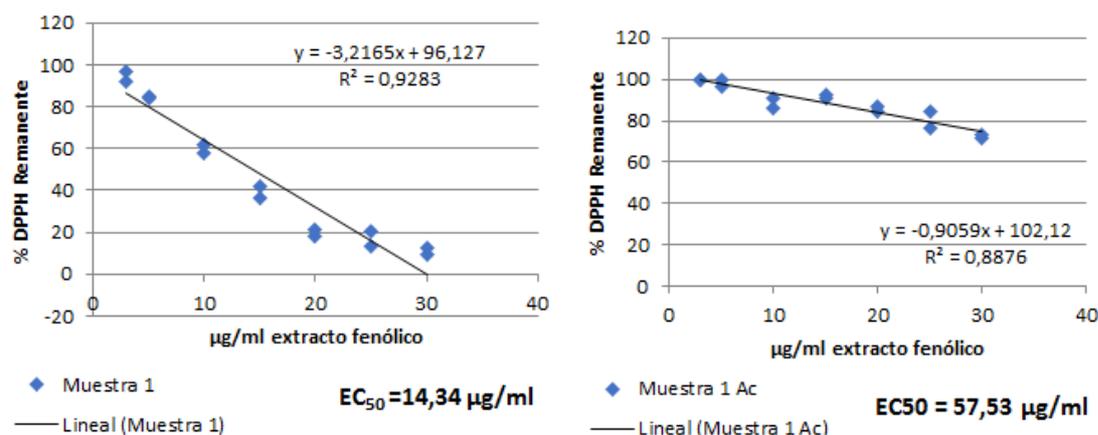


Figura 4. 2. Gráficos actividad antioxidante Aceituna y Salmuera en Muestra 1.

#### 4.3.1.2. Identificación de los compuestos fenólicos en Aceituna y Salmuera

Para la determinación del perfil de compuestos fenólicos de la aceituna se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) empleando como sistema de detección la absorción en el ultravioleta-visible (UV-Vis) y fluorescencia. Los compuestos fenólicos que se detectaron y cuantificaron fueron los siguientes: hydroxytirosol, tyrosol, oleuropeína, ácido p-coumarico, lutein-7-glucosido, verbascosido, ácido gálico y o-vainillina.

Los compuestos mayoritarios en pasta de aceituna fueron hydroxytirosol y oleuropeína y en salmuera hydroxytirosol y tyrosol.

De este modo, el contenido en compuestos fenólicos en las aceitunas frescas, tras el tratamiento con hidróxido sódico y tras los lavados se muestran en la tabla 4.6. para pasta de aceituna y 4.7 para la salmuera.

El contenido en fenoles en las marcas 9 y 11 presentaron menor concentración de fenoles en los compuestos mayoritarios,

Destacar que el hydroxytirosol fue el compuesto fenólico mayoritario identificado en las aceitunas y su proporción se encontró por encima del 80% del total de compuestos fenólicos presentes en las aceitunas. Estos resultados se corresponden con los encontrados en bibliografía ya que el hydroxytirosol es el compuesto fenólico mayoritario en las aceitunas de mesa (Parinos, Stalikas, Giannopoulo, & Pilidis, 2007). Este compuesto es el resultado de la hidrólisis ácida de la oleuropeína. Por tanto, al final de la fermentación el hydroxytirosol se constituye como el principal fenol.

Los siguientes compuestos en importancia en las aceitunas fueron el tyrosol y la oleuropeína. Destacar que el tyrosol fue ligeramente superior en la Salmuera. Sin embargo, la oleuropeína se mostró en cantidad superior en pasta de Aceituna.

Tabla 4. 6. Perfil Compuestos fenólicos Pasta de Aceituna.

MUESTRA	Hydroxytyrosol	Tyrosol	Oleuropeína	Ácido p-cumarico	Lutein-7-glucosido	Verbascosido	Ácido Galico	o-vainillina
1	12,702 ± 0,311 b,c	0,293 ± 0,045 a,b	4,95 ± 0,226 e,f	0,264 ± 0,007 a,b,c,d	0,46 ± 0,016 a,b	ND	1,575 ± 0,17 a	0,638 ± 0,032 a,b
2	34,319 ± 1,646 f	0,238 ± 0,041 a	3,944 ± 0,069 d,e	0,657 ± 0,084 f,g,h	0,768 ± 0,042 b	1,024 ± 0,077 c	1,27 ± 0,101 a,b,c	1,368 ± 0,107 a,b,c,d
3	7,59 ± 1,091 a,b	0,595 ± 0,146 a,b	2,743 ± 0,233 b,c,d	0,154 ± 0,022 a,b	0,584 ± 0,214 a,b	1,141 ± 0,363 c,d	0,811 ± 0,103 a,b,c	0,191 ± 0,028 a
4	52,956 ± 3,479 g	0,299 ± 0,07 a,b	4,955 ± 0,378 e,f	0,519 ± 0,026 e,f	0,59 ± 0,021 a,b	0,295 ± 0,023 a,b	0,54 ± 0,089 a,b	1,092 ± 0,051 a,b,c,d
5	22,156 ± 0,955 d	1,617 ± 0,269 c,d	4,81 ± 0,562 e,f	0,219 ± 0,024 a,b,c	0,458 ± 0,019 a,b	1,671 ± 0,317 d	0,238 ± 0,056 a,b	0,303 ± 0,07 a
6	7,229 ± 2,451 a,b	0,55 ± 0,162 a,b	3,288 ± 0,3 c,d	0,414 ± 0,059 d,e	0,493 ± 0,077 a,b	0,284 ± 0,158 a,b	3,692 ± 0,562 e	0,934 ± 0,151 a,b,c
7	67,044 ± 5,536 h	0,329 ± 0,031 a,b	0,756 ± 0,048 a	0,822 ± 0,067 h	0,549 ± 0,037 a,b	0,162 ± 0,087 a	ND	1,789 ± 0,185 b,c,d
8	33,525 ± 4,259 e,f	1,743 ± 0,259 c,d	8,859 ± 1,582 g	0,614 ± 0,055 f,g	0,693 ± 0,118 a,b	0,774 ± 0,241 b,c	1,583 ± 0,829 a,b,c	2,181 ± 1,525 c,d
9	6,128 ± 2,061 a,b	0,079 ± 0,023 a	3,183 ± 0,148 c,d	0,416 ± 0,072 d,e	0,595 ± 0,064 a,b	0,147 ± 0,124 a	2,229 ± 0,433 c,d	0,824 ± 0,161 a,b
10	19,492 ± 1,071 c,d	0,75 ± 0,971 a,b	2,282 ± 0,054 b,c	0,353 ± 0,016 c,d,e	0,761 ± 0,322 a,b	1,094 ± 0,282 c,d	0,362 ± 0,462 a	0,673 ± 0,072 a,b
11	2,717 ± 0,314 a	ND	3,033 ± 0,509 b,c,d	0,091 ± 0,03 a	0,432 ± 0,005 a	ND	2,246 ± 0,444 c,d	0,039 ± 0 a
12	24,796 ± 5,104 d,e	0,201 ± 0,16 a	1,547 ± 0,246 a,b	0,325 ± 0,068 b,c,d	0,612 ± 0,041 a,b	0,351 ± 0,255 a,b	3,368 ± 0,928 d,e	1,14 ± 0,285 a,b,c,d
13	9,992 ± 0,512 a,b	ND	2,533 ± 0,165 b,c,d	0,431 ± 0,032 d,e	0,514 ± 0,049 a,b	0,763 ± 0,111 b,c	1,426 ± 0,093 a,b,c	0,886 ± 0,066 a,b,c
14	32,279 ± 4,411 e,f	1,008 ± 0,217 b,c	2,067 ± 0,375 a,b,c	0,716 ± 0,106 g,h	0,524 ± 0,01 a,b	0,605 ± 0,133 a,b,c	1,901 ± 0,332 b,c	2,32 ± 0,385 d
15	54,811 ± 3,82 g	1,83 ± 0,15 d	5,57 ± 0,4 f	1,468 ± 0,096 i	0,74 ± 0,057 a,b	0,29 ± 0,056 a,b	3,87 ± 0,236 e	4,049 ± 0,313 e

Principales compuestos fenólicos encontrados en pasta de aceituna entre las distintas marcas comerciales. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las aceitunas procedentes de distintas marcas. Se representa la media ± DE de experimentos independientes realizados por duplicado.

Tabla 4. 7. Perfil Compuestos fenólicos Salmuera de Aceituna.

MUESTRA	Hydroxytyrosol	Tyrosol	Oleuropeína	Ácido p-cumarico	Lutein-7-glucosido	Verbascosido	Ácido Galico	o-vainillina
1	69,58 ± 3,23 a,b	39,126 ± 0,057 f	11,989 ± 0,053 e,f,g	1,325 ± 0,055 a	0,756 ± 0,053 ns	0,901 ± 0,141 a	16,18 ± 1,48 d,e	ND
2	235,16 ± 3,021 d	12,949 ± 0,068 a	9,857 ± 0,902 d,e,f,g	3,729 ± 0,047 c,d	0,768 ± 0,096	2,394 ± 0,104 b,c,d	16,172 ± 0,615 d,e	12,239 ± 0,351 c,d
3	76,49 ± 0,39 a,b	22,591 ± 1,151 b,c	7,583 ± 0,021 b,c,d,e	0,965 ± 0,005 a	ND	1,673 ± 0,027 a,b,c	11,864 ± 0,644 c,d	4,117 ± 0,16 a,b
4	553,5 ± 77,488 f	29,058 ± 5,906 c,d,e	14,264 ± 1,401 g	3,653 ± 0,409 c,d	ND	5,003 ± 0,666 e	10,395 ± 1,165 b,c	23,331 ± 2,917 e
5	198,54 ± 13,33 c,d	13,416 ± 2,351 a	12,395 ± 0,839 f,g	1,122 ± 0,079 a	1,026 ± 0,169	2,638 ± 0,222 d	4,972 ± 0,79 a	8,001 ± 1,26 b,c
6	44,79 ± 4,066 a,b	37,911 ± 2,733 e,f	9,722 ± 0,839 d,e,f,g	2,1 ± 0,118 a,b,c	ND	1,478 ± 0,104 a,b	29,338 ± 2,791 h	3,632 ± 0,16 a
7	380,59 ± 10,5 e	18,404 ± 0,045 a,b	1,652 ± 0,021 a	4,615 ± 0,091 d	ND	5,266 ± 0,095 e	5,316 ± 0,052 a,b	2,079 ± 0,351 a
8	191,85 ± 3,135 c,d	32,407 ± 0,344 d,e,f	22,703 ± 0,149 h	3,297 ± 0,02 b,c,d	0,819 ± 0,043	1,631 ± 0,122 a,b,c	18,717 ± 0,023 e,f	14,705 ± 0,78 d
9	30,23 ± 0,49 a	38,418 ± 0,696 f	8,266 ± 0,223 c,d,e,f	1,611 ± 0,155 a,b	ND	ND	24,245 ± 2,574 g,h	2,865 ± 0,417 a
10	115,58 ± 3,217 b,c	13,231 ± 0,005 a	6,667 ± 0,085 b,c,d	2,123 ± 0,016 a,b,c	ND	2,99 ± 0,141 d	2,462 ± 0,286 a	5,119 ± 0,351 a,b
11	18,63 ± 0,245 a	50,792 ± 0,101 g	8,874 ± 0,531 c,d,e,f	0,319 ± 0,002 a	ND	1,138 ± 0,005 a	23,785 ± 0,069 f,g	3,508 ± 0,421 a
12	181,45 ± 9,439 c,d	27,159 ± 2,301 b,c,d	3,236 ± 0,668 a,b	1,155 ± 0,185 a	ND	1,551 ± 0,073 a,b,c	36,227 ± 0,441 i	3,933 ± 0,055 a,b
13	84,7 ± 4,556 a,b	13,421 ± 2,622 a	4,91 ± 1,274 a,b,c	1,22 ± 1,662 a	ND	ND	16,931 ± 0,126 d,e	2,805 ± 0,433 a
14	214,03 ± 10,435 d	37,678 ± 0,431 e,f	4,452 ± 1,985 a,b,c	3,205 ± 0,173 b,c,d	ND	2,452 ± 0,086 c,d	23,581 ± 1,795 f,g	9,741 ± 1,888 c
15	523,845 ± 6,287 f	34,238 ± 3,853 d,e,f	12,012 ± 3,058 e,f,g	10,038 ± 0,082 e	ND	7,106 ± 0,349 f	54,947 ± 1,529 j	15,157 ± 0,913 d

Principales compuestos fenólicos encontrados en salmuera de aceituna entre las distintas marcas comerciales. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre las aceitunas procedentes de distintas marcas. Se representa la media ± DE de experimentos independientes realizados por duplicado.

#### **4.3.1.3. Contenido en acrilamida en Salmuera y Aceituna**

Para determinar el contenido en acrilamida las muestras se analizaron utilizando un cromatógrafo de líquidos Agilent 1290 Infinity II, no obstante, fue necesario optimizar el método de separación cromatográfica. La descripción de la optimización se encuentra desarrollada en el Anexo 1.

El contenido de acrilamida en aceitunas negras oxidadas comerciales y salmuera se muestran en la Figura 4.3. Como puede verse, el intervalo de concentración de acrilamida fue de 31,5 a 744,0 ng/g y de 59,2 a 1697 ng/g en aceitunas y salmuera analizadas, respectivamente. Hubo una correlación positiva ( $r = 0,925$ ;  $p < 0,05$ ) entre el contenido de acrilamida en las aceitunas y las salmueras, aunque la cantidad de acrilamida en todas las salmueras fue mayor que la obtenida en las aceitunas. Además, los resultados revelaron que la muestra 15 era la marca con mayores concentraciones de acrilamida en ambas matrices, salmuera y oliva. Sin embargo, las muestras 9 y 11 presentaron los contenidos más bajos en dicha sustancia tóxica en aceitunas y salmueras respectivamente. Se encontró una correlación lineal entre el pH y el contenido de acrilamida. De hecho, el pH osciló entre 7,71 y 5,76.  $\text{pH} < 6$  se presentó en muestras con más de 250 ng/g de acrilamida. Sin embargo, hubo algunas excepciones como muestras con  $\text{pH} = 6,75$  con 787,3 ng/g de contenido de acrilamida.

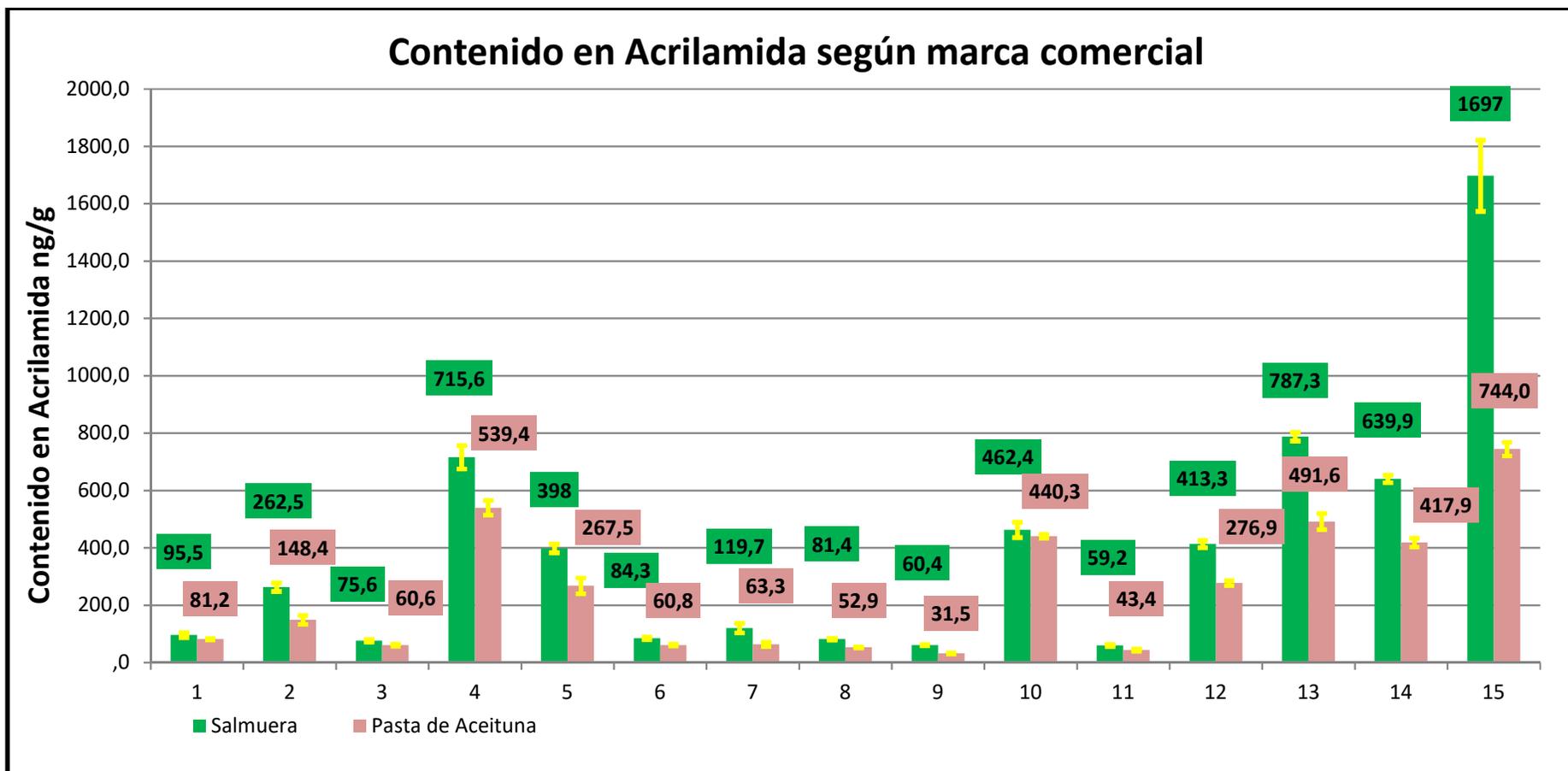


Figura 4. 3. Contenido en Acrilamida ng/g en Salmuera y pasta de Aceituna negra Oxidada.

Las aceitunas negras comerciales oxidadas estudiadas han presentado un rango muy amplio de concentración de acrilamida (Figura 4.3). El 47% y el 53% de las aceitunas y salmueras analizadas presentaron respectivamente más de 250 ng/g. Esta concentración está dentro del rango de las concentraciones de acrilamida más bajas encontradas en las aceitunas maduras comerciales en conserva de (Charoenprasert, 2014). Estos investigadores indicaron que una concentración de acrilamida de 250 ng/g no es grave para la salud humana, teniendo en cuenta el bajo consumo de conservas aceitunas negras maduras en comparación con otros alimentos como papas fritas y chips; galletas, galletas y pasteles; y pan. También encontraron que la mayor parte de la acrilamida en aceitunas negras maduras se forma durante la esterilización por calor.

Además, se ha estudiado la influencia del pH en la formación de acrilamida en un sistema modelo utilizando jugo de aceituna calentado a 121 ° C durante 30 min (Casado, 2010). Los niveles de acrilamida mostraron un valor máximo de pH entre 5,5 y 6,0, siendo el contenido significativamente menor a valores de pH superiores a 8 e inferiores a 5, siendo estos resultados opuestos a los obtenidos en nuestro estudio.

Nuestros datos nos sugieren que los procesos de esterilización aplicados por algunas empresas eran demasiado altos. Es necesario decir que la acrilamida se forma en la etapa final de preparación del producto final en procesos de esterilización. En estas muestras, seleccionadas al azar, no es posible saber cómo se realizó la esterilización y cuáles fueron las condiciones de esterilización utilizadas en las empresas donde se tomaron las muestras. La variedad utilizada en la producción es también desconocida. Es necesario indicar que no es necesario incluir la variedad en la etiqueta según las normas (BOE (Boletín Oficial del Estado) Real Decreto 679, 2016). Por lo tanto, podemos suponer que aquellas empresas que aplicaron un tratamiento térmico de esterilización mucho más agresivo en términos de tiempo y temperatura podrían haber producido reacciones químicas inducidas por los azúcares reductores o aminoácidos de oliva ya que actúan como precursores de la formación de acrilamida cuando la temperatura se incrementa durante la esterilización por calor.

Por esta razón, la F0 aplicada a estos países europeos de la norma de procesamiento térmico requerida actual sería igual o superior a 15 min según la antigua regla (BOE (Boletín Oficial del Estado) Real Decreto 1230), 2001). Sin embargo, este Real Decreto ha sido modificado recientemente por otro (BOE (Boletín Oficial del Estado) Real Decreto 679, 2016) en el que se ha suprimido el obligatorio mantenimiento de este mínimo F0 debido a que era demasiado excesivo aplicar este tiempo de tratamiento de esterilización para esterilizar las conservas de aceitunas negras maduras. Por esta razón, a partir de los resultados de este estudio, parece que

la principal razón por la que hay amplios informes sobre los niveles de acrilamida en las aceitunas de mesa enlatadas puede deberse a una gama de diferentes procesos F0 utilizados por la industria de conservas de aceitunas. F0 de 13 min ha sido aplicada por las industrias conserveras alcanzando la esterilidad comercial con un alto grado de seguridad, obteniendo una aceituna de mesa más saludable debido a la concentración de acrilamida se redujo un 50% de la inicial. Esta es una reducción muy significativa de este compuesto tóxico sólo mediante la reducción de F0 2 min. Por esta razón, la acrilamida aumentó hasta los datos más altos posibles a los valores de F0 del proceso más altos aplicados en este estudio, similar a las mayores concentraciones de acrilamida reportadas por (Charoenprasert, 2014), lo que sugiere la importancia de reducir las condiciones de procesamiento térmico optimizando el procesamiento térmico. (Charoenprasert, 2014) exploraron enfoques alternativos para reducir la acrilamida en aceitunas maduras negras mediante cambios en las etapas de elaboración tradicionales. En conjunto, las empresas deben optimizar los procesos térmicos adecuados a sus condiciones industriales específicas, ya sea contratando una Autoridad de Procesamiento Térmico externa o utilizando sus equipos internos de la Autoridad de Procesamiento Térmico. Además, la relación matemática entre el proceso F0 y la concentración de acrilamida podría ser útil para optimizar la esterilización industrial de las aceitunas de mesa. Según (Tang, et al., 2016), se encontró una ecuación polinomial de segundo orden entre F0 y la concentración de acrilamida en la esterilización de las aceitunas negras.

#### ***4.3.1.4. Contenido de 5-hidroximetilfurfural (5-HMF)***

Tras realizar los análisis del hidroximetilfurfural a las aceitunas negras oxidadas no se encontró dicho compuesto en esta matriz. Para la formación de este compuesto son necesarios varios factores (Capuano, 2011). Uno de ellos es alto contenido en azúcar, otro son condiciones de acidez y el último es someter al alimento a altas temperaturas. De este modo mediante la reacción de Maillard se formaría el hidroximetilfurfural. Hay que destacar que las aceitunas analizadas contienen cantidades inapreciables de azúcares reductores y en las condiciones de elaboración de la industria se utilizan pH próximos a la neutralidad, por tanto y a la vista de los resultados obtenidos se puede verificar que las aceitunas producidas en la industria del consorcio no contienen hidroximetilfurfural. Esto es un buen resultado ya que el hidroximetilfurfural se encuentra presente en la lista de estudios toxicológicos de la U.S. Public Health Service, National Toxicology Program (Schmidt & & Rodrick, 2003)

## **4.3.2. Efecto del horneado sobre la producción de Acrilamida**

### ***4.3.2.1 Efecto del horneado sobre la humedad***

La Humedad es la cantidad de agua, vapor de agua o cualquier otro líquido que está presente en la superficie o el interior de un cuerpo o en el aire. El proceso de Horneado a diferentes temperaturas y tiempos produce una pérdida de humedad en la Aceituna que será mayor conforme más agresivo sea el tratamiento de horneado.

### ***4.3.2.2. Formación de acrilamida durante el horneado***

Para calcular la concentración de Acrilamida real se tuvo en cuenta la pérdida de humedad, teniendo en cuenta que para cada proceso de horneado la pérdida fue diferente quedando por tanto concentraciones diferentes de Humedad.

Dado el contenido de acrilamida de las aceitunas de mesa comerciales, el análisis de la superficie de respuesta se llevó a cabo con la aceituna de tabla comercial de contenido más bajo de acrilamida para averiguar cómo el tiempo y la temperatura del horneado afectaron a la formación de acrilamida.

En primer lugar, se investigó cómo afectaban las variables escogidas a la formación de acrilamida durante el horneado. Para ello, se realizó el análisis de la superficie de respuesta obtenida y se observaron todos los valores de los parámetros de ajuste y el test ANOVA recogidos en la tabla 4.8.

Los resultados del test ANOVA indican que el modelo cuadrático se ajusta de forma significativa ( $p < 0.05$ ) y es adecuado para describir la formación de acrilamida durante el horneado. Del mismo modo, todos los factores incluidos en el diseño afectan de forma significativa al modelo ( $p < 0.05$ ). Además, una falta de ajuste no significativa ( $p > 0.05$ ) indica la bondad del modelo. Por último, los valores de los coeficientes  $R^2$  son altos y en todos los casos mayores de 0.9, y  $\text{adj } R^2$  y  $\text{pred } R^2$  están en concordancia, y la diferencia entre ellos es menos de 0.2. Por todo ello, el modelo puede usarse para la predicción del comportamiento del horneado.

Tabla 4. 8. Valores de la superficie de respuesta para la formación de acrilamida en aceituna.

<b>Coefficiente de determinación (R<sup>2</sup>)</b>	0.9985
<b>Adj R<sup>2</sup></b>	0.9977
<b>Pred R<sup>2</sup></b>	0.9962
<b>p modelo</b>	<0.0001
<b>p falta de ajuste</b>	0.4191
<b>C.V %</b>	2.08
<b>Ecuación</b>	$\begin{aligned} \text{Acrilamida (UNIDAD)} = &+3,84564 \cdot 10^5 - \\ &8326,29726 \cdot \text{Tiempo} - \\ &3179,30632 \cdot \text{Temperatura} - \\ &10,33030 \cdot \text{Tiempo} \cdot \text{Temperatura} \\ &+424,80044 \cdot \text{Tiempo}^2 \\ &+8,13402 \cdot \text{Temperatura}^2 \end{aligned}$

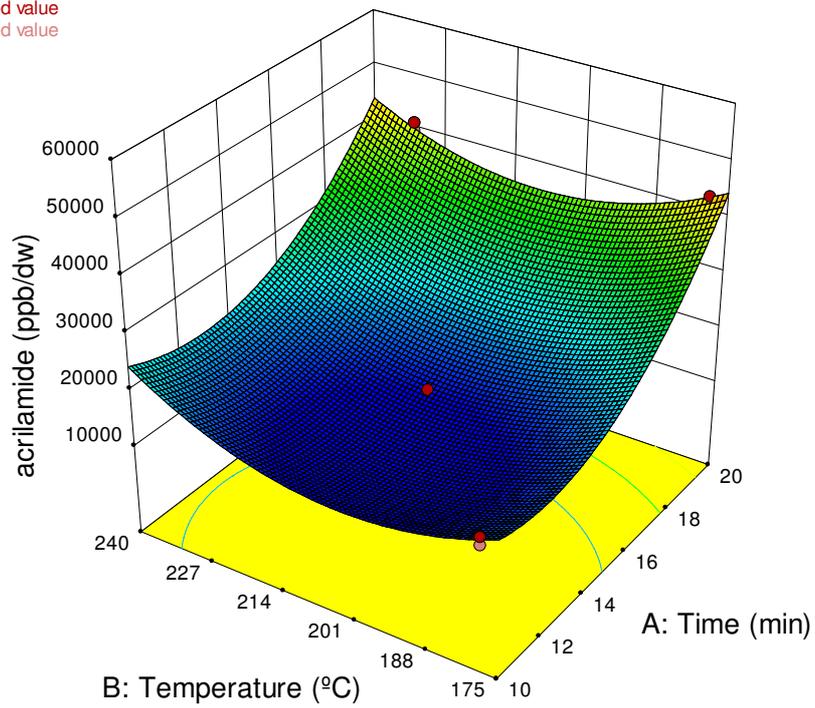
En la figura 4.4 se puede observar la superficie de respuesta que describe el comportamiento de la formación de acrilamida en función de tiempo y temperatura.

El intervalo de tiempo y temperatura utilizado osciló entre 10 y 22 min y entre 165 y 250 °C, respectivamente. Los valores máximos de concentración de acrilamida se alcanzaron cuando se aplicaron extremos de tiempo y temperatura durante el proceso de horneado.

Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 acrilamide (ppb/dw)

● Design points above predicted value  
 ● Design points below predicted value  
 50421,2  
 13211,1

X1 = A: Time  
 X2 = B: Temperature



Design-Expert® Software  
 Factor Coding: Actual  
 Untitled

● Design Points  
 50421,2  
 13211,1

X1 = A: Time  
 X2 = B: Temperature

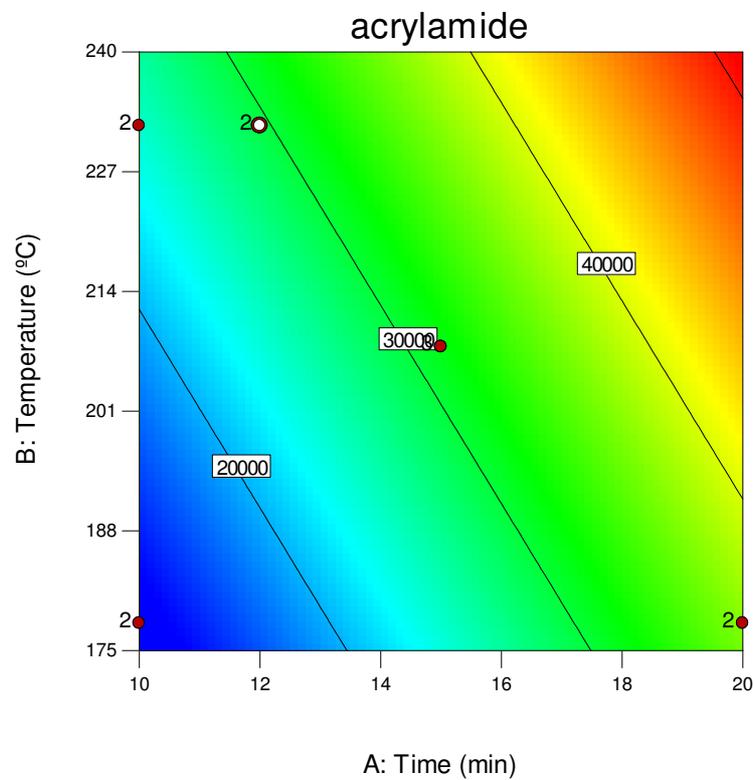


Figura 4. 4. Superficie - Respuesta para el comportamiento de la formación de acrilamida en función de dos factores, tiempo y temperatura de horneado.

Con respecto al proceso de horneado, el modelo de la superficie de respuesta realizado para la predicción del comportamiento de la formación de acrilamida en el proceso de horneado es útil porque describe el comportamiento de la formación de acrilamida en función de dos factores: el tiempo y la temperatura. De este modo, se alcanzaron los valores máximos de concentración de acrilamida cuando se aplicaron tiempos extremos y temperatura. Se ha descubierto que la formación de acrilamida en las aceitunas negras maduras se produce durante el proceso de dorado de la reacción de Maillard de azúcares reductores con aminoácidos durante la esterilización por calor a temperaturas superiores a 120 °C (Becalski, 2003). De hecho, estos investigadores indicaron que, a temperaturas de 110, 116, 121 o 125°C, el contenido de acrilamida aumentaba con el tiempo de esterilización progresivo. En nuestro estudio se utilizó oliva madura negra comercial con la menor concentración de acrilamida después del proceso de esterilización para llevar a cabo el experimento. Se pretendía comprobar si durante el horneado de alimentos con aceitunas de mesa negras oxidadas, tal como se utiliza en algún tipo de pizzas, el contenido de acrilamida permanece o aumenta con el tiempo y la temperatura de horneado. Por lo tanto, nuestros resultados revelaron que la concentración de acrilamida aumentó al mismo tiempo que la temperatura y el tiempo aumentó (Figura 4.4). La cantidad de acrilamida aumentó 4 veces más que la concentración inicial después del proceso de esterilización en el tratamiento de horneado más agresivo. Por otra parte, la concentración de acrilamida también se incrementó 2 veces más después del tratamiento menos agresivo (165 °C 10 min.) Con respecto a las aceitunas negras en conserva esterilizadas antes del horneado. Resultados similares a los nuestros fueron obtenidos por investigadores que han revelado el efecto de la temperatura en la formación de acrilamida. De esta manera, (Tang, et al., 2016) aplicaron valores de F0 de 32-34 min, el doble de lo normalmente utilizado, a las temperaturas más altas (123,9-129,4 ° C), dados los valores de concentración de acrilamida en el rango de 1750-1950 ng / g, como se encuentra en muestras de conservas de aceitunas negras maduras en EE.UU. y España. En nuestro estudio la cantidad máxima de contenido de acrilamida fue de 119ng / g, 4 veces mayor que la concentración inicial. (Corradini, 2006) indicaron una curva de forma sigmoide de la concentración de acrilamida a una temperatura entre 140 y 160 °C. Por encima de esta temperatura, las curvas tienen un pico claro debido a la eliminación de acrilamida. Estos resultados no están de acuerdo con los nuestros porque se obtuvo una concentración exponencial de acrilamida en nuestro estudio con el tiempo de calentamiento progresivo del horneado.

Dependiendo del tratamiento aplicado en el proceso de horneado, la temperatura afecta más que el tiempo en la concentración final de acrilamida. En este sentido, (Tang, et al., 2016)

presentaron que los tratamientos a 110 ° C / 175 min y 115.6 ° C / 45 min mostraron un proceso muy similar F0 (11.26-11.91), y no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de acrilamida (154.2 - 156.2 ng / g), respectivamente. Estas observaciones apoyan la teoría de que la formación de acrilamida en las aceitunas está asociada con el tratamiento térmico total (tiempo y temperatura) en forma de proceso F0, y no con los parámetros individuales. Sin embargo, (Montaño, 2008) informaron que, para procesos térmicos similares, o letalidad acumulativa análoga expresada por el proceso F0, la formación de acrilamida fue menor para los procesos realizados a temperatura más alta. Estos resultados son contrarios a los obtenidos en este estudio.

El mayor contenido de acrilamida obtenido en nuestro estudio con los tratamientos aplicados más agresivos se debió a la mayor temperatura y tiempo de calentamiento (Figura 4.4). Este efecto principal de la temperatura y el tiempo en los métodos de procesamiento térmico sobre la formación de acrilamida ha sido reportado por muchos investigadores (Michalak, 2017). Además, el proceso de fritura afecta la formación de acrilamida en los alimentos. Así, (Michalak, 2017) indicaron que se encontraron cantidades relativamente altas de acrilamida en croquetas tratadas con fritura en pan y freír (285 y 298 ng / g, respectivamente). Además, el contenido de acrilamida era aproximadamente 21 y 17% mayor en las croquetas tostadas que en los productos fritos en sartén y fritos en freidora, respectivamente. Los mayores contenidos de acrilamida en las croquetas tostadas al horno que en las fritas se debieron a una mayor temperatura y tiempo de calentamiento. La acrilamida se forma principalmente en la capa exterior expuesta al calor y la transferencia de calor es más eficiente durante el calentamiento por convección (horno) que el calentamiento por contacto (sartén y freidora). En consecuencia, la temperatura de la superficie del producto aumentó, aumentando la formación de acrilamida, que tiene lugar principalmente en la superficie y en las regiones cercanas a la superficie. Esto se debe a que las condiciones en esas partes del producto son favorables para la formación de acrilamida como resultado del secado simultáneo (Claus, 2008) (Anese, 2009). Además de esto, el contenido de humedad final se relacionó con el procesamiento térmico y esto debe tenerse en cuenta debido al efecto de la humedad final en la formación de acrilamida (Taeymans D, 2004).

Por todas estas razones, es importante que los restaurantes controlen la temperatura y el tiempo en hornos convencionales y / o en leña para evitar la formación excesiva de acrilamida durante el horneado de alimentos tales como pizzas. Por lo tanto, las autorizaciones personales deben controlar este compuesto tóxico para proteger la salud humana de acuerdo con las reglas

políticas debido a la acrilamida ha demostrado ser neurotóxico en modelos animales (Lopachin, 2002) y los casos de exposición relacionados con el trabajo humano (Goffeng, 2008).

#### 4.3.2.3. Comportamiento de los compuestos fenólicos presentes en la aceituna durante el horneado

Se observó el comportamiento de compuestos fenólicos en las aceitunas bajo diferentes procesos de horneado. Así, el perfil de compuestos fenólicos se realizó (mediante HPLC) después de cada tratamiento de horneado al mismo tiempo que el estudio de la formación de acrilamida. Los compuestos estudiados y el intervalo en el que se encontraron se pueden observar en la tabla 4.9. A pesar de ello, se observó que los compuestos fenólicos con mayor concentración eran hydroxytirosol (González-Gómez, 2014) seguido de tyrosol. Los otros compuestos fenólicos menores fueron ácido cafeico, p-cumárico, verbascosido, rutina, luteolina-7-O-glucósido y apigenin-7-O-glucósido.

Tabla 4. 9. Compuestos fenólicos presentes en las aceitunas estudiados mediante HPLC.

Compuesto	Rango en el que se encuentra (ng/g) (peso fresco)
Oleuropeína	0-10.64
Quercetina	0-7.88
Ácido vainillico	0-10.09
Vainillina	0-2.83
Ácido cafeico	0- 4.267
Ácido p-cumárico	0.474- 6.895
Verbascósido	0- 2.415
Rutina	0- 11.761
Luteolina-7-O-glucósido	0- 3.012
ApigeninA-7-O-glucósido	0 -3.032
Hydroxytirosol	108.68-367.35
Tyrosol	33.63- 81.32
Provitamina B1	0-23.77
Epicatequina	0-2.91

Los resultados se expresan como Principal  $\pm$  desviación estándar.

El comportamiento de todos los compuestos fenólicos encontrados en las muestras se analizó mediante la metodología de superficie de respuesta. Los parámetros estadísticos analizados se encuentran en la tabla 4.10. Los compuestos mayoritarios tuvieron un ajuste adecuado en un modelo cuadrático. Por lo tanto, los compuestos analizados presentaron un buen ajuste, que se reveló con un  $R^2$  mayor que 0,9 en todos los compuestos, excepto el verbascosido y el hydroxytirosol, donde  $R^2$  era cercano a 0,8. Por otra parte, tanto Adj- $R^2$  y Pred- $R^2$  son también altos y la diferencia entre ellos fue menor que 0,2. El modelo fue significativo en todos los casos ( $p < 0,01$ ). Además, la falta de parámetro de ajuste fue en todos los casos no significativa ( $p > 0,05$ ), lo que indica un buen ajuste. La figura 4.5 presenta la superficie de respuesta y las gráficas de contorno para la influencia de los diferentes procesos de horneado en catequina, ácido p-cumárico, verbascosida, rutina, apigenina-7-O-glucósido, luteolina-7-O-glucósido, hydroxytirosol y tyrosol de oxidado aceitunas negras.

Es comúnmente conocido que los compuestos fenólicos son sensibles a las altas temperaturas, así como a la exposición de la luz y el oxígeno. Todas estas condiciones hacen que estos compuestos se degraden. Por ello, aunque cada fenol presenta una superficie de respuesta diferente, en general, todos los compuestos tienen un mínimo de concentración en el máximo tiempo y temperatura de horneado.

Por lo tanto, se puede observar que, para el ácido cafeico, fue más afectada por el tiempo de horneado, disminuyendo drásticamente la concentración de fenoles por encima de 15 minutos independientemente de la temperatura ensayada. Sin embargo, el ácido p-cumárico tenía un máximo de concentración a veces menor que el ácido cafeico, 10 minutos, pero no a la temperatura mínima como era de esperar, pero alrededor de 190 ° C. Este comportamiento también se ha observado para la rutina, siendo su máxima extracción en tiempos más bajos, pero temperaturas medias. Así, los tiempos cortos de exposición y el aumento de la temperatura pueden estimular la extracción de estos compuestos fenólicos (González-Gómez *et al.*, 2014).

En la respuesta obtenida para la superficie del verbascosido, se observa que este compuesto se vio claramente afectado por el aumento de tiempo y temperatura de horneado, obteniendo un máximo de concentración en condiciones más suaves probadas. Luteolin-7-O-glucosido mostró un comportamiento irregular frente al tiempo, dependiendo de la temperatura de tratamiento.

De esta manera, se obtuvieron dos picos de concentración, uno a los tiempos y temperaturas más suave de procesamiento y otros tan largos, pero con la temperatura más baja.

El Apigenin-7-O-glucósido y el hydroxytirosol presentan comportamientos similares a los descritos para el ácido p-cumárico y la rutina, siendo el hydroxytirosol la mayoría de todos los compuestos fundados. Además de esto, se puede observar que, a diferencia de la mayoría de los otros compuestos, el hydroxytirosol no desapareció en un tratamiento más severo, este compuesto disminuyó considerablemente con respecto al tratamiento más suave de horneado. Finalmente, el tyrosol es un compuesto que tiene un comportamiento más diferente, ya que su concentración máxima fue en el tiempo máximo y con condiciones de horneado suave.

Finalmente, considerando la influencia de polifenoles sobre la formación de acrilamida, se examinó la correlación entre el contenido de acrilamida en los productos finales y el perfil fenólico utilizando la correlación de Pearson. La correlación varió dependiendo de los fenoles. Por lo tanto, se encontró que la formación de acrilamida se correlacionaba negativamente con el ácido cafeico, hydroxytirosol, epicatequina, tyrosol y PB1 ( $R < 0,78$ ;  $p < 0,05$ ).

Tabla 4. 10. Valores de los parámetros de ajuste y del test ANOVA para el comportamiento de polifenoles en el horneado de aceituna.

Compuesto	Ácido cafeico	Ácido <i>p</i> -cumárico	Verbascósido	Rutina	Luteolin-7- <i>O</i> -glucósido	Apigenina-7- <i>O</i> -glucósido	Hydroxytirosol	Tirosol
<b>Coefficiente de determinación (R<sup>2</sup>)</b>	0.9804	0.9608	0.7804	0.9465	0.9098	0.9704	0.8120	0.9072
<b>Adj R<sup>2</sup></b>	0.9715	0.9457	0.6959	0.9260	0.8721	0.9590	0.7265	0.8686
<b>Pred R<sup>2</sup></b>	0.9594	0.9190	0.5320	0.8889	0.8000	0.9364	0.5683	0.8034
<b>p modelo</b>	<0.0001	<0.0001	0.0006	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0010	<0.0001
<b>p falta de ajuste</b>	0.8637	0.6313	0.0547	0.1130	0.0821	0.7745	0.1386	0.1680
<b>C.V %</b>	15.06	12.57	42.23	18.20	20.00	12.26	14.52	8.63

$$\text{Ácido cafeico} = -7,76842 - 0,51549 * \text{Time} + 0,15183 * \text{Temperature} - 1,95835 * 10^{-3} * \text{Time} * \text{Temperature} + 0,021849 * \text{Time}^2 - 3,13147 * 10^{-4} * \text{Temperature}^2$$

$$\text{Ácido } p\text{-cumárico} = -42,75874 + 1,75209 * \text{Time} + 0,41327 * \text{Temperature} - 9,49040 * 10^{-3} * \text{Time} * \text{Temperature} - 2,77966 * 10^{-3} * \text{Time}^2 - 7,95079 * 10^{-4} * \text{Temperature}^2$$

$$\text{Verbascosido} = +13,87198 - 0,28090 * \text{Time} - 0,079647 * \text{Temperature} + 4,34801 * 10^{-4} * \text{Time} * \text{Temperature} + 4,38130 * 10^{-3} * \text{Time}^2 + 1,23535 * 10^{-4} * \text{Temperature}^2$$

$$\text{Rutina} = -44,10894 + 1,02617 * \text{Time} + 0,50957 * \text{Temperature} - 0,012778 * \text{Time} * \text{Temperature} + 0,037605 * \text{Time}^2 - 9,44365 * 10^{-4} * \text{Temperature}^2$$

$$\text{Luteolina-7-o-glucosido} = -1,57501 - 0,16940 * \text{Time} + 0,067862 * \text{Temperature} - 2,82809 * 10^{-3} * \text{Time} * \text{Temperature} + 0,021823 * \text{Time}^2 - 1,13724 * 10^{-4} * \text{Temperature}^2$$

$$\text{Apigenina-7-o glucósido} = -26,09671 + 0,64971 * \text{Time} + 0,25671 * \text{Temperature} - 3,88732 * 10^{-3} * \text{Time} * \text{Temperature} + 7,77044 * 10^{-4} * \text{Time}^2 - 5,34134 * 10^{-4} * \text{Temperature}^2$$

$$\text{Hydroxytirosol} = -2973,04262 + 49,58127 * \text{Time} + 30,48312 * \text{Temperature} - 0,21623 * \text{Time} * \text{Temperature} - 0,33713 * \text{Time}^2 - 0,070121 * \text{Temperature}^2$$

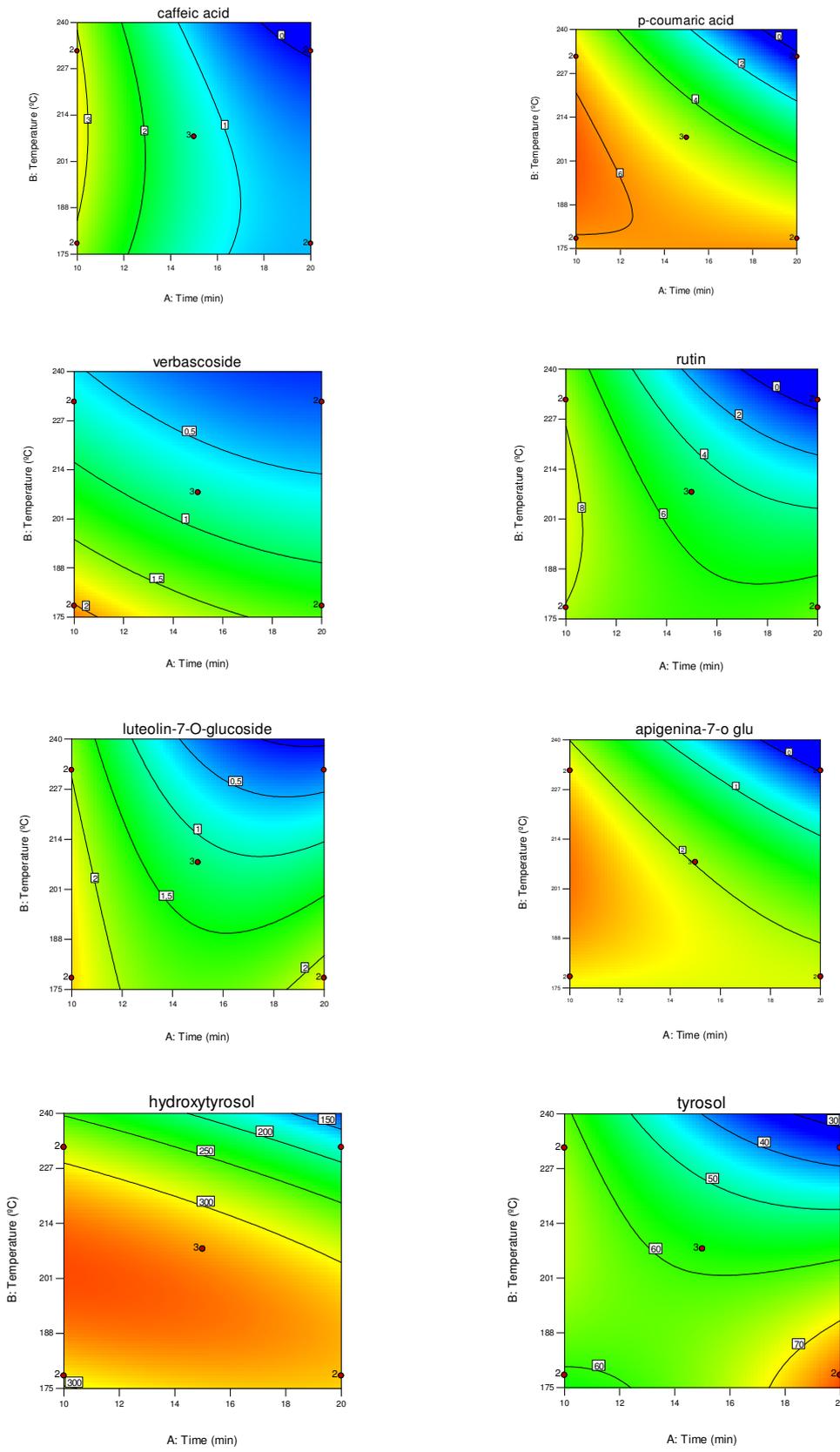


Figura 4. 5. Superficie - Respuesta para el comportamiento de la formación de compuestos fenólicos en función de dos factores, tiempo y temperatura de horneado.

El método aplicado a las aceitunas de mesa de proceso puede tener un impacto importante en el perfil fenólico de las aceitunas de mesa debido a la degradación oxidativa sometida a este tipo de proceso (Figura 4.5). En este sentido, la aceituna madura negra Californiana produce los niveles más bajos de fenoles totales y niveles considerablemente más bajos de hydroxytirosol en comparación con otras aceitunas de mesa procesadas. Durante el proceso de oxidación de la preparación de aceitunas maduras negras se debe principalmente a la polimerización de hydroxytirosol y ácido cafeico después de su oxidación a o-quinonas por exposición de los frutos al aire o su aireación en suspensión acuosa. El hydroxytirosol es en gran parte responsable de los múltiples beneficios para la salud asociados con el aceite de oliva virgen y las aceitunas de mesa. El ácido p-cumárico es un compuesto fenólico muy importante porque se ha demostrado que estos fenoles mitigaron eficazmente la formación de acrilamida durante la reacción de Maillard, muy probablemente por reacción directa con el precursor de acrilamida (Zhu, 2009). Por lo tanto, incluso si cada fenol tenía una superficie de respuesta diferente, en general, todos los compuestos analizados tenían una concentración mínima en el tiempo y temperatura máximos de horneado. Además, se ha encontrado una correlación negativa entre los fenoles y la acrilamida. Estudios previos sugieren que los compuestos fenólicos pueden influir en la formación de acrilamida (Zhu, 2009) (Morales, 2014). En los snacks de plátano frito preparado, se encontraron cinco compuestos fenólicos principales: ácido gálico, ácido clorogénico, ácido siríngico, ácido p-cumárico y quercetina, también se correlacionaron con el contenido de acrilamida indicando que un contenido fenólico más alto en plátano crudo junto con niveles reducidos de azúcares reductores en la maduración inicial, minimizaron la formación de acrilamida en los snacks fritos de plátano frito (Shamla, 2017) Los primeros informes sugieren que los polifenoles vegetales comprenden un gran grupo de compuestos que tienen estructuras diferentes que alcanzan una mayor influencia sobre la formación de acrilamida en el calentamiento (Zhu, 2009) Por esta razón, se puede concluir que los compuestos fenólicos son muy sensibles a las altas temperaturas aplicadas durante el horneado, así como a la exposición a la luz y al oxígeno (Kalua, 2006) (Longo, 2017). Aunque estas condiciones hacen que estos compuestos se degraden, la alta temperatura es un requisito para el horneado de pizzas y las otras pueden minimizarse en los hornos convencionales.

Se puede observar que los fenoles con alta capacidad antioxidante podrían influir en la formación de acrilamida. De hecho, los polifenoles actúan como eliminadores de radicales libres inhibiendo de este modo la reacción en cadena mediante la combinación del átomo de hidrógeno de -OH fenólico con los radicales libres. (Constantinou, 2016) informaron que, en la

reacción de Maillard, los antioxidantes fenólicos pueden reaccionar con fragmentos de azúcar y/o compuestos carbonilo reactivos, formando aductos mediante reacciones de sustitución aromática electrofílica e inhibiendo la formación de acrilamida. El número y la posición de los hidroxilos fenólicos de los compuestos flavonoides juegan un papel importante en el control de la formación de acrilamida. Además, los parámetros correspondientes, incluyendo el número, las posiciones y los efectos estereoscópicos espaciales de los hidroxilos funcionales, y el modo de acción relacionado, siguen siendo en gran medida inciertos (Zhang, 2016).

## **5. CONCLUSIONES**

## 5. CONCLUSIONES

PRIMERA. Se han encontrado diferencias significativas entre las muestras de aceitunas comerciales utilizadas en el ensayo en función de los parámetros físico-químicos analizados. Además, se observaron correlaciones positivas entre grados Brix y % de cloruros de las muestras; así como, entre la acidez y la concentración de fenoles totales.

SEGUNDA. Al analizar los compuestos fenólicos de la pulpa y de la salmuera se encontraron diferencias en función del tipo de aceituna comercial analizada. Los compuestos fenólicos mayoritarios en la pulpa de aceituna fueron Hydroxytirosol y Oleuropeína, mientras que en la salmuera fueron Hydroxytirosol y Tyrosol. Por otra parte, se observó una relación positiva entre la concentración de fenoles y la actividad antioxidante de las aceitunas, y entre esta actividad y la concentración de acrilamida. Por tanto, los compuestos fenólicos presentes en las aceitunas podrían ejercer algún efecto protector frente a la producción de acrilamida.

TERCERA. Las aceitunas negras comerciales oxidadas estudiadas presentaron grandes diferencias en cuanto a su concentración de acrilamida. En torno a un 50% de las muestras comerciales de aceitunas analizadas presentaron más de 250 ng de acrilamida por g de aceituna. Sin embargo, las concentraciones de este compuesto en la salmuera y en la aceituna fueron diferentes.

CUARTA. El estudio del tratamiento de horneado sobre las aceitunas negras oxidadas, en las que se han combinado diferentes temperaturas y tiempos, constituye un enfoque de gran utilidad para el conocimiento de la formación de acrilamida en función del tiempo y de la temperatura. La información de horneado obtenida podría servir como parte de una estrategia eficaz para optimizar el proceso, reduciendo las concentraciones de acrilamida y evitando la pérdida de compuestos fenólicos.

## **6. BIBLIOGRAFÍA**

## 6. BIBLIOGRAFÍA

**EFSA. (2015).** Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). EFSA Journal*, 13(6), , 4104.

**Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. (2016).** *Seguridad Alimentaria. Gestión de riegos. Seguridad Química. Contaminantes.* .  
[http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subdetalle/acrilamida.shtml](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/acrilamida.shtml). Consultado en 15 Febrero 2017.

**Anese, M. B. (2009).** Effect of chemical and biological dipping on acrylamide formation and sensory properties in deep-fried potatoes. *Food Research International*, 42, 142-147.

**Arancibia Araya, V. (2014).** *Tipos de elaboración de aceituna. Ministerio de agricultura, instituto de investigaciones agropecuarias, centro de investigación intihuasi.* Gobierno de Chile. Ministerio de Agricultura INIA.

**Arribas, L. y. (2009).** Dietary exposure to acrylamide from potato crisps to the Spanish population. *Food Additives & Contaminants: Part A.*, 26, (3), 289 - 297.

**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.

**Arroyo López, F. N., Bautista Gallego, J., Rodríguez Gómez, F., & Garrido Fernández, A. (2010).** Predictive microbiology and table olives. *Méndez-Vilas, A. (Ed.), Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*,, 1452-1461.

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

**Asociación Española de Exportadores e Industriales de Aceitunas de Mesa. (14 de Diciembre de 2017).** *Asemesa. La Aceituna, Historia y Curiosidades*. Obtenido de [http://www.asesma.es/content/aceituna\\_curiosidades](http://www.asesma.es/content/aceituna_curiosidades)

**Augusto, F. (13 de Febrero de 2017).** *LOS COLORES DE LA ACEITUNA*. Obtenido de <http://www.lamoltura.es/los-colores-de-la-aceituna/> Consultado en 1 Marzo 2017

**Bayram, B., Ozcelik, B., Schultheiss, G., Frank, J., & Rimbach, G. (2013).** A validated method for the determination of selected phenolics in olive oil using high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection and a fused-core column. *Food Chemistry* 138, 1663–1669.

**Becalski, A. L.-Y. (2003).** Acrylamide in foods: occurrence, sources and modeling. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 802–808.

**Bermudo, E. M. (2006).** Determination of acrylamide in foodstuffs by liquid chromatography ion-trap tandem mass-spectrometry using an improved clean-up procedure. *Analytica Chimica Acta Volume 559, Issue 2*, 207-214.

**Bernal, J., Mendiola, J. A., Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2011).** Advanced analysis of nutraceuticals. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 55, 758–774.

**BOE (Boletín Oficial del Estado Real Decreto 1230). (2001).** *Real Decreto 1230/2001 por el que se aprueba la Reglamentación técnico-sanitaria para la elaboración, circulación y venta de las aceitunas de mesa.*

**BOE (Boletín Oficial del Estado) Real Decreto 679. (2016).** *BOE-A-2016-11953. Real Decreto 679/2016, de 16 de diciembre, por el que se establece la norma de calidad de las aceitunas de mesa.* Núm. 304 Sábado 17 de diciembre de 2016 Sec. I. Pág. 88525.

**Bologna, L., Andrawes, F., Barvenik, F., Lentz, R., & Sojka, R. (1999).** Analysis of residual acrylamide in field crops. *Chrom. Sci* 37, 240-244.

- Boskou, G., Salta, F.-S., Chrysostomou, S., Mylona, A., Chiou, A., & Andrikopoulos, N.-K. (2006).** Antioxidant capacity and phenolic profile of table olives from the Greek market. *Food Chemistry* 94, 558–564.
- Bourne, M. C. (1978).** Texture Profile Analysis. *Food Technology*, 32, 62-66, 72.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E., & Berset, C. (1995).** Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 28, 25–30.
- Calvo, M. (2002).** *Formación de Acrilamida. Bioquímica de los alimentos.* Obtenido de <http://milksci.unizar.es/bioquimica/temas/azucares/acrilamida.html>. Consultado en 1 marzo 2017.
- Capuano, E. F. (2011).** Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *Food Science and Technology*, 44, 793-810.
- Carrasco Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina Toschi, T., & Fernandez Gutierrez, A. (2005).** Analytical determination of polyphenols in olive oils. *J.Sep.Sci.*, 837–858.
- Casado, F. J. (2010).** Reduction of acrylamide content of ripe olives by selected additives. *Food Chemistry*, 119,, 161-166.
- Charoenprasert, S. & (2014).** Influence of California-style black ripe olive processing on the formation of acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 8716-8721.
- Claus, A. M. (2008).** Impact of formulation and technological factor on the acrylamide content of wheat bread and bread rolls. *Journal of Cereal Science*, 47, 546-554.
- Codex Alimentario Argentino. (2004).** *Artículo 951 (Resol. Conj. SAGPyA y SPyRS 13 y 71/2004). Alimentos vegetales.*  
[http://www.anmat.gov.ar/webanmat/codigoa/Capitulo\\_XI.pdf](http://www.anmat.gov.ar/webanmat/codigoa/Capitulo_XI.pdf).

**Codex Alimentarius Commission. (1993).** *CAC/RCP 13-1979. Anexo 1. Código internacional recomendado de prácticas de higiene para alimentos poco ácidos y alimentos poco ácidos acidificados envasados.* .

**Codex Alimentarius Commission. (2009).** *CAC/RCP 67-2009 Código de prácticas para reducir el contenido de Acrilamida en los Alimentos.*

**Codex Alimentarius Commission. (2013).** *CODEX 66-1981. Revisión 1987. Norma del codex para las aceitunas de mesa.*

[http://www.fao.org/input/download/standards/243/CXS\\_066s.pdf](http://www.fao.org/input/download/standards/243/CXS_066s.pdf).

**Consejo Oleícola Internacional. (2011).** *Producción de Aceitunas.*

[http://www.internationaloliveoil.org/?lang=es\\_ES](http://www.internationaloliveoil.org/?lang=es_ES). Consultado en 16 Febrero 2017.

**Consejo Oleícola Internacional. (2012).** *MARKET NEWSLETTER No 64 September 2012.* .

<https://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwiQlej52vjWAhXLuhoKHdVFBY0QFggmMAA&url=http%3A%2F%2Fwww.internationaloliveoil.org%2Fdocuments%2Fviewfile%2F6758-market-newsletter-september-2012%2F2&usg=AOvVaw1EkL2SUh>.

**Constantinou, C. &. (2016).** Investigations on the effect of antioxidant type and concentration and model system matrix on acrylamide formation in model Maillard reaction systems. *Food Chemistry*, 197, 769-775.

**Corradini, M. G. (2006).** Linear and non-linear kinetics in the synthesis and degradation of acrylamide in foods and model systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 46, 489–517.

**Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009).** Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep.*, 1001-43. doi: 10.1039/b802662a. Epub 2009 May 13. Review. PubMed PMID: 19636448.

- De Vleeschouwer, K., Van Der Plancken, I., Van Loey, A., & Hendrickx, M. E. (2010).** The effect of high pressure-high temperature processing conditions on acrylamide formation and other maillard reaction compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11740-11748.
- Dinelli, G., Carretero, A. S., Di-Silvestro, R., Marotti, I., Fu, S., Benedettelli, S., & Ghiselli, L. (2009).** Determination of phenolic compounds in modern and old varieties of durum wheat using liquid chromatography coupled with time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1216(43):7229-40.
- Echeverri R, M. J. (2014).** ACRILAMIDA: Formación y mitigación en procesamiento industrial de alimentos. *Trabajo fin de Grado*.
- Estrada Cabezas, J. M. (2011).** *La aceituna de mesa: nociones sobre sus características, elaboración y cualidades*.
- Friedman, M. y. (2008).** Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. *J. Agric. Food Chem.*56, 6113 – 6140.
- García, M. L., Cáceres, E., & Selgas, M. D. (2006).** Effect of inulin on the textural and sensory properties of mortadella, a Spanish cooked meat product. *International Journal of Food Science & Technology*, 41, 1207-1215.
- García, M. M. (2010).** Desarrollo de un método para la mejora del procesado tradicional de aceitunas de mesa fermentadas. *Trabajo fin de grado*. Escuela de Ingenierías Agrarias Badajoz.
- Ghanbari , R., Anwar , F., M. Alkharfy, K., Gilani , A.-H., & Saari, N. (2012).** Valuable Nutrients and Functional Bioactives in Different Parts of Olive (*Olea europaea* L.) - A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, , 3291-3340.
- Goffeng, L. O. (2008).** Colour vision and light sensitivity in tunnel workers previously exposed to acrylamide and N-methylolacrylamide containing grouting agents. *Neurotoxicology*, 29, 31-39.

- González-Gómez, D. C.-A. (2014).** Application of experimental design and response surface methodology to optimize the procedure to obtain a bactericide and highly antioxidant aqueous extract from orange peels. *Food Control*, 35, 252-259.
- Harborne, J. B. (1989).** Plethora of polyphenols Plant Phenolics.
- Heredia, A. F.-B. (1990).** Cellulases in cell wall-degrading extracts of *Olea europaea arolensis*. *Z Lebensm Untersuch Forsch, Volume 190, Issue 1*, 22–24.
- Heredia, A. G.-B. (1993).** Activity of glycosidases during development and ripening of olive fruit. *Untersuch Forsch. February 1993, Volume 196, Issue 2*, 147–151.
- IOOC. Internacional Olive Oil Council Method . (1990).** *Determination of Tetrachloroethylene in Olive Oils by Gas-Liquid Chromatography*. . COIT.20/Document No 8.
- Jezuseek, M., & Schieberle, P. (2003).** A new LC/MS method for the quantitation of acrylamide based on a stable isotope dilution assay and derivatization with 2-mercaptobenzoic acid. Comparizon with two GC/MS methos. *J. Agric. Food Chem*, 52, 7866-7871.
- Kalua, C. M. (2006).** Discrimination of storage conditions and freshness in virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7144-7151.
- Konica Minolta. (1993).** *Konica Minolta. Entendiendo El Espacio de Color CIE L\*A\*B\**. Obtenido de <http://sensing.konicaminolta.com.mx/2014/09/entendiendo-el-espacio-de-color-cie-lab/> Consultado en 12 Febrero 2017.
- Leroy, F., & De Vuyst, L. (2004).** Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology* 15 , 67–78.
- Longo, E. M. (2017).** Effect of light irradiation on the antioxidant stability of oleuropein. *Food Chemistry*, 237, 91-97.

- Lopachin, R. M. (2002).** Nerve terminals as the primary. site of acrylamide action: a hypothesis. *Neurotoxicology*, 23, 43-59.
- Lopes, J. P. (2011).** Polinização em oliveira cvs. Galega e Cobrançosa: avaliação do vingamento em ensaios de polinização controlada e do efeito da aplicação de um bioestimulante. *Tese de mestrado*. Escola superior Agronomia, Lisboa.
- Malheiro, R., Guedes de Pinho, P., Casal, S., & Bento, A. &. (2011).** Volatile profile of stoned table olives from different varieties by HS-SPME and GC/IT-MS. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91, 1693-1701.
- Marçal Nogueira, F. A. (2012).** Contribuição para a caracterização de “Azeitonas de mesa mistas ao natural” produzidas de forma tradicional em Trás-os-Montes: aspectos morfológicos, químicos e microbiológicos. *Tese de Mestrado*. Escola Superior Agrária de Bragança.
- Marini, F., Bucci, R., Magrí, A. L., & Magrí, A. D. (2010).** An Overview of chemometric methods for the authentication of the geographical and varietal origin of olive oils. En V. R. Watson, *Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention*. Elsevier Inc.
- Michalak, J. G.-K. (2017).** Effect of different home cooking methods on acrylamide formation in pre-prepared croquettes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 56, 134-139.
- Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2012).** *MAGRAMA, Anuario de Estadística Agroalimentaria*. <http://www.magrama.gob.es>. Consultado en 20 Enero 2017.
- Montaño, A. C. (2008).** Formación de acrilamida durante el tratamiento de esterilización de aceitunas tratadas con álcali. In *CYTALIA XIII: Congreso anual en Ciencia y Tecnología de Alimentos*. Madrid.
- Morales, G. J. (2014).** Effect of natural extracts on the formation of acrylamide in fried potatoes. *LWT-Food Science and Technology*, 58, 587-593.

- Muñoz, J., Belaj, A., Barranco, D., & Rallo, L. (2004).** *Olivos monumentales de España*. Madrid: Coedición Mundi-Prensa, S.A. y Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía.
- Niaounakis, M., & Halvadakis, C. P. (2006).** *Chapter 11. Olive Processing Waste Management: Literature Review and Patent Survey*. ed. Elsevier.
- Normas Portuguesas. (1987).** *NP português 3034. Derivados de frutos e de produtos hortícolas. Azeitonas de mesa. Definição, classificação, características, acondicionamento e marcação*.
- Ono, H., Chuda, Y., Ohnishi-Kameyama, M., Yada, H., Ishizaka, M., Kobayashi, H., & Yoshida, M. (2003).** Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods. *Food Add Contam*, 20, 215-220.
- Parinos, C. D., Stalikas, C. D., Giannopoulou, T. S., & Pilidis, G. A. (2007).** Chemical and physicochemical profile of wastewaters produced from the different stages of Spanish-style green olives processing. *Journal of Hazardous Materials* 145, 339–343.
- Pereira, J. A., Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R., . . . Bento, A. (2006).** Table olives from Portugal: phenolic compounds, antioxidant potential, and antimicrobial activity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 54, 8425-8431.
- Picornell Buendía, M. R., & Melero Martínez, J. M. (2013).** HISTORIA DEL CULTIVO DEL OLIVO Y EL ACEITE; SU EXPRESIÓN EN LA BIBLIA. *ENSAYOS, Revista de la Facultad de Educación de Albacete*, N° 28., 155-181.
- Prata, J. J. (2015).** Contribuição para o estudo da produção de azeitona de mesa da cultivar Cobrançosa: caracterização físico-química, organoléptica e nutricional. *Tese de Mestrado*. Universidade do Algarve, Faro.
- Preedy, V.-R., & Watson, R.-R. (2010).** Olives and Olive Oil in Health and Disease Prevention. capítulo 1.

- Ramírez, E. G.-R.-G. (2015).** Composition of pigments and colour changes in green table olives related to processing type. *Food Chemistry, Volume 166*, 115-124.
- Rosen, J., & Hellenäs, K. (2002).** Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst, 127*, 880-882.
- Sánchez Gómez, A. H., García García, P., & Rejano Navarro, L. (2006).** Trends in table olives production. Elaboration of table olives. *Grasas y Aceites, 57*, 86-94.
- Schmidt, R. H., & Rodrick, G. E. (2003).** Food safety hand-book. Hoboken: John Wiley and Sons: 800.
- Scott Blair, G. W. (1958).** Rheology in Food Research. En *Advances in Food Research, Academic Press* (págs. Volume 8, Pages 1-61). ISSN 0065-2628, ISBN 9780120164080, [https://doi.org/10.1016/S0065-2628\(08\)60017-8](https://doi.org/10.1016/S0065-2628(08)60017-8).
- Selvaggini, R., Servili, M., Urbani, S., Esposito, S., Taticchi, A., & Montedoro, G. F. (2006).** Evaluation of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil by Direct Injection in High-Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 54*, 2832-2838.
- Sexton, R. P. (1997).** Cellulase, fruit softening and abscission in red raspberry *Rubus idaeus* L.cv Glen Clova. *Annals of Botany Vol 80, n°3*, 371-376.
- Shamla, L. & (2017).** Acrylamide formation in plantain (*Musa paradisiacal*) chips influenced by different ripening stages: A correlation study with respect to reducing sugars, amino acids and phenolic content. *Food Chemistry, 222*, 53-60.
- Singleton, V.-L., & Rossi, J.-A. (1965).** Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic. January 1965 16*, 144-158.

- Suarez, M., Macià, A., Romero, M. P., & Motilva, M. J. (2008).** Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. *Journal of chromatography*. 1214. 90-9. [10.1016/j.chroma.2008.10.098](https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.10.098). .
- Sun Man, L., Kyoung-Taek, L., Seong Hyun, L., & Jang Kun, S. (2013).** Origin of human colour preference for food. *In Journal of Food Engineering, Volume 119, Issue 3*, 508-515.
- Taeymans D, W. J. (2004).** A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, 44, 323-347.
- Tamer, C.-E., İncedayı, B., Yıldız, B., & Çopur, Ö.-U. (2013).** The Use of Vacuum Impregnation for Debittering Green Olives. *Food Bioprocess Technol*, 6, 3604-3612 .
- Tang, S., Avena Bustillos, R. J., Lear, M., Sedej, I., Holstege, D. M., McHugh, T. H., & Wang, S. C. (2016).** valuation of thermal processing variables for reducing acrylamide in canned black ripe olives. *Journal of Food Engineering* 191, 124-130.
- Tofalo, R., Schirone, M., Perpetuini, G., Suzzi, G., & Corsetti, A. (2012).** Development and application of a real-time PCR-based assay to enumerate total yeasts and *Pichia anomala*, *Pichia guillermondii* and *Pichia kluyveri* in fermented table olives. *Food Control* 23 , 356-362.
- Torres, J., Gonzalez-Morelo, K., & Acevedo Correa, D. (2015).** Análisis del Perfil de Textura en Frutas, Productos Cárnicos y Quesos. . *Revista ReCiTeIA*. 14, 63-75.
- Tuna, S., & Akpınar-Bayızit, A. (2009).** The use of B-Glucosidase Enzyme in black Table Olives Fermentation. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 37, 182-189.

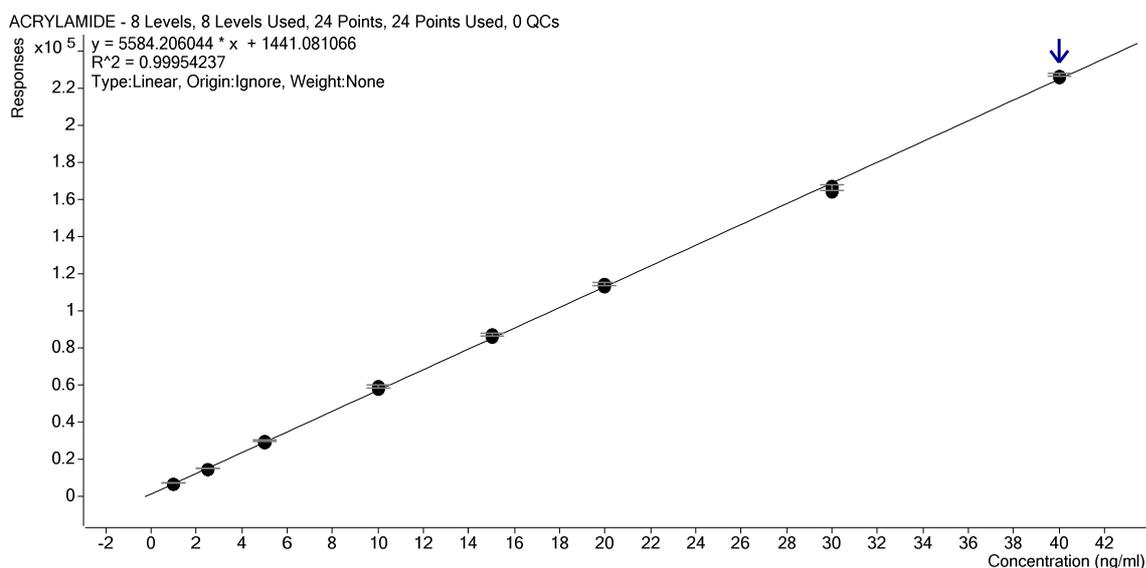
- Tura, D., Gigliotti, C., Pedò, S., Failla, O., Bassi, D., & Serraiocco, A. (2007).** Influence of cultivar and site of cultivation on levels of lipophilic and hydrophilic antioxidants in virgin olive oils (*Olea Europea L.*) and correlations with oxidative stability. *Scientia Horticulturae. Volume 112, Issue 1*, 108-119.
- Wenzl, T., De-la-Calle, M.-B., & Anklam, E. (2003).** Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review. *Food Addit Contam.* 20, 885–902.
- Zhang, Y. H. (2016).** Structure-guided unravelling: Phenolic hydroxyls contribute to reduction of acrylamide using multiplex quantitative structure-activity relationship modelling. *Food Chemistry*, 199, 492-501.
- Zhu, F. C.-Z. (2009).** Evaluation of the effect of plant extracts and phenolic compounds on reduction of acrylamide in an asparagine/glucose model system by RP-HPLC-DAD. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1674–1681.

## ANEXO 1. Optimización de la separación cromatográfica de la acrilamida

### Linealidad

La linealidad es la capacidad (dentro de un intervalo dado) para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras a analizar.

Se determinó la linealidad como la capacidad para proporcionar resultados directamente proporcionales al analito. Este parámetro se evalúa mediante el coeficiente de regresión  $R^2$  cuyo criterio de aceptación se sitúa en valores superiores a 0.995. Se han preparado por triplicado 8 concentraciones diferentes de acrilamida en agua Milli-Q en el rango 1 a 40  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . La correspondiente recta de calibrado presenta un valor de  $R^2=0.9995$ .



### Sensibilidad

La sensibilidad es el cociente entre el cambio en la indicación de un sistema de medición y el cambio correspondiente en el valor de la cantidad objeto de la medición. En una regresión lineal la sensibilidad corresponde a la pendiente de la recta de calibración, ya que esta define la razón de cambio de la propiedad medida por unidad de concentración. El valor de sensibilidad obtenido (pendiente) debe permitir una adecuada discriminación de los valores de concentración.

El valor de la pendiente de la recta de calibrado, 5584.2, indica la elevada sensibilidad del método.

## Exactitud

Este parámetro refleja el grado de concordancia entre un valor medido y un valor teórico (verdadero). Se calcula como el cociente entre la concentración obtenida y real multiplicado por 100. Los valores obtenidos para la exactitud por este método ("Accuracy") se muestran en la Tabla A2.1. Como se puede apreciar, los valores se encuentran dentro del rango  $100 \pm 15\%$  considerado como aceptable (IUPAC, 2014).

Tabla A1. 1. Datos referidos a los 24 patrones analizados (preparación independiente por triplicado para concentración).

<b>C<sub>patrón</sub>, µg/kg</b>	<b>C<sub>media</sub>, µg/kg</b>	<b>Desviación estandar</b>	<b>CV, %</b>	<b>Accuracy</b>
1	0.94	0.060	6.37	94.2
2.5	2.39	0.023	0.98	95.5
5	4.95	0.077	1.55	99.1
10	10.23	0.104	1.02	102.3
15	15.20	0.132	0.87	101.4
20	20.10	0.114	0.57	100.5
30	29.42	0.272	0.92	98.1
40	40.27	0.082	0.20	98.7

## Límite de detección (LOD) y de cuantificación (LOQ)

Se denomina límite de detección a la concentración que proporciona una señal instrumental significativamente diferente del blanco o señal de fondo. El límite de cuantificación es la concentración mínima de analito que puede cuantificarse con exactitud y precisión aceptable. Existen diferentes métodos para su cálculo: basados en la señal-ruido (S/N), basados en la medida de blancos de muestra, basados en métodos gráficos y basados en la desviación estándar de las medidas y pendiente de la curva de calibrado. En este último caso, LOD y LOQ pueden calcularse como:

$$LOD = \frac{3 * SD}{m} \qquad LOQ = \frac{10 * SD}{m}$$

Ecuación A. 1 Límite de detección y de cuantificación.

siendo  $m$  la pendiente de la recta de calibrado y  $SD$  la desviación estándar de la ordenada en el origen. En nuestro caso:  $LOD=0.28 \mu\text{g/kg}$   $LOQ=0.92 \mu\text{g/kg}$

### Precisión intra-día

La precisión es una medida de la dispersión de los datos en torno a un valor central y puede expresarse de diferentes formas, entre ellas la desviación estándar y el porcentaje del coeficiente de variación (%CV). La Tabla 1 recoge la desviación estándar y el porcentaje de variación para cada concentración preparada por triplicado analizada el mismo día. Los resultados están dentro de los valores de aceptación (CV debe ser inferior al 15% para cada concentración) (WHO, 2009).

### Reproducibilidad (precisión intermedia)

La reproducibilidad intralaboratorio se realiza en el mismo laboratorio, preparando los patrones de calibración cada vez, en distintos días y cambiando en la medida de lo posible de equipo y analista. A esta reproducibilidad intralaboratorio se la conoce como precisión intermedia.

En este estudio se ha evaluado la reproducibilidad analizando diferentes muestras de idéntica concentración preparadas de forma independiente y en días distintos (11 réplicas diferentes de dos concentraciones distintas, 5 y 20  $\mu\text{g/kg}$ ).

Tabla A1. 2. Determinación de la reproducibilidad.

Muestra	C <sub>calculada</sub> , $\mu\text{g/kg}$	Muestra	C <sub>calculada</sub> , $\mu\text{g/kg}$
25	4.765	36	20.441
26	4.812	37	20.301
27	4.957	38	20.236
28	4.826	39	20.532
29	4.944	40	20.731
30	4.668	41	20.391
31	4.790	42	19.609
32	4.832	43	20.523
33	4.638	44	20.206
34	4.705	45	19.979
35	4.775	46	20.115
<b>C<sub>media</sub>, <math>\mu\text{g/kg}</math></b>	4.84	<b>C<sub>media</sub>, <math>\mu\text{g/kg}</math></b>	20.28
<b>Desviación estándar</b>	0.13	<b>Desviación estándar</b>	0.31
<b>CV, %</b>	2.77	<b>CV, %</b>	1.51

## Repetitividad

Refleja la precisión de un método, cuando se desarrolla bajo las mismas condiciones, utilizando la misma muestra, analizada por el mismo analista, en el mismo laboratorio, con los mismos equipos y reactivos y durante un corto período corto de tiempo. El parámetro estadístico que caracteriza a este estudio es la desviación estándar o el coeficiente de variación.

Para determinar la repetitividad se ha analizado la misma muestra 10 veces en un corto periodo de tiempo sin variar ningún factor (analista, equipo, reactivos).

Tabla A1. 3. Determinación de la repetitividad.

Muestra	C <sub>calculada</sub> , µg/kg	Muestra	C <sub>calculada</sub> , µg/kg
47	4.973	48	20.005
47	4.896	48	20.010
47	4.922	48	20.155
47	4.827	48	20.459
47	4.846	48	20.470
47	4.860	48	20.739
47	4.834	48	20.623
47	4.783	48	20.785
47	4.781	48	20.635
47	4.756	48	20.828
<b>C<sub>media</sub>, µg/kg</b>	4.85	<b>C<sub>media</sub>, µg/kg</b>	20.47
<b>Desviación estándar</b>	0.068	<b>Desviación estándar</b>	0.312
<b>CV, %</b>	1.40	<b>CV, %</b>	1.53

## Efecto matriz

El efecto matriz consiste en una disminución o aumento de la respuesta instrumental del analito debido a la presencia de otros componentes. En decir, para una misma concentración de analito, el análisis de una muestra real o de una disolución estándar del analito puro no proporcionan la misma respuesta.

La adición de concentración conocida de acrilamida en la matriz a evaluar (pasta de aceituna) mostró efecto matriz: la pendiente de patrones en agua Mili-Q es de 5584, mientras que las fortificaciones en dos pastas de aceituna diferentes fueron de 1777 y 3090.

Un modo de salvar dicho efecto matriz es construir la recta de calibrado en una muestra parecida a la muestra problema, pero libre del analito a determinar. Sin embargo, en el caso de que no sea factible reproducir la matriz o ésta varíe entre muestra y muestra la mejor alternativa para evitar el efecto matriz es utilizar la adición estándar.

La adición estándar consiste en la adición de cantidades conocidas y crecientes del analito a cada muestra. La posterior cuantificación del analito se realiza por extrapolación de la recta de calibrado al punto del eje de abscisas donde la respuesta es cero. El mayor inconveniente de esta técnica es que es necesario construir una recta de adiciones estándar para cada muestra a analizar.

La evaluación de la concentración se realiza utilizando el método de adición patrón, es decir, adicionando a cada muestra cantidades crecientes de patrón y cálculo de la concentración de analito por extrapolación. En este caso se adiciona 3 veces 5 µg/kg de acrilamida.

### Recuperación

La recuperación de un analito se refiere a la eficiencia de la extracción en un proceso analítico. Para su evaluación, se añadieron diferentes cantidades de acrilamida a diferentes matrices por triplicado y se llevó a cabo el proceso de extracción.

La recuperación se evalúa como el cociente entre la concentración de acrilamida determinada tras el análisis y la adición estándar y la concentración inicialmente añadida, multiplicado por 100. La Tabla 2 muestra el valor medio de recuperación y la desviación estándar para 4 niveles iniciales diferentes de concentración.

Tabla A1. 4. Determinación de la recuperación.

<b>Concentración, ng/g</b>	<b>R, %</b>	<b>STD</b>
<b>125</b>	88.4	2.4
<b>75</b>	80.2	2.9
<b>25</b>	96.5	8.0
<b>12.5</b>	108.9	15.7

