



UNIVERSIDAD DE JAÉN

**ESCUELA POLITÉCNICA
SUPERIOR DE LINARES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
FÍSICA Y ANALÍTICA**

TESIS DOCTORAL

**ACEITES DE OLIVA VÍRGENES EXTRA
ENRIQUECIDOS CON NUEVOS
ANTIOXIDANTES PROCEDENTES DE
MICROALGAS. CARACTERIZACIÓN
FÍSICO-QUÍMICA, COLOMÉTRICA Y
ENSAYOS DE ESTABILIDAD**

**PRESENTADA POR:
PIEDAD MARÍA LIMÓN VILLAREJO**

**DIRIGIDA POR:
DR. D. RUPERTO BERMEJO ROMÁN
DR. D. MANUEL MELGOSA LATORRE**

JAÉN, 13 DE JULIO DE 2017

ISBN 978-84-9159-212-9

UNIVERSIDAD DE JAÉN

Departamento de Química Física y Analítica

ESCUELA POLITÉCNICA SUPERIOR DE LINARES



TESIS DOCTORAL CON MENCIÓN INTERNACIONAL

**ACEITES DE OLIVA VÍRGENES EXTRA ENRIQUECIDOS
CON NUEVOS ANTIOXIDANTES PROCEDENTES DE
MICROALGAS. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA,
COLORIMÉTRICA Y ENSAYOS DE ESTABILIDAD.**

Piedad María Limón Villarejo

Linares, 2017

D. RUPERTO BERMEJO ROMÁN
D. MANUEL MELGOSA LATORRE

CERTIFICAN:

Que el trabajo desarrollado en la presente Memoria, con el título “**ACEITES DE OLIVA VÍRGENES EXTRA ENRIQUECIDOS CON NUEVOS ANTIOXIDANTES PROCEDENTES DE MICROALGAS. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA, COLORIMÉTRICA Y ENSAYOS DE ESTABILIDAD**”, que presenta D^a PIEDAD MARÍA LIMÓN VILLAREJO para optar al Grado de Doctora con Mención Internacional por la Universidad de Jaén, ha sido realizado bajo nuestra dirección en los laboratorios del Departamento de Química Física y Analítica, de la Escuela Politécnica Superior de Linares perteneciente a la Universidad de Jaén.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en Linares, a 7 de Abril de 2017.

Fdo.: Dr. D. Ruperto Bermejo Román
Profesor Titular de Química Física
Universidad de Jaén

Fdo.: Dr. D. Manuel Melgosa Latorre
Catedrático de Óptica
Universidad de Granada

Tesis Doctoral presentada por D^a Piedad María Limón Villarejo, Ingeniera Química Industrial, para optar al grado de Doctora con Mención Internacional por la Universidad de Jaén.

La presente Memoria se enmarca en el Programa Oficial de Doctorado en Ciencias (Real Decreto 1393/2007) y muestra parte de los resultados dentro del Proyecto de Investigación titulado “Obtención de aceites de oliva enriquecidos en luteína de microalgas marinas para prevención de enfermedades degenerativas, caracterización físico-química y colorimétrica”, Proyecto de Investigación UJA2011/13/09 financiado por Caja Rural (Universidad de Jaén).

Fdo.: D^a Piedad María Limón Villarejo
Ingeniera Química Industrial



ÍNDICES

TESIS DOCTORAL

ACEITES DE OLIVA VÍRGENES EXTRA ENRIQUECIDOS CON NUEVOS ANTIOXIDANTES PROCEDENTES DE MICROALGAS. CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA, COLORIMÉTRICA Y ENSAYOS DE ESTABILIDAD.

ÍNDICE GENERAL

1.- INTRODUCCIÓN. JUSTIFICACIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES	5
2.1.- LAS MICROALGAS COMO FUENTE DE PRODUCTOS DE ALTO VALOR.....	5
2.1.1.- Las microalgas frente a cultivos convencionales	8
2.1.2.- Aplicaciones	12
2.1.3.- Cultivo y producción de <i>Scenedesmus almeriensis</i>	22
2.2.- CAROTENOIDES-ANTIOXIDANTES	26
2.2.1.- Generalidades	26
2.2.2.- Importancia nutricional	28
2.2.3.- Estabilidad en los alimentos	33
2.2.4.- Degeneración macular asociada a la edad	34
2.2.5.- La luteína como agente antioxidante y preventivo	35
2.2.6.- Fuentes para la obtención de luteína y otros antioxidantes	39
2.3.- EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN	42
2.3.1.- Antioxidantes presentes en el aceite de oliva virgen.....	44
2.3.1.1.- Compuestos Fenólicos.....	45
2.3.1.2.- Tocoferoles	46
2.3.1.3.- Pigmentos	47
2.3.2.- Importancia de la dieta mediterránea.....	49
2.3.3.- Parámetros de calidad de los aceites de oliva	50
2.3.4.- El color del aceite de oliva	53
2.4.- FUNDAMENTOS DE CIENCIA DEL COLOR	55
2.4.1.- Especificación del color	55
2.4.2.- Espacios de color	61
2.4.3.- Medida de la diferencia de color	67
2.4.4.- Emociones y preferencias suscitadas por el color	70
2.5.- FACTORES QUE INFLUYEN EN EL COLOR Y AFECTAN A LA PRESENCIA DE ANTIOXIDANTES EN EL ACEITE DE OLIVA.....	74
2.5.1.- Factores agronómicos	75
2.5.1.1.- Factores agronómicos intrínsecos.....	76
2.5.1.2.- Factores agronómicos extrínsecos.....	78

3.- OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES DE OLIVA VÍRGENES EXTRA ENRIQUECIDOS CON ANTIOXIDANTES.....	84
3.1.- INTRODUCCIÓN.....	84
3.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	84
3.2.1.-Microalga <i>Scenedesmus almeriensis</i>	84
3.2.2.-Aceites de oliva vírgenes extra	85
3.2.3.-Extracción y purificación del extracto de antioxidantes	87
3.2.4.-Obtención de aceites enriquecidos con antioxidantes	89
3.2.5.-Caracterización del color de los AOVE's	92
3.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	92
3.3.1.- Extracción y purificación de antioxidantes	92
3.3.2.- Obtención y caracterización colorimétrica de AOVE's enriquecidos con antioxidantes	94
3.4.- CONCLUSIONES	103
4.- MEJORA DE LA ESTABILIDAD Y DE LA FRACCIÓN DE CAROTENOIDES EN ACEITES DE OLIVA VÍRGENES EXTRA MEDIANTE LA ADICIÓN DE EXTRACTOS PROCEDENTES DE LA MICROALGA SCENDESMUS ALMERIENSIS	104
4.1.- INTRODUCCIÓN.....	104
4.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	106
4.2.1.- Producción de la microalga <i>Scenedesmus almeriensis</i>	106
4.2.2.- Métodos de extracción	106
4.2.3.- Preparación de las muestras de aceite de oliva	107
4.2.4.- Parámetros físicos y de calidad evaluados	107
4.2.4.1.- Determinación de color	107
4.2.4.2.- Determinación de parámetros de calidad	108
4.2.5.- Determinación de los valores de <i>p</i> -anisidina.....	108
4.2.6.- Estabilidad oxidativa.....	108
4.2.7.- Composición en ácidos grasos.....	108
4.2.8.- Composición en tocoferoles	109
4.2.9.- Composición de los pigmentos.....	110
4.2.10.- Análisis estadístico	110
4.2.10.1.- Análisis de la varianza.....	110
4.2.10.2.- Análisis de los componentes principales (PCA).....	111
4.2.10.3.- Análisis discriminante lineal (LDA)	111
4.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	112
4.3.1.- Parámetros de color	112
4.3.2.- Parámetros de calidad.....	113
4.3.3.- Perfil de ácidos grasos	114
4.3.4.- Composición en tocoferoles	115
4.3.5.- Composición de pigmentos	115
4.3.6.- Estabilidad oxidativa.....	116
4.3.7.- Discriminación de los aceites de oliva por la adición de extracto de <i>Scenedesmus almeriensis</i>	117
4.3.8.- Incorporación de <i>S. almeriensis</i> y consumo de aceite de oliva	118
4.4.- CONCLUSIONES	120

5.- ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE ACEITES DE OLIVA VÍRGENES EXTRA ENRIQUECIDOS CON ANTIOXIDANTES	127
5.1.- INTRODUCCIÓN.....	127
5.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	128
5.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	131
5.3.1.- Estabilidad en función de la radiación incidente: foto-estabilidad.....	131
5.3.2.- Estabilidad en función de la temperatura: termo-estabilidad.....	136
5.3.3.- Estabilidad en función del tiempo: consumo preferente.....	139
5.3.4.- Estudios específicos de estabilidad	140
5.3.4.1.- Foto-estabilidad en función del índice de maduración del fruto	141
5.3.4.2.- Foto-estabilidad en función de la variedad del fruto	143
5.3.4.3.- Termo-estabilidad en función del índice de maduración del fruto	145
5.3.4.4.- Termo-estabilidad en función de la variedad del fruto	147
5.4.- CONCLUSIONES.....	149
6.- EMOCIONES Y PREFERENCIAS DE COLOR EN ACEITES DE OLIVA VÍRGENES EXTRA ENRIQUECIDOS CON ANTIOXIDANTES. ESTUDIOS DE APRECIACIÓN VISUAL DE POBLACIONES ACOSTUMBRADAS O NO AL CONSUMO DE ACEITE DE OLIVA	150
6.1.- INTRODUCCIÓN.....	150
6.2.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	151
6.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	154
6.3.1.- Muestras usadas en el experimento de emociones de color.....	154
6.3.2.- Variabilidad inter-observador e intra-observador	163
6.3.2.1.- Escalas emocionales	164
6.3.2.2.- Correlación entre diferentes emociones.....	166
6.3.2.3.- Dependencia entre valores z y cantidad de antioxidantes....	168
6.4.- CONCLUSIONES.....	180
7.- CONCLUSIONES GENERALES.....	181
8.- BIBLIOGRAFÍA.....	184

9.- ANEXOS	212
Anexo I	212
9.1.- ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE TODOS LOS ACEITES ENSAYADOS	212
9.1.1.- Estabilidad en función de la radiación electromagnética: foto-estabilidad	212
9.1.2.- Estabilidad en función de la temperatura: termo-estabilidad	224
9.1.3.- Estabilidad en función del tiempo: consumo preferente	238
9.2.- ESTUDIOS ESPECÍFICOS DE ESTABILIDAD DE TODOS LOS ACEITES ENSAYADOS	245
9.2.1.- Foto-estabilidad en función del índice de maduración del fruto.....	245
9.2.2.- Foto-estabilidad en función de la variedad del fruto	249
9.2.3.- Termo-estabilidad en función del índice de maduración del fruto	255
9.2.4.- Termo-estabilidad en función de la variedad del fruto.....	259
Anexo II	264
9.3.- EXPERIMENTO DE EMOCIONES SUSCITADAS POR EL COLOR	264
9.3.1.- Resultados con población acostumbrada al consumo de aceite de oliva	266
9.3.2.- Resultados con población no acostumbrada al consumo de aceite de oliva	286
10.- SUMMARY	294
11.- PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES	336

ÍNDICE DE ECUACIONES

	Página
Ecuación 2.1 Expresión para calcular los valores triestímulo X	63
Ecuación 2.2 Expresión para calcular los valores triestímulo Y	63
Ecuación 2.3 Expresión para calcular los valores triestímulo Z	63
Ecuación 2.4 Expresión para calcular coordenadas de motricidad en x	63
Ecuación 2.5 Expresión para calcular coordenadas de motricidad en y	63
Ecuación 2.6 Expresión para calcular el valor del croma C_{ab}^*	66
Ecuación 2.7 Expresión para calcular el valor del ángulo del tono h_{ab}	66
Ecuación 2.8 Expresión para calcular la diferencia de color en CIELAB	68
Ecuación 2.9 Otra expresión para calcular la diferencia de color en CIELAB	68
Ecuación 2.10 Expresión para calcular la diferencia de tono ΔH_{ab}^*	68
Ecuación 2.11 Expresión correspondiente a la emoción “fuerte-débil”	72
Ecuación 3.1 Cálculo de los μl de extracto que hay que añadir a los AOVE’s para conseguir una concentración de 0,05 mg luteína/ml aceite en los estudios de foto-estabilidad	91
Ecuación 3.2 Cálculo de los μl de extracto que hay que añadir a los AOVE’s para conseguir una concentración de 0,1 mg luteína/ml aceite en los estudios de foto-estabilidad	91
Ecuación 4.1 Expresión para calcular la diferencia de color en CIELAB	107
Ecuación 4.2 Expresión para calcular el índice de amarilleamiento YI	107
Ecuación 5.1 Cálculo de los μl de extracto que hay que añadir a los AOVE’s para conseguir una concentración de 0,05 mg luteína/ml aceite en los estudios de termo-estabilidad	130
Ecuación 5.2 Cálculo de los μl de extracto que hay que añadir a los AOVE’s para conseguir una concentración de 0,1 mg luteína/ml aceite en los estudios de termo-estabilidad	130

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1 Estructura del retinol	29
Figura 2.2 Estructura del β -caroteno	30
Figura 2.3 Estructura química de la luteína.....	36
Figura 2.4 Espectro electromagnético.....	56
Figura 2.5 Rueda del color	58
Figura 2.6 Diferentes representaciones de los atributos del color en el sólido de color.....	60
Figura 2.7 Representación de las 40 cartas o tonos (Hue) del atlas Munsell.....	60
Figura 2.8 Diagrama de cromaticidad CIE x, y basado en el espacio de color XYZ	64
Figura 2.9 Espacio de color CIELAB y Plano CIELAB	65
Figura 2.10 Vista del espacio de color $L^*a^*b^*$	66
Figura 2.11 Parámetros del espacio de color $L^* C^* h$	67
Figura 2.12 Diferencias de color en el espacio $L^*a^*b^*$	69
Figura 2.13 Términos para describir diferencias de color en claridad y croma CIELAB.....	69
Figura 3.1 Coordenadas CIELAB de los 15 AOVE's	86
Figura 3.2 Cromatogramas del AOVE "C"	90
Figura 3.3 Representación del % de luteína recuperada frente al nº de extracciones	93
Figura 3.4 Cambios de color en el plano a^*b^* para los 4 aceites considerando diferentes adiciones de extracto.....	96
Figura 3.5 Evolución del color de los 4 aceites con diferentes adiciones de extracto, en el plano CIELAB con coordenadas ángulo de tono y claridad.....	97

Figura 3.6 Evolución del color de los 4 aceites con diferentes adiciones de extracto, en el plano CIELAB con coordenadas ángulo de tono y croma	98
Figura 3.7 Diferencias de color CIELAB en 4 AOVE´s en función del enriquecimiento con extracto de antioxidantes de los mismos	100
Figura 4.1 Diferencias de color (ΔE^*_{ab}) y el índice de amarilleamiento (YI) de los AOVE´s....	121
Figura 4.2 Contenido en β -caroteno, luteína y estabilidad oxidativa de los AOVE´s.....	122
Figura 4.3 Análisis del PCA y LDA de los AOVE´s	123
Figura 5.1 Distribución espectral de potencia de la fuente de luz ultravioleta de la cabina Verivide CAC 60	129
Figura 5.2 Diferencias de color CIELAB producidas en AOVE´s sin enriquecer, como consecuencia de exposición continua a luz ultravioleta	132
Figura 5.3 Diferencias de color CIELAB producidas en AOVE´s enriquecidos con extracto de antioxidantes de concentración 0,05 mg luteína/ml	133
Figura 5.4 Diferencias de color CIELAB producidas en AOVE´s enriquecidos con extracto de antioxidantes de concentración 0,1 mg luteína/ml	133
Figura 5.5 Foto-estabilidad del AOVE "B" (Santuario de Mágina) bajo condiciones de iluminación controlada con lámpara ultravioleta	134
Figura 5.6 Foto-estabilidad del AOVE "C" (Oro Bailén) bajo condiciones de iluminación controlada con lámpara ultravioleta	135
Figura 5.7 Diferencias de color CIELAB de los AOVE´s sin enriquecer en función del tiempo de calentamiento a 120 °C	136
Figura 5.8 Diferencias de color CIELAB de los 5 AOVE´s enriquecidos con extracto de antioxidantes (0,05mg luteína/ml), en función del tiempo de calentamiento a 120 °C	137
Figura 5.9 Diferencias de color CIELAB de los 5 AOVE´s enriquecidos con extracto de antioxidantes (0,1mg luteína/ml), en función del tiempo de calentamiento a 120 °C	137
Figura 5.10 Diferencias de color CIELAB en el AOVE "L"	138

Figura 5.11 Estabilidad temporal de 5 AOVE´s bajo condiciones de almacenamiento seco, en oscuridad y a temperatura ambiente (20 °C) (Datos sin enriquecer).....	139
Figura 5.12 Estabilidad temporal de 5 AOVE´s bajo condiciones de almacenamiento seco, en oscuridad a temperatura ambiente (20 °C) (0,05 mg luteína/ml).....	140
Figura 5.13 Foto-estabilidad de los AOVE´s “CCP”, procedentes de frutos con 3 grados distintos de maduración (Datos sin enriquecer)	141
Figura 5.14 Foto-estabilidad de los AOVE´s “CCP”, procedentes de frutos con 3 grados distintos de maduración (0,05 mg luteína/ml)	142
Figura 5.15 Foto-estabilidad de los AOVE´s procedentes de frutos de 4 variedades diferentes (Datos sin enriquecer)	143
Figura 5.16 Foto-estabilidad de los AOVE´s procedentes de frutos de 4 variedades diferentes (0,05 mg luteína/ml)	144
Figura 5.17 Termo-estabilidad de los AOVE´s “CCP”, procedentes de frutos con 3 grados distintos de maduración (Datos sin enriquecer)	145
Figura 5.18 Termo-estabilidad de los AOVE´s “CCP”, procedentes de frutos con 3 grados distintos de maduración (0,05 mg luteína/ml)	146
Figura 5.19 Termo-estabilidad de los AOVE´s procedentes de frutos de 4 variedades diferentes (Datos sin enriquecer)	147
Figura 5.20 Termo-estabilidad de los AOVE´s procedentes de frutos de 4 variedades diferentes (0,05 mg luteína/ml)	148
Figura 6.1 Evolución del color con las dos adiciones de extracto de antioxidantes para cada una de las 6 muestras de aceite	157
Figura 6.2a Cambios de claridad descritos mediante la coordenada CIELAB L^*	158
Figura 6.2b Cambios de croma descritos mediante la coordenada CIELAB C^*_{ab}	158
Figura 6.2c Cambios de tono descritos mediante la coordenada CIELAB h_{ab}	159

Figura 6.3a Diferencias de color para cada uno de los 6 aceites en los procesos A-B y A-C, en unidades CIELAB (ΔE^*_{ab})	161
Figura 6.3b % promedios de cambio en claridad ($\% \Delta L^*$), croma ($\% \Delta C^*_{ab}$) y tono ($\% \Delta H^*_{ab}$) CIELAB de los AOVE's con una primera adición de extracto (proceso A-B)	162
Figura 6.3c % promedios de cambio en claridad ($\% \Delta L^*$), croma ($\% \Delta C^*_{ab}$) y tono ($\% \Delta H^*_{ab}$) CIELAB de los AOVE's con una segunda adición de extracto (proceso A-C)	162
Figura 6.4 Representación de los valores de frontera calculados para las 9 escalas emocionales y los 2 grupos de observadores (acostumbrados y no acostumbrados)	166
Figura 6.5 Resultados promedio (valores z) para la emoción "Inodoro/Aromático" en los sujetos acostumbrados y no acostumbrados	169
Figura 6.6 Resultados promedio (valores z) para la emoción "Dulce/Amargo" en los sujetos acostumbrados y no acostumbrados	170
Figura 6.7 Resultados promedio (valores z) para la emoción "Rancio/Fresco" en los sujetos acostumbrados y no acostumbrados	172
Figura 6.8 Resultados promedio (valores z) para la emoción "No saludable/Saludable" en los sujetos acostumbrados y no acostumbrados	173
Figura 6.9 Resultados promedio (valores z) para la emoción "No gusta/Gusta" en los sujetos acostumbrados y no acostumbrados	175
Figura 6.10 Resultados promedio (valores z) para la emoción "Artificial/Natural" en los sujetos acostumbrados y no acostumbrados	176
Figura 6.11 Resultados promedio (valores z) para la emoción "No picante/Picante" en los sujetos acostumbrados y no acostumbrados	177
Figura 6.12 Resultados promedio (valores z) para la emoción "Suave/Áspero" en los sujetos acostumbrados y no acostumbrados	178
Figura 6.13 Resultados promedio (valores z) para la emoción "Insípido/Sabroso" en los sujetos acostumbrados y no acostumbrados	179

ÍNDICE DE IMÁGENES

	Página
Imagen 2.1 Imágenes de las microalgas <i>Spirulina</i> y <i>Chlorella</i>	6
Imagen 2.2 Diferentes fotobiorreactores utilizados para el cultivo de microalgas	11
Imagen 2.3 Matraces de mantenimiento y precultivo de la microalga	23
Imagen 2.4 Fotobiorreactores tubulares empleados para la producción de biomasa de la microalga <i>Scenedesmus almeriensis</i>	24
Imagen 2.5 Imagen de la biomasa liofilizada de <i>Scenedesmus almeriensis</i>	25
Imagen 2.6 Cambios que provoca la degeneración macular senil (DMAE) en la retina y sus correspondientes consecuencias en la visión humana.....	37
Imagen 2.7 Algunos productos comerciales basados en luteína.	38
Imagen 2.8 Flor de Marigold o caléndula (<i>Tagetes erecta</i>).....	40
Imagen 3.1 Imágenes de <i>S. almeriensis</i> tomadas mediante microscopio óptico y electrónico.	85
Imagen 3.2 Algunos de los AOVE´s empleados en las experiencias de enriquecimiento en antioxidantes: G, B, H y E	87
Imagen 3.3 Esquema global para la obtención del extracto de antioxidantes	88
Imagen 3.4 Extracto de antioxidantes (2,3 mg/ml de luteína) en AOVE tras la eliminación de disolvente en rotavapor	88
Imagen 5.1 Muestras de aceites irradiadas en la cabina de control de iluminación CAC 60 Verivide y detalle de la fuente de luz ultravioleta de dicha cabina.....	129
Imagen 5.2 Muestras de AOVE´s sometidas a 120 °C en un baño termostático y detalle del termostato.....	130
Imagen 6.1 Detalle de una de las botellas utilizadas para el experimento de emociones suscitadas por el color de los AOVE´s	153

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 2.1 Superficie de terreno necesaria para producir 1 kg de proteína	8
Tabla 2.2 Agua necesaria para producir 1 kg de proteína	9
Tabla 2.3 Comparación de la composición de alimentos y microalgas	14
Tabla 2.4 Aminoácidos esenciales del huevo entero, caseína y algunas especies de microalgas. (Valores en g por 100 g de proteína)	15
Tabla 2.5 Composición del medio Mann & Myers (1968).....	23
Tabla 2.6 Distribución de carotenoides mayoritarios presentes en diversos alimentos.....	27
Tabla 2.7 Contenido en luteína de algunas microalgas a nivel de laboratorio y escala semi- industrial	41
Tabla 2.8 Composición de la microalga <i>Scenedesmus almeriensis</i>	42
Tabla 2.9 Composición del aceite de oliva virgen	44
Tabla 3.1 AOVE´s utilizados en las experiencias de enriquecimiento con extracto de antioxidantes procedente de la microalga <i>S. almeriensis</i>	86
Tabla 3.2 Parámetros colorimétricos en la adición de extracto de antioxidantes sobre el AOVE “Santuario de Mágina”	95
Tabla 3.3 Parámetros colorimétricos en la adición de extracto de antioxidantes sobre el AOVE “Hojiblanca”.	99
Tabla 3.4 Parámetros colorimétricos en la adición de extracto de antioxidantes sobre el AOVE “Carbonell”	99
Tabla 3.5 Parámetros colorimétricos en la adición de extracto de antioxidantes sobre el AOVE “Melgarejo”	100

Tabla 3.6 Parámetros colorimétricos de los AOVE´s originales y enriquecidos con luteína (0,1 mg/ml).....	102
Tabla 4.1 Parámetros de calidad, valor de <i>p</i> -anisidina, índice de TOTOX, y parámetros de color (<i>a</i> * <i>b</i> * y <i>L</i> *) de los AOVE´s sin (I) y con extracto de <i>S. almeriensis</i>	124
Tabla 4.2 Composición detallada de ácidos grasos expresada en (g/100 g de ácidos grasos) de los AOVE´s sin (I) y con extracto de <i>S. almeriensis</i>	125
Tabla 4.3 Composición de tocoferoles expresada en (mg/kg de aceite de oliva) de AOVE´s sin (I) y con extracto de <i>S. almeriensis</i>	126
Tabla 6.1 Coordenadas de color CIELAB (fuente D65, observador patrón CIE 1964) correspondientes a los seis AOVE´s originales (A) y sus dos adiciones de extracto de antioxidantes para obtener concentraciones de 0,05 mg/ml (B) y 0,1 mg/ml (C).....	155
Tabla 6.2 Desviaciones típicas de las coordenadas CIELAB correspondientes a las tres medidas espectrorradiométricas de color realizadas para cada muestra, cuyos resultados promedio aparecen en la Tabla 6.1.....	156
Tabla 6.3 Cambios de color entre aceites puros (A), y con adiciones de extracto para lograr concentraciones de luteína de 0,05 mg/ml (B) y 0,1 mg/ml (C), en unidades CIEDE2000 (ΔE_{00}) y CIELAB (ΔE^*_{ab}).....	160
Tabla 6.4 Resultados de variabilidad inter-observador e intra-observador para las 9 emociones consideradas y los dos grupos de observadores participantes en nuestro experimento	164
Tabla 6.5 Valores (Bi) para cada emoción en sujetos con tradición en el uso de AOVE´s y sin ella	165
Tabla 6.6 Coeficientes de correlación de Pearson (r) obtenidos mediante los valores z para cada emoción y grupo de sujetos	167

ABREVIATURAS

AIC: Asociación Internacional del Color

AMD: Age Macular Degeneration

ANOVA: Analysis of Variance

AOVE: Aceite de oliva virgen extra

CCA: Aceite de oliva virgen extra “Castillo de Canena” de la variedad Arbequina

CCF: Aceite de oliva virgen extra “Castillo de Canena” de la variedad Frantoio

CCP: Aceite de oliva virgen extra “Castillo de Canena” de la variedad Picual

CCR: Aceite de oliva virgen extra “Castillo de Canena” de la variedad Royal

CDC: Center for Disease Control and Prevention

CE: Color Emotion

CEE: Comunidad Económica Europea

CIE: Commission Internationale de l'Éclairage

CIELAB: Espacio de color $L^*a^*b^*$

COI: Comité Oleícola Internacional

CSIC: Consejo Superior de Investigaciones Científicas

DMAE: Degeneración Macular Asociada a la Edad

DOP: Denominación de Origen Protegida

EFA: Essential Fatty Acids

e.g: exempli gratia (for example, for instance), por ejemplo

EUFIC: European Food Information Council

EVOO: Extra Virgin Olive Oil

FA: Free Acidity

FAO: Food and Agriculture Organization

FR: Aceite de oliva virgen extra: Fuenroble

HDL: High Density Lipoproteins

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

IM: Índice de Madurez

LDA: Linear Discriminant Analysis

LDL: Low Density Lipoproteins

MUFA: Monounsaturated fatty acids

OB: Aceite de oliva virgen extra: Oro Bailén

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development

OG: Aceite de oliva virgen extra: Oro de Génave

p-AV: Para-anisidina

PC: Principal Component

PCA: Principal Component Analysis

PUFA: Polyunsaturated Fatty Acids

PV: Peroxide Value

RMSE: Root-mean-square error (error cuadrático medio)

SCOTDIC: Textile Color System

SFA: Saturated Fatty Acids

T: Tonelada métrica

UV: Ultravioleta

VIH: Virus Inmunodeficiencia Humana

YI: Yellowness index



1. INTRODUCCIÓN. JUSTIFICACIÓN

1.-INTRODUCCIÓN. JUSTIFICACIÓN

Actualmente existe un interés creciente en el desarrollo de alimentos funcionales, que son aquellos capaces de proporcionar efectos beneficiosos para la salud, adicionalmente a su valor nutritivo o energético. Estos productos, son usualmente alimentos tradicionales enriquecidos en uno o varios componentes, que ejercen o promueven un efecto beneficioso para la salud humana.

El interés por los carotenoides ha crecido recientemente en base a estudios que sugieren el efecto protector que resulta de una ingesta adecuada de estos compuestos en la prevención y evolución de enfermedades degenerativas humanas, entre las que destacan las de tipo oftalmológico y dermatológico. En la actualidad no existen fármacos que puedan corregir estas enfermedades, por lo que la única estrategia viable es la prevención de las mismas. Sin embargo, la dosis de carotenoides recomendada para grupos de riesgo, difícilmente puede ser cubierta por modificaciones en la dieta. Por este motivo una de las vías de prevención con mejores perspectivas, es la ingesta de alimentos enriquecidos en antioxidantes.

Por otro lado, es bien conocido que el aceite de oliva posee, debido a su composición química, importantes propiedades que lo hacen un alimento muy saludable y recomendado, presentando además un alto factor de digestibilidad, parámetro muy importante en alimentación. Son muchos los trabajos científicos que avalan la importancia de su incorporación en una dieta equilibrada, mostrando efectos muy beneficiosos para la salud, entre los que se pueden citar: reducción del nivel del colesterol; disminución del riesgo de infarto y de trombosis arteriales; eficacia en la lucha contra úlceras, gastritis y acidez en general; regulación del tránsito intestinal y estimulación del crecimiento óseo y prevención de muchas enfermedades degenerativas humanas.

El aceite de oliva virgen extra es un alimento muy equilibrado que está constituido por una gran variedad de moléculas: compuestos hidrocarbonados, esteroides, compuestos diterpénicos y triterpénicos, alcoholes alifáticos, tocoferoles, pigmentos, clorofilas y carotenoides.

Dentro de la familia de los carotenoides, la luteína y el β -caroteno, se encuentran en cantidades muy pequeñas en el aceite de oliva en su composición original, estando por debajo de los valores recomendados para la prevención de enfermedades



degenerativas humanas (por ejemplo, la Degeneración Macular Senil, DMAE). Sin embargo, es importante resaltar que por sus características y por contener pequeñas cantidades de estos carotenoides, el aceite de oliva podría constituir un medio adecuado de transporte de éstos, pues aumentar la concentración de componentes previamente existentes, no debe generar problemas de estabilidad severos, hecho que sí podría ocurrir al tratar de añadir compuestos químicos totalmente ajenos al medio receptor.

En el estado actual de las investigaciones sobre el papel de antioxidantes como la luteína en la prevención de la DMAE, una de las principales preocupaciones es determinar en qué medida es digerida y adsorbida la luteína suministrada por las diferentes fuentes dietarias (estudios de digestibilidad-bioaccesibilidad). Esta preocupación se extiende a los extractos comerciales que actualmente se usan en los complementos nutricionales que contienen luteína. En este sentido, sólo productos de digestibilidad conocida y adecuada son útiles como aporte de luteína en la dieta humana. Más aún, únicamente productos de digestibilidad conocida serán útiles en futuros estudios del papel de la luteína en la prevención de enfermedades como las oculares. Así, existen trabajos que describen estudios realizados in vitro, en los que se pone de manifiesto que las matrices alimenticias ricas en grasas, como son el aceite de oliva y otras similares, pueden facilitar y/o beneficiar el proceso de bioasimilación de este tipo de carotenoides (Rangaswamy et al., 2007; Granado et al., 2009, 2010; Nidhi y Baskaran, 2011). También hay estudios de degradación térmica de carotenoides en aceites de oliva y similares, que pueden afectar a las propiedades físico-químicas y de coloración de los aceites y por tanto a su apariencia y aceptabilidad por el consumidor (Aparicio et al., 2011). En una patente previa, se ha propuesto la incorporación al aceite de oliva de diferentes carotenoides mediante el uso de la flor de Marigold (European Patent, 2006).

En este contexto, la presente Memoria de Tesis Doctoral tiene por objetivo principal la obtención de nuevos alimentos funcionales basados en aceites de oliva vírgenes extra, enriquecidos con antioxidantes procedentes de microalgas marinas, para la prevención de enfermedades degenerativas asociadas al déficit de antioxidantes.

Así, se ha puesto a punto la metodología necesaria para la obtención de extractos de carotenoides procedentes de la microalga marina *Scenedesmus almeriensis* (especie rica en luteína y β -caroteno), que han sido utilizados para enriquecer con carotenoides diferentes tipos de AOVE's. Estos aceites constituyen un potencial medio para la incorporación de carotenoides en las dosis adecuadas al organismo humano, a través de un alimento tan importante y característico de la dieta mediterránea.



Por tanto, se persigue dotar a los aceites de un valor añadido superior al que ya de por sí tienen y se ha comprobado que el enriquecimiento con antioxidantes, mejora las características de estabilidad de los aceites frente a variables típicas de degradación en los alimentos, como son la exposición a la luz, la temperatura y el paso del tiempo.

Los aceites de oliva vírgenes extra enriquecidos con carotenoides, se han caracterizado físico-químicamente, para conocer todos sus parámetros y así poder evaluar el efecto de la mejora de la fracción antioxidante en los mismos. Inicialmente se ha evaluado la concentración de carotenoides más idónea a alcanzar en los aceites ensayados realizando diferentes experimentos en los que se ha ido aumentando progresivamente la cantidad de extracto de antioxidantes adicionado.

Posteriormente, los aceites enriquecidos en los nuevos antioxidantes han sido sometidos a diferentes caracterizaciones de tipo físico-químico para compararlos con los mismos aceites sin enriquecer, los cuales han sido usados como control. Así, se ha realizado un completo análisis de parámetros químicos: referentes a la calidad de los aceites (acidez libre, compuestos de oxidación primaria y secundaria, índice de peróxidos, K_{232} , K_{270} , *p*-anisidina,...), referentes a la propia composición (perfil de ácidos grasos, tocoferoles, pigmentos,...) y parámetros referentes a la bioactividad (compuestos fenólicos totales, DPPH y ABTS). En lo que se refiere a estudios de tipo físico, se han realizado monitorizaciones midiendo el color de aceites, que han permitido obtener información sobre la estabilidad de las muestras frente a las principales variables de degradación comentadas: el tiempo, la temperatura y la exposición a la luz. Adicionalmente, se ha estudiado la estabilidad de los aceites enriquecidos en función del índice de maduración del fruto y de la variedad del mismo.

Otra parte de esta Memoria se ha dedicado a los estudios de emociones suscitadas por el color de las muestras y los cambios de color que sufren los aceites cuando son enriquecidos con antioxidantes. Así, se pretende conocer si estos cambios de color son aceptados y en qué medida, por los potenciales consumidores, aspecto muy importante si se quiere abordar el desarrollo industrial de la idea de negocio fundamentada en la obtención y comercialización de estos nuevos alimentos funcionales basados en aceites de oliva.

Estos resultados, apoyan la idea de poder utilizar el aceite de oliva virgen extra como medio de incorporación en el organismo de las cantidades necesarias de



carotenoides, dotando al aceite de oliva de un valor añadido superior al que ya tiene de por sí y ofrecer una alternativa diferente a las actuales, en la lucha contra determinadas enfermedades degenerativas humanas.

Finalmente, es importante resaltar la aplicabilidad de los resultados obtenidos, la cual produciría una línea de aceites de oliva enriquecidos con nuevos antioxidantes que vendría a sumar, tanto en estrategias de lucha contra enfermedades degenerativas humanas, así como en el desarrollo del tejido industrial y social de nuestro entorno.





2. ANTECEDENTES

En este capítulo se va a realizar un resumen del estado del arte en los principales temas que se han trabajado durante la elaboración de esta Tesis Doctoral. Así, en cada apartado se realizará una breve introducción y se notarán las investigaciones precedentes que se han tenido en cuenta a la hora de dirigir el curso de la investigación realizada.

2.1.- LAS MICROALGAS COMO FUENTE DE PRODUCTOS DE ALTO VALOR

Las microalgas son microorganismos unicelulares fotoautótrofos, capaces de obtener energía de la radiación luminosa y de sintetizar sus biomoléculas a partir de dióxido de carbono y agua. Han colonizado casi todos los hábitats conocidos, aunque la mayor parte se han adaptado mejor al ambiente acuático, tanto marino como dulceacuícola. Así, los mares y los océanos contienen grandes cantidades de microalgas, estimándose que el 40% de la fotosíntesis total del planeta es realizada por estos microorganismos acuáticos, siendo claves en la dinámica del dióxido de carbono en la tierra y constituyendo la base de las cadenas tróficas (Muller y Tobin, 1986). En la actualidad representan un recurso poco explorado, ya que, de las más de 30.000 especies descritas, solo unas 50 han sido estudiadas con detalle desde el punto de vista fisiológico y bioquímico, y menos de 10 están siendo explotadas comercialmente.

Los primeros estudios científicos sobre el cultivo de microalgas datan de 1890, cuando el microbiólogo holandés Beijerinck establece cultivos puros de la microalga de agua dulce *Chlorella vulgaris*. El primer trabajo sistemático sobre estos microorganismos, en el que se trasladaban métodos y datos de laboratorio a especificaciones ingenieriles, se realizó en la Universidad de Standford (California, 1948-1950) utilizando *Chlorella* como especie de cultivo. En esta misma época ya surgen en Alemania las primeras plantas de producción comercial de microalgas, en las que se producían diatomeas bajo condiciones controladas (Harder y Von Witsch, 1942). Sin embargo, la producción comercial a gran escala comenzó a principios de los sesenta cuando se comercializó *Chlorella* como alimento dietético en Japón y Taiwán (Tsukada et al., 1997).

Paralelamente al establecimiento de los primeros procesos industriales de producción de *Chlorella*, otras microalgas eran también cultivadas a gran escala en diversas partes del mundo, como es el caso de *Spirulina* en el lago Texcoco (México), cuya producción era llevada a cabo por Sos Texcoco S.A. (Durand-Chastel, 1980). Desde entonces han surgido numerosas empresas de producción de microalgas llegando

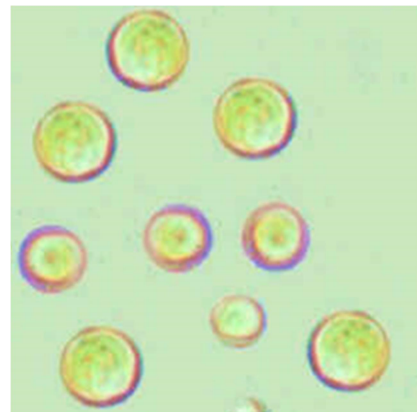


actualmente a una producción de más de 10.000 T, principalmente de *Spirulina* y *Chlorella* (Imagen 2.1), pero también de otras especies como *Dunaliella*, *Haematococcus* y *Nannochloropsis*, entre otras (Spolaore, 2006).

Las microalgas pueden cultivarse en reactores a gran escala bajo condiciones controladas, y su elevada velocidad de crecimiento permite obtener grandes productividades (Pulz y Scheibenbogen, 1998). El carbono fijado por las microalgas es incorporado a proteínas, carbohidratos y lípidos, de forma que a partir de la biomasa microalgal se puede obtener una gran diversidad de productos químicos (Kishimoto et al., 1994; Yanagi et al., 1995). Debido a estas razones, los procesos basados en el uso de microalgas están recibiendo un interés creciente y hoy en día se siguen investigando. Uno de los aspectos más interesantes en el campo de la biotecnología de microalgas es la explotación de la capacidad de las microalgas para generar biomasa constituida por biomoléculas complejas como vitaminas, enzimas y sustancias bioactivas de elevado valor comercial (Arad y Yaron, 1992; Apt y Behrens, 1999; Shimizu, 2000; Shi et al., 2002). Además, muchas de las moléculas que generan son específicas y no pueden ser sintetizadas por otros organismos o plantas superiores (Richmond, 1990; Bajpai y Bajpai, 1993; De la Noue y De Pauw, 1998).



Spirulina



Chlorella

Imagen 2.1

Imágenes de las microalgas *Spirulina* y *Chlorella*.

Derivado de esta composición tan rica de las microalgas, sus principales aplicaciones se centran en la alimentación humana, nutrición animal, y la obtención de compuestos de interés como carotenoides, ácidos grasos, etc. El consumo de microalgas como alimento humano se ha practicado desde antiguo, y se encuentra extendido por todo el mundo. Se tiene constancia del consumo de un tipo de algas verde-azuladas del

género *Nostoc* (*Nostoc pruriforme* y *Nostoc comune*) desde las primeras civilizaciones aztecas en Sudamérica. Los antiguos nativos del lago salado de Chad (África central) utilizaron la microalga *Spirulina* de forma regular en su alimentación. Este consumo se ha dado principalmente en especies resistentes a condiciones ambientales extremas, lo que permitía la proliferación de elevadas concentraciones en zonas geográficas determinadas, como la acumulación de *Spirulina* en el lago Chad (África) o en Maracaibo (Venezuela). Hoy día, las microalgas más extensamente cultivadas para fines alimenticios son especies de *Spirulina* y *Chlorella*. La microalga *Spirulina* se vende como alimento dietético o funcional, y se ha utilizado como alimento de alto valor proteico en México y África central. Los mayores productores de *Spirulina* para consumo humano son China, Taiwán, Estados Unidos, Tailandia, Japón e Israel. La microalga *Chlorella* se comercializa como preparado multivitamínico en Japón y Taiwán, y como alimento dietético en otros países occidentales.

En cuanto a la nutrición animal, las microalgas son una importante fuente alimenticia y de aditivos en la cría comercial de muchas especies acuáticas, especialmente de larvas y rotíferos. Estos últimos son empleados en la crianza de crustáceos y peces, aunque existen otras alternativas a las algas como las levaduras y los alimentos microencapsulados (Jones et al., 1987; Heras et al., 1994; Nell et al., 1996). El cultivo de microalgas para este fin es una industria de alto valor y con un importante tamaño de mercado. Las microalgas no son solamente consideradas como fuentes esenciales de alimentación en acuicultura sino que también juegan un papel importante en el incremento de la calidad de las especies animales cultivadas. El contenido en aminoácidos, ácidos grasos, así como otras biomoléculas, influye de forma determinante en el desarrollo de larvas y bivalvos (Fujimura et al., 1972; Cohen et al., 1976; Malecha, 1983). Hoy en día existen más de 40 especies diferentes utilizadas en acuicultura, seleccionadas según su aporte nutricional y la facilidad de su producción masiva.

Respecto a la producción de compuestos de alto valor, las microalgas se caracterizan por tener una composición bioquímica compleja, rica en sustancias de protección frente a factores ambientales adversos, lo que las hace especialmente interesantes para la producción de este tipo de compuestos. Actualmente existe un amplio abanico de productos de interés que se obtienen comercialmente de microalgas, como es el caso de ficobiliproteínas, carotenoides, ácidos grasos poliinsaturados y polisacáridos, empleando para ello especies como *Spirulina*, *Dunaliella*, *Porphyridium*, *Chlorella*, *Scenedesmus*, *Muriellopsis* o *Haematococcus*.



2.1.1.- LAS MICROALGAS FRENTE A CULTIVOS CONVENCIONALES

Las microalgas, constituyen un grupo de microorganismos fotosintéticos extraordinariamente eficientes en lo que se refiere a la conversión de energía luminosa en energía química almacenada. Así, son más eficientes que las plantas oleaginosas en la captura de la energía solar, pudiendo llegar a alcanzar rendimientos fotosintéticos muy altos (hasta el 5%) con una organización celular más simple.

La producción de biomasa a partir de microalgas es notablemente superior a la de los cultivos agrícolas convencionales, del orden de 50 a 200 toneladas (peso seco) por hectárea y año. Los requerimientos para su crecimiento como luz, azúcares, dióxido de carbono, nitrógeno, fósforo y potasio son bajos y tienen alta capacidad para producir sustancias como lípidos, proteínas y carbohidratos en grandes cantidades y en cortos periodos de tiempo (Brennan y Owende, 2010).

Por otro lado, los cortos tiempos de generación permiten un rápido crecimiento y la rápida recuperación del cultivo en caso de que se produzca algún contratiempo o invasión del zooplancton, precisando su cultivo de una superficie muy pequeña en comparación con otros como la soja, maíz, etc. (Tabla 2.1).

Tabla 2.1

Superficie de terreno necesaria para producir 1 kg de proteína (Henrikson, 1994).

Cultivo	Superficie (m ²)	Calidad del Terreno
Alga <i>Spirulina</i> (65% proteína)	0,5	Estéril
Soja (34% proteína)	16	Fértil
Maíz (9% proteína)	22	Fértil
Buey alimentado con grano (20% proteína)	193	Fértil



Por otra parte, las microalgas presentan la posibilidad de crecer en aguas salobres o marinas (Verma et al., 2010), e incluso con residuos orgánicos, pudiéndose así aprovechar aguas no aptas para la agricultura tradicional ya que el consumo de nutrientes que necesitan es pequeño en comparación al gran aporte que de ellos precisa dicha agricultura (como ejemplo, el cultivo de microalgas necesita una cantidad de agua cinco veces menor que los tradicionales cultivos de alfalfa y maíz) (Tabla 2.2).

Tabla 2.2
Agua necesaria para producir 1 kg de proteína (Henrikson, 1994).

Cultivo	Litros	Calidad del agua
Alga <i>Spirulina</i> (65% proteína)	2.498	Salobre
Soja (34% proteína)	8.860	Dulce
Maíz (9% proteína)	12.416	Dulce
Buey alimentado con grano (20% proteína)	104.000	Dulce

El cultivo comercial de microalgas a gran escala comenzó al inicio de la década de los 60 en Japón con el cultivo de *Chlorella*, seguido por el establecimiento de mejoras en el cultivo y cosecha de *Arthrospira* en el lago Texcoco a principios de los 70. En 1980 ya había en Asia 46 fábricas de producción a gran escala, capaces de producir 1000 kg de microalgas (principalmente *Chlorella*) por mes. En 1986, la producción comercial de *Dunaliella salina* como fuente de β -caroteno, por las empresas Western Biotechnology (Hutt Lagoon, Australia) y Betatene (Whyalla, Australia), llegó a ser la tercera industria microalgal más importante. Poco después se establecieron plantas en Israel y EE.UU., a la vez que en India comenzó la producción a gran escala de cianobacterias (Spolaore et al., 2006).

La biodiversidad de microalgas es enorme, existiendo actualmente miles de especies distintas. Esa gran diversidad y consecuente variabilidad en la composición bioquímica de la biomasa obtenida de cultivos de microalgas, unida a la mejora genética y al establecimiento de tecnología de producción masiva que se han producido en los



últimos 30 años, han permitido cultivar comercialmente varias especies, siendo la producción actual de biomasa microalgal de 5.000 T (peso seco). En este sentido, el objetivo del cultivo de microalgas no es sólo la elaboración de alimentos, sino también la obtención de compuestos naturales con alto valor biotecnológico en el mercado: ácidos grasos poliinsaturados, carotenoides, ficobiliproteínas, polisacáridos, vitaminas, esteroides, antioxidantes, compuestos reductores de colesterol, etc., (Olaizola, 2003; Derner et al., 2006; Cadoret y Bernard, 2008).

Con fines comerciales, las microalgas se cultivan en sistemas abiertos o en fotobiorreactores cerrados. Los sistemas abiertos presentan problemas de contaminación de cultivos y dificultad de control de las variables de funcionamiento y por estas razones la producción masiva de microalgas se lleva a cabo en fotobiorreactores cerrados que operan en condiciones controladas, con el fin de obtener productividades elevadas y una biomasa más uniforme en su composición y ritmo de producción (Imagen 2.2.). En los últimos años se han producido avances significativos en el desarrollo y diseño de fotobiorreactores cerrados, consiguiéndose sistemas más baratos, productivos y estables. Hoy en día, debido a la mejora en los diseños con la introducción de nuevos materiales y al abaratamiento de las materias primas, existen en operación reactores cerrados de gran capacidad, con elevadas productividades de hasta $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{día}^{-1}$ (Acién et al., 1998; Pulz, 2001; Verma et al., 2010).

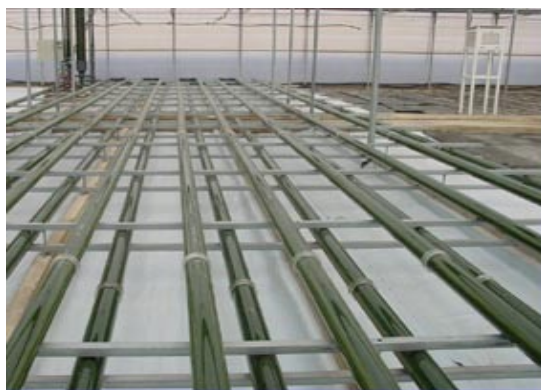




a)



b)



c)

Imagen 2.2

Diferentes fotobiorreactores utilizados para el cultivo de microalgas:
a) Fotobiorreactor tubular en columna de burbujeo; b) Fotobiorreactor vertical plano;
c) Fotobiorreactor tubular horizontal. (Gentileza Dpto. Ingeniería Química, Universidad de Almería).

2.1.2.- APLICACIONES

Durante siglos se han aprovechado limitadamente las ventajas de las poblaciones naturales de microalgas. Sólo recientemente (segunda mitad del siglo XX), se ha intensificado su estudio científico y se ha llegado a desarrollar parcialmente el potencial de la biotecnología microalgal, introduciéndose nuevos procesos y obteniéndose una gran variedad de productos de alto valor.

Hoy en día una de las principales áreas de investigación en ciencia y tecnología de la alimentación, es la extracción y caracterización de nuevos productos naturales con actividad biológica, por ejemplo antioxidantes, antivirales, antihipertensivos, etc., que pueden contribuir al bienestar de los consumidores como parte de nuevos alimentos funcionales o nutraceúticos (Ruiz, 2012).

En este sentido, el gran potencial de la biotecnología de microalgas se extiende a la producción de una serie enorme de productos, entre los que se incluyen alimentos saludables, productos químicos industriales y compuestos con aplicaciones terapéuticas, aunque para la mayoría de esas aplicaciones el mercado está todavía en desarrollo y el uso biotecnológico de microalgas se extenderá probablemente a nuevas áreas (Olaizola, 2003; Mendiola et al., 2008; Raja et al., 2008).

Como ejemplo, cabe destacar a las cianobacterias o algas verde-azuladas, que son organismos procariotas fotosintéticos y se han venido utilizando como alimento para humanos en determinadas regiones del planeta. Así, son reconocidas como fuente de vitaminas y proteínas y como tal se distribuyen como comida saludable en todo el mundo. También es conocido que son fuente de compuestos para química fina, combustibles renovables y compuestos bioactivos que poseen propiedades antivirales, antitumorales, antibacteriales y como aditivos alimentarios (Singh et al., 2005).

Utilización en alimentación

El primer uso conocido de microalgas data de hace unos 2000 años, cuando en China se empleaba la especie *Nostoc* para combatir la hambruna (Spolaore et al., 2006). El alga verde-azulada *Spirulina*, que crece espontáneamente en los lagos de Chad (África central) y Texcoco (México) entre otros, se recolecta desde tiempo inmemorial para su consumo, después de secada al sol y mezclada con granos de cereales, por los pueblos Kanenbou y Azteca. También existen referencias del consumo humano de algas verde-azuladas fijadoras de nitrógeno (como *Aphanizomenon*) en otros países como Chile, Perú y Filipinas.

Las microalgas poseen excelentes cualidades para ser empleadas en la alimentación animal así como en la humana. La calidad de la biomasa de microalgas viene dada por la ausencia de tejidos y órganos no aprovechables, así como por el bajo contenido en materiales estructurales. Algunas especies no tienen celulosa dura en la pared celular, lo que facilita la digestión y asimilación de las proteínas por el organismo humano, y contienen cantidades favorables de ácidos grasos insaturados, muy poco colesterol y una cantidad moderada de carbohidratos, factores que reducen las afecciones coronarias y la obesidad, objetivos importantes en la sociedad actual (Durand-Chastel, 1980).

Por otro lado, algunas especies de microalgas poseen un alto contenido en proteínas (pudiendo alcanzar valores de proteína bruta del orden del 50 al 70% del peso seco), carbohidratos y lípidos. Así, poseen porcentajes comparables e incluso superiores a los de otras fuentes tradicionales de proteínas (Tabla 2.3).

Las proteínas de microalgas presentan un aminograma bastante equilibrado, similar al de la harina de soja o de pescado, así como al estándar de la FAO, siendo únicamente algo deficientes en aminoácidos azufrados (Tabla 2.4). Los estudios de digestibilidad llevados a cabo con distintas especies de microalgas en diversos grupos de animales (peces, moluscos, aves, rumiantes, etc.), han arrojado resultados satisfactorios.



Tabla 2.3
Comparación de la composición de alimentos y microalgas (% peso seco)
(Spolaore et al., 2006; Bruton et al., 2009).

MATERIA	PROTEÍNAS	CARBOHIDRATOS	LÍPIDOS
Levadura	39	38	1
Carne	43	1	34
Leche	26	38	28
Arroz	8	77	2
Soja	37	30	20
Alga <i>Anabaena cilíndrica</i>	43-56	25-30	4-7
Alga <i>Chlamidonomas rheinhardii</i>	48	17	21
Alga <i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
Alga <i>Chlorella pirenoidosa</i>	57	26	2
Alga <i>Eugleria gracilis</i>	39-61	14-18	14-20
Alga <i>Tetraselmis maculata</i>	52	15	3
Alga <i>Dunaliella bioculata</i>	49	4	8
Alga <i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
Alga <i>Porphyridium cruentum</i>	28-39	40-57	9-14
Alga <i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
Alga <i>Scenedesmus dimorphus</i>	8-18	21-52	16-40
Alga <i>Spirulina platensis</i>	46-63	8-14	4-9
Alga <i>Spirulina máxima</i>	60-71	13-16	6-7
Alga <i>Synechococcus sp.</i>	63	15	11



Tabla 2.4

Aminoácidos esenciales del huevo entero, caseína y algunas especies de microalgas. (Valores en g por 100 g de proteína). a) Durand-Chastel, 1980; b) Barbarino y Lourenco, 2005.

Aminoácidos	Huevo entero (a)	Caseína (a)	<i>Spirulina Máxima</i> (a)	<i>Chlorella Pyrenoidosa</i> (a)	<i>Porphyra Acanthophora</i> (b)	<i>Pterocladia capillacea</i> (b)
Isoleucina	6,6	9,7	5,8	3,4	4,1	3,7
Leucina	8,8	9,7	8,3	6,0	8,1	6,8
Lisina	4,6	2,6	4,5	4,5	6,3	7,9
Metionina	3,1	3,6	1,8	2,0	1,1	1,1
Fenilalanina	5,8	3,9	5,2	7,2	4,7	5,3
Treonina	5,1	3,9	4,6	5,2	5,8	5,2
Triptófano	1,6	2,2	1,1	1,1	--	--
Valina	7,3	7,9	6,6	6,2	6,4	5,5

Por otra parte, el contenido en vitaminas y minerales se suma al interés alimenticio de las microalgas. Representan una fuente de casi todas las vitaminas esenciales (A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, E, biotina, ácido fólico y ácido pantoténico (B₅)). Además son ricas en pigmentos como clorofila, carotenoides y ficobiliproteínas (Spolaore et al., 2006). Por ejemplo, la especie *Porphyridium cruentum*, contiene carotenos, vitaminas, hidratos de carbono y elementos tales como sodio, potasio, magnesio, hierro, cobre, zinc, cromo, manganeso y cobalto (Reboloso et al., 2000). La especie *Spirulina platensis* también contiene aminoácidos esenciales, vitaminas, sustancias minerales, ácidos grasos indispensables, polisacáridos, β -caroteno y otros pigmentos (Blinkova et al., 2001).

Actualmente las microalgas para alimentación humana se presentan en el mercado en diferentes formatos comerciales como tabletas, cápsulas y líquidos. También se encuentran incorporadas a pastas, aperitivos, bebidas, golosinas o chicles (Yamaguchi, 1997; Liang et al., 2004).

Aplicaciones clínicas

En cuanto a las aplicaciones clínicas de las microalgas, se han realizado numerosos estudios que demuestran sus beneficios terapéuticos. Así, la especie *Spirulina platensis* se usa como nutraceutico alimenticio por sus beneficios terapéuticos en una serie de afecciones tales como enfermedades cardiovasculares, inflamatorias, hipercolesterol, hiperglucemia, cáncer y enfermedades virales. Los beneficios



cardiovasculares de *Spirulina* son el resultado de sus actividades hipolípicas, antioxidantes y antiinflamatorias (Deng y Chow, 2010). Además, produce efectos inmunoestimulantes aumentando la resistencia de seres humanos, mamíferos, gallinas y pescado a infecciones, estimulando la producción de anticuerpos y contribuyendo a la preservación de la microflora intestinal (Blinkova et al., 2001).

Por otro lado, porciones sulfolípicas presentes en los glucolípidos de algunas algas como *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Anabaena* y *Spirulina*, han demostrado ser efectivas contra el virus del sida (Gustafson, 1989; Blinkova et al., 2001).

Estudios farmacológicos de extractos hidrosolubles de *Chlorella stigmatophora* y *Phaeodactylum tricornutum*, indican que ambas especies muestran actividad antiinflamatoria, analgésica y antirradicales libres (Guzmán et al., 2001). La especie *Arthrospira* aporta varios beneficios a la salud como alivio de la hiperlipidemia, supresión de la hipertensión, protección contra enfermedades renales, promoción del crecimiento del *Lactobacillus* intestinal y supresión de los niveles elevados de glucosa en sangre. Otro ejemplo es la especie *Chlorella*, que se muestra eficaz contra la úlcera gástrica, las heridas y el estreñimiento, previene la arteriosclerosis y el colesterol, reduce los lípidos en sangre y tiene acción antitumoral (Yamaguchi, 1997; Liang et al., 2004; Jong-Yuh y Mei-Fen, 2005).

Alimentación animal

Las microalgas pueden ser utilizadas como alimento para una gran variedad de animales, que van desde peces (acuicultura), hasta mascotas o animales de granja. De hecho, el 30% de la producción mundial de microalgas se vende para alimentación animal (Becker, 2004). Por ejemplo, la especie *Arthrospira* se usa como alimento para muchos tipos de animales como gatos, perros, peces de acuario, pájaros ornamentales, caballos, vacas y crías de toro. Así, aporta vitaminas naturales, minerales y ácidos grasos esenciales, mejorando la respuesta inmunitaria, la fertilidad y el control de peso, así como la apariencia externa a través de una piel saludable (Certik y Shimizu, 1999).

La acuicultura es una de las áreas de mayor crecimiento en el campo de la producción de alimentos en los últimos años. Ésta va aumentando su producción cada día, tanto en cantidad como en variedad de nuevas especies, siendo una parte cada vez más importante respecto al volumen de capturas en el mar.



En este sentido, la demanda actual de pescado es más grande de la que el océano puede aportar, por lo que las predicciones sugieren que la acuicultura puede ser muy necesaria en un futuro inmediato (Arthur, 2009).

La importancia del cultivo de microalgas en acuicultura estriba en la posición basal que éstas ocupan en la pirámide alimenticia. La capacidad que poseen de convertir sales inorgánicas en compuestos orgánicos con la ayuda de la luz (fotosíntesis), las hace imprescindibles en la producción de alimentos (Tamiya, 1957; Starr, 1971). En este sentido y dado que las microalgas son el punto de inicio biológico del flujo de energía a través de las más importantes cadenas alimenticias acuáticas, puede entenderse el hecho de que la obtención y manipulación de estos microorganismos, sea una parte fundamental dentro del diagrama de operaciones acuícolas.

En 1999 la producción de microalgas para acuicultura alcanzó las 1.000 T (62% para moluscos, 21% para camarones y 16% para pescado) como parte de una producción mundial de acuicultura de $43 \cdot 10^6$ T (Muller-Feuga, 2000).

Las microalgas juegan un papel muy importante para el desarrollo de peces, moluscos y crustáceos, al menos durante las fases larvaria y post-larvaria. Su presencia influye también en el contenido de oxígeno y anhídrido carbónico del medio, lo cual afecta de forma directa al crecimiento de la fauna de los ecosistemas acuáticos (Pruder, 1983). Existen varias posibilidades para la utilización de microalgas en la alimentación de las larvas de peces, moluscos y crustáceos, así como de los animales adultos. Lo más usual es la aplicación directa de las microalgas a estos consumidores. En este sentido, se utilizan determinadas especies cultivadas para este fin y que resultan imprescindibles en la dieta de muchos moluscos marinos bivalvos (e.g. ostras y almejas), larvas de algunos crustáceos y gasterópodos (abalone), larvas de gambas (*Penaeus* y *Metapenaeus*), algunos peces (e.g. *Tilapia* y carpas), rotíferos y zoopláncton (Kanazawa et al., 1985; Lavens et al., 1995; Reitan et al., 1997; Knauer y Southgate, 1999).

Aunque para algunos peces y moluscos las algas pueden no ser esenciales, el aporte de las mismas como nutriente aumenta significativamente su supervivencia, debido probablemente a que añaden un factor de crecimiento o producen una acción bactericida en el medio (Cohen et al., 1976; Malecha, 1983). Hoy en día existen más de 40 especies diferentes de microalgas de aplicación práctica en acuicultura, aisladas en diferentes partes del mundo y cuyo tamaño oscila desde unos pocos μm hasta más de 100 μm . Para su uso en acuicultura, las microalgas deben cumplir varios criterios como



facilidad de cultivo, forma y tamaños adecuados, altos valores nutricionales y digestibilidad de sus células para facilitar el acceso a los nutrientes (Brown et al., 1999).

Las microalgas son incluso utilizadas en el refinamiento de la acuicultura, y así, por ejemplo, se utiliza *Haslea ostrearia* para dar color verde-azulado a las agallas y el apéndice móvil de las ostras (técnica francesa), lo que incrementa el valor del producto en un 40% (Muller-Feuga, 2000).

Fuente de productos químicos naturales

Otra importante utilidad de las microalgas es la obtención de productos químicos naturales. Las algas de tamaño macroscópico se cosechan por su contenido en polisacáridos, incluido el agar y el ácido algínico, los cuales se extraen comercialmente a gran escala.

Las microalgas han desarrollado diferentes estrategias para su supervivencia en condiciones extremas de forma que, mediante simulación de estas condiciones en los sistemas de cultivo, el metabolismo celular puede dirigirse hacia la biosíntesis de las sustancias cuya producción se persigue (Gudin y Thepenier, 1986).

Obtención de proteínas

La obtención de proteínas a partir de microalgas fue una de las primeras aplicaciones en desarrollarse dentro de este campo, al igual que se hacía con cultivos de bacterias o levaduras, utilizados desde hace tiempo como fuentes de proteínas de origen unicelular. Hay que considerar que el contenido en proteínas de las microalgas varía en función de la especie y puede llegar a ser superior al 50% de la biomasa seca.

Obtención de vitaminas

Las vitaminas sintetizadas por las microalgas que pueden dar lugar a un aprovechamiento comercial, son principalmente la B₁₂ y la vitamina E (Tocoferol). Sin embargo, son capaces de sintetizar la mayoría de las vitaminas y los contenidos observados de las mismas, son perfectamente comparables a los encontrados en otros microorganismos, como levaduras y bacterias.



Numerosas vitaminas hidrosolubles han sido detectadas en el sobrenadante de los cultivos de microalgas, pudiendo ser excretadas por estos microorganismos de forma activa como resultado de su metabolismo, o bien pasar a formar parte del sobrenadante una vez que la microalga ha muerto y su biomasa se ha desintegrado. En algunas ocasiones, la proporción de vitaminas que son excretadas al medio, puede llegar a ser muy elevada. Por ejemplo, Koptera (1970) señala que la microalga verde-azulada *Anabaena hassali*, excreta hasta el 94% de su contenido en biotina. La microalga *Phaeodactylum tricornutum*, cuenta en su composición bioquímica con determinadas vitaminas, como pueden ser la B₁ y la biotina (ambas segregadas al medio), así como la B₁₂, la cual permanece en el interior celular.

Obtención de pigmentos

Como organismos fotosintéticos, las microalgas contienen pigmentos antena que, bajo ciertas condiciones fisiológicas, pueden acumularse en la célula, alcanzando notables concentraciones. El principal pigmento son las clorofilas, compuestos esenciales en muchos productos diarios. Así, se usan como aditivos en productos cosméticos y farmacéuticos, pero también como biocolorantes en alimentación y tienen propiedades antioxidantes y antimutagénicas (Hosikian et al., 2010).

Además de las clorofilas, los pigmentos más importantes desde el punto de vista económico son las biliproteínas como ficocianinas y ficoeritrinas, así como una gran variedad de carotenoides, de los que existen unos 400 tipos diferentes. Sin embargo, de éstos sólo se explotan comercialmente unos pocos, entre los que se encuentran: β -caroteno, zeaxantina, astaxantina y luteína. Estos pigmentos tienen aplicación en las industrias farmacéutica y alimentaria como colorantes naturales, potenciadores de la pigmentación de aves de corral, en cosmética, como precursores de la vitamina A, etc. (Borowitzka, 1988). El organismo más utilizado para la producción de β -caroteno es la especie *Dunaliella salina* con un 14% de su peso seco (Metting, 1996).

La astaxantina es usada como pigmento en la industria del salmón y se extrae principalmente de la microalga *Haematococcus pluvialis*, donde puede alcanzar contenidos entre 1,5 y 3% de peso seco (Todd Lorenz y Cysewski, 2000). Aunque por su mayor precio no puede competir con su forma sintética, para ciertas aplicaciones como la alimentación de carpas, pollos y bremas rojos se utiliza la astaxantina procedente de microalgas por las exigencias reguladoras y por la preferencia de los consumidores hacia los productos naturales (Cysewski y Todd Lorenz, 2004).



Obtención de polisacáridos

Otros productos obtenidos de las microalgas, que encuentran gran aplicación en la industria, son los polisacáridos. Las especies comercialmente más prometedoras son las algas rojas unicelulares *Porphyridium cruentum* y *Porphyridium aeruginum*, que bajo determinadas condiciones de crecimiento pueden producir cantidades importantes de polisacáridos extracelulares, constituidos por los siguientes monómeros: D-glucosa, D- y L-galactosa, 3-O-metilxilosa, 3- y 4-O-metilgalactosa y ácido D-glucurónico (Richmond, 1990). Su competencia la encuentran en las macroalgas que sintetizan polisacáridos, principalmente alginatos, carragenatos, agarosa, así como en ciertas bacterias y hongos. La particularidad desde el punto de vista químico de los polisacáridos producidos por *Porphyridium* es que están sulfatados, como ocurre con los carragenatos, compuestos de xilosa, glucosa y galactosa. Así, estos compuestos son considerados antiinflamatorios efectivos para uso tópico (Matsui et al., 2003).

Obtención de lípidos

Los lípidos contenidos en las microalgas son fundamentalmente ésteres de la glicerina y ácidos grasos, con un número de átomos de carbono comprendidos entre 12 y 24. Casi todos los ácidos grasos encontrados en los lípidos de las microalgas, están formados por cadenas moleculares lineales, con un número par de átomos de carbono. Los más interesantes comercialmente son los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA's), en general, y los ácidos grasos esenciales (EFA's), en particular. Los EFA's para nutrición humana son los ácidos linoleico, araquidónico, linolénico y eicosapentaenoico. Excepto el linoleico, estos ácidos grasos son poco frecuentes en los animales y plantas superiores, estando presentes en cantidades relativamente grandes en algunas especies de microalgas.

Obtención de isótopos bioquímicos estables

Las microalgas son fuente de compuestos marcadores isotópicos estables. La habilidad para llevar a cabo la fotosíntesis les permite incorporar isótopos estables (^{13}C , ^{15}N y ^2H) de moléculas inorgánicas de bajo coste ($^{13}\text{CO}_2$, $^{15}\text{NO}_3$ y $^2\text{H}_2\text{O}$) a compuestos orgánicos de alto valor como aminoácidos, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. Los isótopos estables se usan para dos fines: la incorporación dentro de proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos para facilitar su determinación estructural a nivel



atómico y para estudios metabólicos a través del incremento de masa de los compuestos etiquetados (Apt y Behrens, 1999; Ación et al., 2003).

Obtención de biocombustibles

Las algas, particularmente las microalgas unicelulares verdes, se vienen proponiendo desde hace tiempo como potenciales fuentes de biofuel (Oswald y Golueke, 1960; Benemann et al., 1977).

En la actualidad existen numerosos proyectos de investigación que utilizan los cultivos de microalgas para la producción de biocombustibles. Así, mediante este tipo de cultivos se obtiene biodiesel, bioetanol, biohidrógeno y biogás (Chisti, 2007; Seefeldt, 2007; Li et al., 2008).

Según las predicciones tecnológicas, la tercera generación de biocombustibles derivará de las microalgas, ya que no presentan algunas de las desventajas de los de primera y segunda generación, como son la necesidad de gran superficie de cultivo y de agua (Costa y De Moraes, 2011). Así, numerosos estudios argumentan que la producción de biofuel a partir de microalgas, particularmente la producción de biodiesel, es económica y medioambientalmente sostenible (Huntley y Redalje, 2007; Chisti, 2008; Brune et al., 2009; Stephen et al., 2010) aunque también existen algunos puntos de vista escépticos sobre su viabilidad (Reijnders, 2008; Walker, 2009; Van Beilen, 2010).

Este tipo de investigaciones han cobrado mucha importancia, ya que, además de producir biocombustibles, suelen tener como objetivo paralelo y complementario, la reducción de problemas ambientales. Así, uno de los problemas ambientales actuales es el progresivo avance y acumulación en la atmósfera de los gases de efecto invernadero, de los cuales el más importante es el CO₂. En este sentido, se están desarrollando los cultivos de microalgas y utilizando el CO₂ procedente de las líneas efluentes industriales, como fuente de gas nutriente (Chang y Yang, 2003; González et al., 2009; Stephen et al., 2010).

Otra aplicación cada vez más utilizada es la eliminación de compuestos químicos contaminantes en aguas residuales mediante el cultivo en las mismas de microalgas, las cuales a través de su metabolismo pueden eliminar distintos elementos como nitrógeno y fósforo (Hoffmann, 1998; Mallick, 2002; Aslan y Kapdan, 2006; Hernández et al., 2006; Hameed, 2007; De-Bashan y Bashan, 2010; Pittman et al., 2011).



Utilización en cosmética

Algunas especies de microalgas son utilizadas en la formulación de ciertos productos para el cuidado de la piel, como, por ejemplo, cremas antiedad, productos refrescantes, antirritantes, regenerantes de la piel y emolientes. Entre ellas destacan *Arthrospira* y *Chlorella* (Stolz y Obermayer, 2005). También se encuentran microalgas en productos para el cuidado del cabello y protectores solares.

Algunas empresas cosméticas han invertido en su propio sistema de producción de microalgas (Spolaore et al., 2006).

2.1.3.- CULTIVO Y PRODUCCIÓN DE *SCENDESMUS ALMERIENSIS*

El alga utilizada en esta Tesis ha sido *Scenedesmus almeriensis*, cultivada en el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería (Sánchez et al., 2008a).

Para el crecimiento y mantenimiento de esta microalga se ha empleado como medio de cultivo el propuesto por Mann & Myers (1968) (Tabla 2.5), modificado para prepararlo empleando fertilizantes agrícolas comerciales en lugar de productos químicos puros. El medio Mann & Myers consta de macronutrientes, cuya adición se realiza por pesada directa de sales y micronutrientes, en los que la baja concentración obliga a preparar una disolución stock concentrada. Para la preparación del medio de cultivo se emplea agua, y una vez añadidas todas las sales, se esteriliza en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

El cultivo de la microalga *Scenedesmus almeriensis* se realiza en fase líquida, en medio de cultivo Mann & Myers, en matraces esféricos de 1 L de capacidad, cerrando la parte superior con algodón hidrofóbico para facilitar el intercambio gaseoso (Imagen 2.3). Este cultivo no dispone de control de pH y se mantiene a una temperatura de 25 °C. El caudal de aireación empleado es de 1 L/min (1 v/v/min) y luz continua de 540 $\mu\text{E}/(\text{m}^2\cdot\text{s})$ que proporcionan dos lámparas Philips TLD W/54. Al tratarse de cultivos discontinuos es necesario renovar los mismos de forma periódica cada cinco o seis días con medio nuevo y estéril. Esta operación se lleva a cabo en una campana de flujo laminar, para evitar la contaminación de los cultivos.

Tabla 2.5
Composición del medio Mann & Myers (1968).

Macronutrientes	Concentración, g·L ⁻¹
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,20
NaNO ₃	1,00
CaCl ₂	0,30
K ₂ HPO ₄	0,10
Micronutrientes	Concentración, g·L ⁻¹
Na ₂ EDTA	0,030000
H ₃ BO ₃	0,006000
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,002000
MnCl ₂	0,001400
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,000330
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0,000007
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,000002

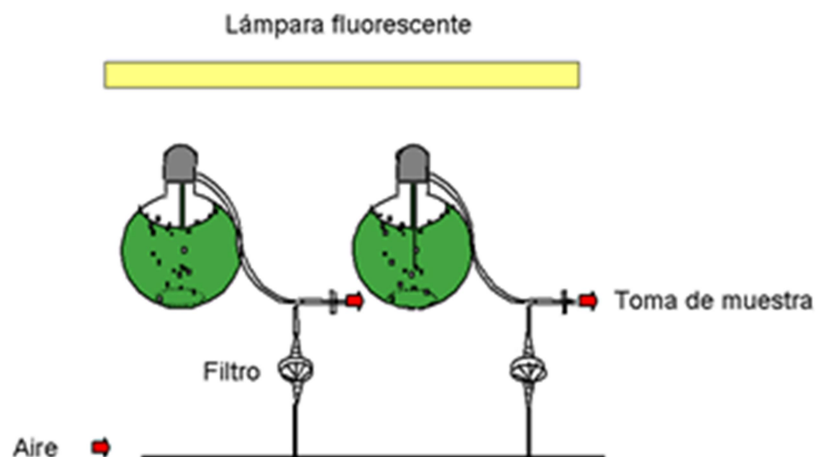


Imagen 2.3
Matraces de mantenimiento y precultivo de la microalga.
(Gentileza Dpto. Ingeniería Química, Universidad de Almería)

Para la producción de biomasa de *Scenedesmus almeriensis* se han empleado fotobiorreactores tubulares tipo valla de 3 m³, disponibles en la Estación Experimental Las Palmerillas (Fundación Cajamar, Almería) (Imagen 2.4). Los reactores constan de un lazo de tubo de metacrilato de 90 mm de diámetro y una longitud de 400 m, a través del cual se recircula el cultivo desde una columna de burbujeo que se emplea para la eliminación de oxígeno, refrigeración, cosechado y aporte de medio. El diámetro de la columna de burbujeo es de 400 mm y en su interior dispone de un cambiador de calor por el que se

hace circular agua fría para mantener la temperatura del cultivo por debajo del valor límite para la microalga. El fotobiorreactor está equipado con los sistemas auxiliares necesarios para su adecuado funcionamiento como bomba centrífuga para la impulsión del cultivo a través del lazo, sistema de inyección de aire para la eliminación de oxígeno, suministro de CO₂ al inicio del lazo, sistema de aporte de solución nutritiva y de cosechado del cultivo, sensores de pH, oxígeno disuelto y temperatura para el seguimiento del estado del cultivo, etc.



Imagen 2.4

Fotobiorreactores tubulares empleados para la producción de biomasa de la microalga *Scenedesmus almeriensis*. (Gentileza Dpto. Ingeniería Química, Universidad de Almería).

Estos reactores se inoculan con cultivo procedente de laboratorio y operan en modo continuo a una velocidad de dilución de 0,3 día⁻¹. Para ello, el medio de cultivo se prepara añadiendo fertilizantes agrícolas a agua de riego y filtrándola mediante ultrafiltración (0,02 micras) antes de entrar a cada uno de los reactores a un caudal de 200 L/min en las horas centrales del día. El volumen de medio de cultivo añadido desplaza fuera del reactor un volumen idéntico que sale a través de una válvula en la parte superior del reactor, a modo de rebosadero. Este cosechado se recoge en un tanque de donde se centrifuga en continuo empleando una centrifuga de cámara y discos a un caudal de 1 m³/h. Se obtiene un agua clarificada que se emplea para riego agrícola, y un concentrado de microalgas con una concentración de 200 g/L. Este concentrado se liofiliza durante 24 h, obteniéndose la biomasa seca (Imagen 2.5), que a continuación se moltura y pasa a la etapa de extracción de antioxidantes o carotenoides.

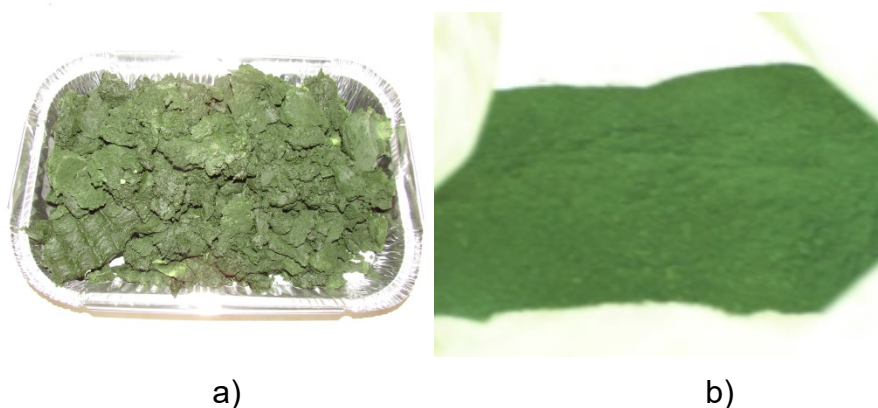


Imagen 2.5

Imagen de la biomasa liofilizada de *Scenedesmus almeriensis*.

- a) Biomasa liofilizada fragmentada en porciones sin triturar.
- b) Biomasa liofilizada y posteriormente molturada en molino de bolas.

Los resultados obtenidos por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería (Acién et al., 2012a) demuestran que es posible la producción a gran escala de *Scenedesmus almeriensis* en fotobiorreactores tubulares de gran volumen. La tecnología desarrollada resulta operativa y el rendimiento del sistema se ajusta a lo predicho por los modelos desarrollados, aunque con diferencias por las variaciones entre los sistemas de cultivo utilizados. Concretamente, existe una planta semi-industrial, compuesta de 10 fotobiorreactores de 3 m³, que ha operado de forma estable durante más de un año con una productividad de biomasa de 7 T·año⁻¹. Este sistema es similar a otro desarrollado en Alemania, que con un volumen total de 700 m³ tiene una capacidad de producción de 130 T·año⁻¹ de *Chlorella* (Pulz, 1998). Ambos sistemas son de los más grandes que existen actualmente para la producción de microalgas basada en tecnología tubular, aunque se están construyendo nuevas plantas, lo que pone de manifiesto la viabilidad técnica y económica alcanzada ya con este tipo de sistemas (Ruiz, 2012).

2.2.- CAROTENOIDES-ANTIOXIDANTES

2.2.1.- GENERALIDADES

Los carotenoides son compuestos tetraterpenoides, formados por ocho unidades de isoprenos y biosintetizados a partir del precursor isopentenil pirofosfato, el cual proviene del ácido mevalónico. La cadena isoprenoide de los carotenoides es obtenida por la unión de cuatro unidades de isopentenil pirofosfato, seguido de la unión de dos unidades de geranyl-geranyl pirofosfato para dar el primer producto de cuarenta átomos de carbono, el fitoeno (Britton y Hornero-Méndez, 1997; Oliver y Palou, 2000). Este compuesto sufre reacciones de deshidrogenación que dan lugar a la formación de licopeno. Así, todos los carotenoides se consideran derivados del licopeno por reacciones de hidrogenación, ciclización, inserción de oxígeno, y migración de dobles enlaces y metilos, entre otras (Delgado-Vargas et al., 2000). Así, su estructura presenta muchos dobles enlaces conjugados y varias ramificaciones con grupos metilo.

Los carotenoides se clasifican principalmente en dos grupos: carotenos y xantófilas. Los carotenos presentan una estructura que solo contiene carbono e hidrógeno; en tanto que las xantófilas, además de poseer carbono e hidrógeno, contienen oxígeno, en forma de grupos sustituyentes como hidroxilo, carbonilo y epóxido. Adicionalmente, existen otros carotenoides de menor tamaño denominados apocarotenoides, obtenidos a partir de rupturas de los tetraterpenoides en los carbonos 6, 9, 6' o 9'; por ejemplo, la crocetina y la bixina (Britton, 1995; Krinsky y Johnson, 2005).

En general, los carotenoides en sus extremos pueden ser lineales o cíclicos; por lo tanto, diferentes combinaciones de estas características estructurales han llevado a detectar más de 600 carotenoides distintos presentes en las plantas (González, 2010).

Entre los carotenoides más comunes se encuentran el β -caroteno, licopeno, cantaxantina, astaxantina, β -criptoxantina, capsantina, zeaxantina y luteína, entre otros. La Tabla 2.6 muestra los principales carotenoides presentes en diferentes alimentos (González, 2010).



Tabla 2.6

Distribución de carotenoides mayoritarios presentes en diversos alimentos (González, 2010).

Alimento	Carotenoides mayoritarios
Aceite (<i>Olea europaea</i>)	Luteína, β -caroteno
Albaricoque (<i>Prunus armeniaca</i>)	β -caroteno
Anacardo (<i>Anacardium occidentale</i>)	β -criptoxantina, β -caroteno
Brócoli (<i>Brassica oleracea</i>)	Luteína, luteína epóxido, neoxantina
Calabaza (<i>Cucurbita moschata</i>)	α - y β -caroteno
Ciruela (<i>Spondias lutea</i>)	β -criptoxantina
Guayaba (<i>Psidium guajava</i>)	Licopeno, β -caroteno
Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>)	β -caroteno, luteína, violaxantina, lactucaxantina
Maíz (<i>Zea mays</i>)	Luteína, zeaxantina
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	Violaxantina, β -caroteno
Melocotón (<i>Prunus pérsica</i>)	β -criptoxantina, luteína
Naranja (<i>Citrus sinensis</i>)	Violaxantina, β -criptoxantina, luteína,
Ortiga (<i>Urtica dioica</i>)	Luteína, β -caroteno
Papaya (<i>Carica papaya</i>)	β -criptoxantina, β -caroteno
Patata (<i>Solanum tuberosum</i>)	Violaxantina, anteraxantina, luteína, lactucaxantina
Pimiento rojo (<i>Capsicum annum</i>)	Capsantina, capsorrubina
Pomelo (<i>Citrus paradisi</i>)	Licopeno, β -caroteno
Tomate (<i>Lycopersicum esculentum</i>)	Licopeno, β -caroteno
Yema de huevo	Luteína
Zanahoria (<i>Daucus carota</i>)	α - y β -caroteno

En general, los carotenoides no se encuentran muy presentes en los animales, ya que estos no son capaces de biosintetizarlos; sin embargo, estos pigmentos son fundamentales en su alimentación, pues son fuente de vitamina A. Existen algunas excepciones, como es el caso de la trucha y algunos crustáceos que deben su color rojizo a la presencia de astaxantina. Los carotenoides son los responsables de los colores amarillos, anaranjados y rojos que presentan los alimentos, los tallos, las flores y hojas de las plantas, las bacterias y algunos animales invertebrados marinos (Goodwin, 1965). En los tejidos verdes se localizan en los cloroplastos, y en los tejidos rojos, anaranjados y amarillos se encuentran en los cromoplastos (Britton y Hornero-Méndez, 1997).



Los carotenoides, junto con las antocianinas y clorofilas, son los pigmentos vegetales de mayor abundancia en la naturaleza. Por su diversidad estructural y numerosas funciones, están involucrados en la fotosíntesis y previenen y protegen la salud de los seres humanos, por su significativa actividad antioxidante. También se ha demostrado que los carotenoides intervienen en la respuesta inmune y en la comunicación celular in vivo, ya que regulan la expresión de algunos genes, como es el caso de los genes que producen el γ -interferón, el cual es responsable de regular las respuestas inflamatorias e inmunes. Solo algunos de los carotenoides presentes en los alimentos son precursores de la vitamina A₁, como es el caso del β -caroteno y otros carotenoides que poseen anillo β no sustituido. Esta vitamina es importante en el proceso de la visión, mantenimiento epitelial, secreción de la mucosa y reproducción (Delgado-Vargas et al., 2000).

Varios estudios epidemiológicos han mostrado una relación entre el alto consumo de frutas y vegetales, y una disminución en el riesgo de contraer enfermedades degenerativas como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y degeneración macular, debido principalmente a la presencia de compuestos carotenoides con actividad antioxidante (Su et al., 2002).

2.2.2.- IMPORTANCIA NUTRICIONAL

Además de la contribución de los carotenoides al color atractivo de las frutas y verduras, destaca, por su importancia a nivel fisiológico y dietético, la propiedad de tener actividad provitamina A (Isler, 1971; Simpson, 1983).

La vitamina A es esencial para la visión nocturna y necesaria para mantener sana la piel. Puede aportarse como tal vitamina, llamada retinol, como algunos análogos menos activos, o como sus precursores, los carotenoides. El retinol es un alcohol cíclico, insaturado, de veinte átomos de carbono, compuesto por un núcleo de β -ionona y una cadena lateral insaturada. En la molécula de retinol (Figura 2.1) existen cinco dobles enlaces conjugados, incluido el doble enlace del anillo de β -ionona que está conjugado con los de la cadena lateral.



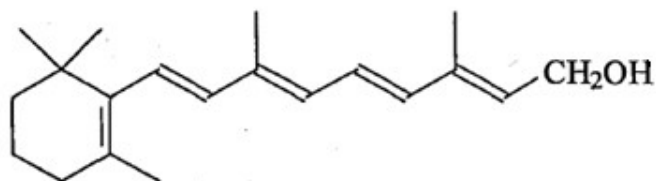


Figura 2.1
Estructura del retinol.

La capacidad de los carotenos para actuar como provitamina A depende de la conversión en retinol por los animales, así como de la presencia de β -ionona. Los carotenos que contienen como mínimo un anillo de β -ionona pueden convertirse en retinol en los animales. De esta forma, el carotenoide más importante al respecto es el β -caroteno, que contiene dos de estos anillos (Figura 2.2). El α - y el γ -caroteno, sin embargo, no pueden convertirse en retinol en los animales con la misma eficacia que el β -caroteno, ya que el anillo α del γ -caroteno no puede convertirse en el organismo en β -ionona, y la estructura abierta de la cadena del γ -caroteno no puede hacerse cíclica en los animales. Por esta razón el α -caroteno y el γ -caroteno se transforman en retinol con la mitad de eficiencia que el β -caroteno. La actividad biológica del anillo de β -ionona en los carotenos cesa por la introducción de un grupo hidroxilo. La β -criptoxantina, con un anillo de β -ionona sustituido por un hidroxilo y el otro intacto, tiene la misma actividad provitamínica A que el α - y γ -caroteno. La zeaxantina tiene dos anillos de β -ionona hidroxilados, por lo que no actúa como provitamina A (Meléndez-Martínez et al., 2004a).

En la actualidad el término provitamina A se usa para todos los carotenoides que presentan cualitativamente la actividad del β -caroteno. Nutricionalmente el carotenoide provitamínico más importante es el β -caroteno, que se definía hasta hace poco como el que tenía 1/6 de la actividad del retinol. En realidad, resulta bastante difícil hacer una estimación exacta de los equivalentes de retinol, ya que la biodisponibilidad de los carotenoides, provitamínicos o no, depende de una serie de factores, como, por ejemplo, el tipo de carotenoide, la matriz en la que se encuentran, el procesado del alimento, interacción con otros carotenoides así como con la grasa y la fibra, estatus nutricional, edad e infección por parásitos, etc. Debido a todo ello, existe una importante controversia en torno a la utilidad de estos equivalentes. No obstante, en la actualidad, el comité que fija los niveles de ingesta de referencia (Dietary Reference Intake Committee) considera que un equivalente de retinol equivale a 12 μg de β -caroteno o a 24 μg de otros carotenoides provitamínicos. La molécula de β -caroteno es, en realidad, una estructura doble de retinol y, teóricamente, su división debería dar lugar a dos moléculas de retinol. La disparidad entre la estructura química y la actividad biológica del β -caroteno se debe,

por una parte, a la absorción incompleta y, por otra parte, a la falta de estequiometría de la reacción, debido a la formación de metabolitos oxidados de retinol. En relación con esto cabe decir que, por ejemplo, los carotenoides ingeridos con los alimentos se absorben en menor grado que los carotenoides puros, por lo que los factores de conversión van a depender de la procedencia de los carotenoides. Así, por ejemplo, se considera que 2 μg de β -caroteno en solución oleosa equivalen a 1 μg de retinol. Además, en estos pigmentos cabe la posibilidad de isomería cis/trans, presentando los isómeros cis menor actividad como provitamina A que las formas trans. Es, por tanto, muy importante evitar la formación de isómeros cis durante el procesamiento de alimentos ricos en carotenoides.

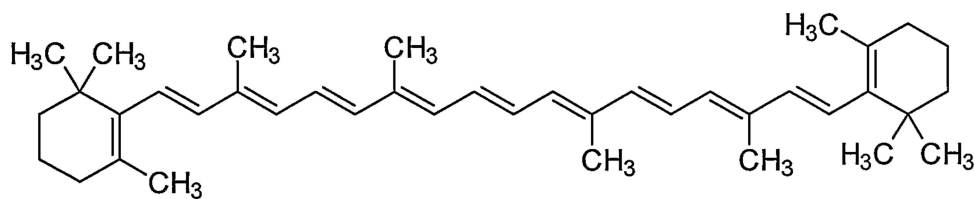


Figura 2.2
Estructura del β -caroteno.

Por otra parte, desde hace tiempo se viene postulando que los carotenoides actúan como potenciadores positivos de la respuesta inmune. En este sentido, parece ser que elevadas dosis de β -caroteno aumentan el ratio entre los linfocitos CD4 y CD8, que es muy bajo en enfermos de VIH (Olson, 1999).

Sin embargo, el hecho de que los carotenoides estén suscitando últimamente un gran interés, se debe en buena parte a una serie de estudios que demuestran su actividad antioxidante. Desde un punto de vista nutricional, se puede definir un antioxidante como aquella sustancia presente en los alimentos que disminuye significativamente los efectos adversos de especies reactivas como las del oxígeno y el nitrógeno, en condiciones fisiológicas normales en humanos (Food and Nutrition Board, 2000).

La actividad antioxidante de estos pigmentos depende de una serie de factores, como su estructura química (tamaño, número de sustituyentes, configuración cis o trans, etc.), su concentración, la presión parcial de oxígeno o su interacción con otros antioxidantes, sobre todo las vitaminas C y E. En un principio los estudios se llevaron a cabo basándose principalmente en el β -caroteno; el mecanismo de la actividad antioxidante de este compuesto está relacionado con su carácter hidrofóbico y con su

capacidad para "retirar" el oxígeno singlete y desactivar radicales libres. Se ha sugerido asimismo que el β -caroteno puede pasar de ser antioxidante a pro-oxidante en función de la concentración y la presión de oxígeno, entre otros factores. Existen estudios in vitro que apuntan que la actividad antioxidante de este compuesto es mayor que la del α -tocoferol (Jialal et al., 1991; Nakagawa, 1996). También se ha demostrado que otros carotenoides, como la astaxantina, responsable del color de la carne de salmón, son buenos antioxidantes (Tanaka, 1995; Naguib, 2000). Otros carotenoides con actividad antioxidante son la luteína, zeaxantina, cantaxantina y licopeno. En este punto, cabe comentar que en muchas ocasiones los resultados obtenidos en relación con la actividad antioxidante de los carotenoides son poco precisos y en algunos casos incluso contradictorios, debido a la gran variedad de métodos y experimentos diseñados. Así, por ejemplo, algunos ensayos indican que la actividad antioxidante de la astaxantina es superior a la de otros carotenoides (Naguib, 2000), mientras que en otros estudios se llega a la conclusión contraria (Woodall, 1997).

En un interesante ensayo en el que participaron voluntarios de cinco países, se ha puesto de manifiesto que la suplementación con carotenoides no implica un aumento de la resistencia de las lipoproteínas de baja densidad frente a la oxidación; no obstante, los resultados de dicho ensayo demostraron que el consumo de frutas y verduras ricas en carotenoides sí implicaba un aumento de resistencia frente a los procesos oxidativos (Southon, 2000). De igual forma se observó que el incremento de los niveles plasmáticos de carotenoides estaba asociado con un menor daño del ADN y una mayor actividad reparadora. De forma previa, se había sugerido que el enriquecimiento de lipoproteínas de baja densidad con β -caroteno y licopeno mejora la defensa frente al oxígeno singlete. Este enriquecimiento de las proteínas de baja densidad se consiguió sometiendo a voluntarios sanos a suplementación alimentaria con zumo de tomate. En otro estudio, se ha llegado a la conclusión de que, tanto los carotenoides del pimentón como el β -caroteno, inhiben la peroxidación lipídica in vivo (Seppanen y Csallany, 2002).

Todo esto ha llevado a que se investigue el papel de estos compuestos en la prevención de enfermedades degenerativas como aterosclerosis, cáncer, envejecimiento, cataratas, degeneración macular relacionada con la edad, etc. Se ha evaluado el papel protector para las células humanas frente a la radiación ultravioleta de diversos antioxidantes como β -caroteno, α -tocoferol y ácido ascórbico, llegándose a la conclusión de que el primero es el más eficiente, probablemente debido a su localización en la membrana celular. Luteína y zeaxantina, dos de los carotenoides mayoritarios en el suero humano, se localizan en cantidades apreciables en la retina, protegiéndola debido a sus



propiedades antioxidantes (Snodderly, 1995). En cuanto al licopeno, se ha demostrado in vivo que una dieta rica en tomate mantenida durante dos semanas protege a los linfocitos frente al radical dióxido de nitrógeno y al oxígeno singlete (Böhm et al., 1995). De forma previa se comprobó que era más efectivo que el β -caroteno en la protección celular frente al radical dióxido de nitrógeno. El papel del β -caroteno en la prevención de enfermedades coronarias ha sido también objeto de una serie de estudios que proporcionan unos datos a veces contradictorios, por lo que se postula que dicha prevención se debe más al consumo de alimentos ricos en β -caroteno que a dicho pigmento en particular (Tavani y La Vecchia, 1999). Por lo que respecta al efecto en el estatus antioxidante de fumadores, se ha comprobado que la suplementación con una combinación de β -caroteno y vitaminas C y E aumenta los niveles plasmáticos de antioxidantes y la actividad de enzimas antioxidantes en fumadores varones con hiperlipemia (Chao et al., 2002).

Hay estudios que relacionan la aparición de algunos tipos de cáncer con la carencia de ciertos carotenoides en la dieta, por lo que son considerados compuestos anticancerígenos (Bendich, 1989; Krinsky, 1989; Ziegler, 1989). Varias investigaciones epidemiológicas han mostrado que el riesgo de padecer cáncer es inversamente proporcional al consumo de vegetales y frutas ricos en carotenoides. Si bien muchos de estos estudios se han centrado en el β -caroteno, otros carotenoides eficaces en la prevención de la enfermedad son β -criptoxantina, zeaxantina, astaxantina e incluso el carotenoide no coloreado fitoeno (Nishino et al., 1998). En un estudio reciente, se ha demostrado una relación inversa entre el consumo de alimentos ricos en luteína (como espinaca o lechuga) y el cáncer de colon, tanto en hombres como en mujeres (Slattery et al., 2000). De igual forma se ha demostrado que los carotenoides típicos del pimiento rojo (*Capsicum annuum* L.) como capsantina y sus ésteres y capsorrubina, entre otros, son efectivos agentes antitumorales (Maoka et al., 2001). La protección de los pigmentos carotenoides frente al cáncer y a otras enfermedades crónicas podría deberse, además de a sus propiedades antioxidantes, a otros efectos como la inhibición de la proliferación de células, mejora de la diferenciación celular, estimulación de la comunicación intercelular y filtración de la luz azul, entre otros (Olson, 1999).

Como se deduce de lo anteriormente expuesto, en la actualidad son muchos los investigadores que trabajan en las propiedades antioxidantes y antitumorales de estos compuestos, por lo que continuamente se están aportando nuevos datos al respecto y poniéndose de manifiesto estas beneficiosas propiedades en otros carotenoides. Cabe señalar que la mayoría de los estudios sobre la actividad antioxidante de los carotenoides

se han llevado a cabo in vitro, aunque en los últimos años el número de ensayos in vivo ha aumentado considerablemente (Meléndez-Martínez et al., 2004a).

Actualmente no existe una recomendación de ingesta diaria de carotenoides, aunque se ha propuesto un valor de referencia de 6 mg/día, basado en el aporte de los carotenoides con actividad de provitamina A (Krinsky et al., 2003).

La importancia del resto de funciones fisiológicas (actividades antioxidantes y no antioxidantes) demanda un estudio más profundo de las mismas y de la correlación dosis-efecto, para poder establecer unos valores de ingesta diaria para estos componentes (Mínguez-Mosquera et al., 2005).

2.2.3.- ESTABILIDAD EN LOS ALIMENTOS

Los carotenoides son pigmentos estables en su ambiente natural, pero cuando los alimentos se calientan, o cuando son extraídos en disolución en aceites o en disolventes orgánicos, se vuelven mucho más lábiles. Así, se ha comprobado que los procesos de oxidación son más acusados cuando se pierde la integridad celular, de forma que en alimentos vegetales triturados, la pérdida de compartimentación celular pone en contacto sustancias que pueden modificar estructuralmente, e incluso destruir los pigmentos. No todos los tipos de cocinado afectan en la misma medida a los carotenoides, de forma que la pérdida de estos pigmentos aumenta en el siguiente orden: cocinado con microondas < cocinado al vapor < hervido < salteado.

Los carotenoides, excepto algunas excepciones, son insolubles en agua y por lo tanto las pérdidas por lixiviación durante el lavado y procesamiento de frutos son mínimas. Otros tratamientos empleados en las industrias alimentarias, como, por ejemplo, el tratamiento a alta presión, parecen no afectar significativamente a los niveles de carotenoides en diversos productos vegetales. El escaldado industrial de los alimentos puede producir pérdidas de carotenoides, si bien la inactivación enzimática que produce previene pérdidas posteriores durante el procesado y almacenamiento. En cambio, la congelación, la adición de antioxidantes y la exclusión del oxígeno (e.g. vacío, envases impermeables al oxígeno, atmósfera inerte) disminuyen las pérdidas durante el procesado y almacenamiento de los alimentos (Rodríguez-Amaya, 1997).

La destrucción de estos pigmentos reduce el valor nutritivo de los alimentos e induce una decoloración y una pérdida de sus características organolépticas. El grado de



decoloración va a depender fundamentalmente de la presencia de agentes oxidantes en el medio (sobre todo oxígeno molecular) y de que se comunique energía suficiente para que la reacción de degradación tenga lugar. La energía se aporta en forma de luz o calor. La reacción de decoloración supone la pérdida de conjugación de la molécula y, en principio, no tiene por qué implicar la rotura del esqueleto hidrocarbonado, por lo que cualquier factor capaz de interrumpir la deslocalización electrónica existente, podría producir pérdida de color. Si las condiciones oxidantes son débiles y la energía suministrada no es suficiente, se vuelve a restaurar el orbital molecular con la posibilidad de que la estructura adopte la configuración cis o trans, en función de que haya habido rotación en el enlace. Si las condiciones son muy severas, el grado de degradación progresa, fragmentándose entonces el pigmento (Mínguez-Mosquera, 1997).

En resumen, puede decirse que los factores que influyen en la degradación de carotenoides en sistemas modelo son varios: estructura del carotenoide, exposición a la luz, actividad del agua, temperatura, presencia de oxidantes o antioxidantes, presencia de sulfitos, etc. Estos estudios de estabilidad, son aún más complejos en alimentos, debido a sus diferencias estructurales y de composición, diferentes tipos de procesados industriales, etc. (Meléndez-Martínez et al, 2004b).

2.2.4.- DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA A LA EDAD

Es muy importante mantener la integridad del área macular retiniana. La mácula es una zona de la retina de unos 5 mm de diámetro, en cuyo centro se encuentra la fóvea. La mácula está especializada en la visión de los detalles finos y, por ejemplo, nos permite leer o distinguir las caras de las personas. La alta concentración de fotorreceptores en esta área requiere un aporte vascular exquisito para mantener una función correcta. Esta circunstancia la hace más susceptible a alteraciones patológicas. A veces los deterioros de la mácula pueden predecirse y así evitar pérdidas de visión central.

La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es la causa número uno de ceguera en los EE.UU. en personas de más de 60 años. El estudio de Framingham indica que la DMAE afecta hasta a un 7% de la población de la tercera edad (Leibowitz et al., 1980). En España, el porcentaje de personas que sufren esta enfermedad en mayores de 65 años es del 13%, y entre los mayores de 75 años, el 30 % está afectado en alguna proporción (<http://www.icoftalmologia.es/es/enfermedades-de-los-ojos/dmae>). Existen dos formas diferenciadas de DMAE: la forma seca o atrófica y la forma húmeda o exudativa.



La DMAE seca es la más común (90% de los casos) y su progresión es lenta (años), mientras que la DMAE húmeda es muy agresiva y puede conducir a la pérdida de la visión central en poco tiempo (semanas o meses). Los pacientes con la forma seca pueden pasar a la húmeda y viceversa. Los pacientes en los que se observan drusas (acumulaciones de material extracelular de color amarillento) en la mácula son más propensos a la DMAE, independientemente de que sea de tipo seca o húmeda.

La DMAE seca consiste en una desorganización granular del epitelio pigmentario con hiperplasia de éste en el área macular y formación de drusas. Así, se degeneran las capas más externas de la retina. La pérdida de visión es variable según el grado. La visión del color se ve afectada, así como también la adaptación a la luz. Es bilateral, aunque no simétrica. Rara vez, sin embargo, la pérdida de visión es realmente severa. En la DMAE de tipo seca, el paciente suele referir pérdida de agudeza visual y metamorfopsia (desdibujamiento de las líneas rectas). En ella se pueden observar alteraciones del epitelio pigmentario de la retina en el área macular, con zonas de hipo e hiperpigmentación, siendo los patrones de presentación impredecibles.

En la DMAE húmeda, el paciente manifiesta disminución de la visión central con su escotoma correspondiente y metamorfopsia. No tiene un patrón típico de aparición, pero se puede producir desde un edema macular hasta una hemorragia en dicha zona. El manejo clínico consiste en evitar la exudación si se puede aplicando láser sobre la membrana neovascular antes de que ésta se rompa.

2.2.5.- LA LUTEÍNA COMO AGENTE ANTIOXIDANTE Y PREVENTIVO

La luteína es un pigmento carotenoideo liposoluble del grupo de las xantófilas que presenta la fórmula $C_{40}H_{56}O_2$ (Figura 2.3). La luteína presenta dos grupos hidroxilo, aunque en las plantas superiores se encuentra generalmente en forma esterificada formando mono o diésteres. El sistema de dobles enlaces conjugados que contiene esta molécula le confiere su color y el carácter antioxidante. La luteína es un potente antioxidante que se encuentra presente en el cuerpo humano (Zhang et al., 1991; Palozza y Krinsky, 1992). La luteína está muy relacionada con otros carotenoides como el β -caroteno, zeaxantina o astaxantina, con los que comparte numerosas propiedades químicas, incluida la capacidad antioxidante. De cualquier forma, las diferencias estructurales de los distintos carotenoides les otorgan un diferente potencial antioxidante en humanos (Simic, 1992).



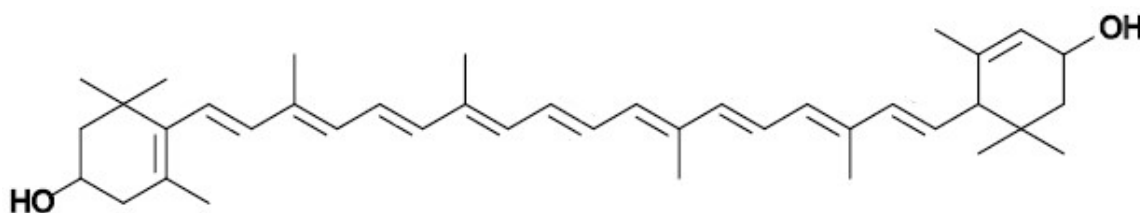


Figura 2.3
Estructura química de la luteína.

Según numerosos estudios epidemiológicos, un consumo apropiado de luteína en la dieta disminuye el riesgo de contraer enfermedades asociadas con la formación de radicales libres (Granado et al., 2009, 2010). Así, la luteína es capaz de proteger a las células, y prevenir o finalizar las reacciones en cadena originadas por los radicales libres. La luteína es acumulada principalmente junto con la zeaxantina en la zona de la retina humana denominada mácula o mácula lútea. Esta zona es rica en ácidos grasos poliinsaturados que son atacados por los radicales libres y sufren un proceso de oxidación que se ve atenuado por la presencia de luteína. De este modo, la luteína funciona como un filtro de los rayos ultravioleta del sol y como antioxidante que atrapa radicales libres y especies de oxígeno reactivo (Silva, 2004).

La luteína es el único carotenoide detectado en la retina y en el cristalino humanos, y a su vez constituye el principal pigmento macular. Tiene un papel protector de las células del epitelio retiniano y de los fotorreceptores frente a la agresión oxidativa producida por la exposición a la luz azul y el intenso metabolismo celular. Todos los estudios hasta la fecha coinciden en que la luteína reduce el riesgo de padecer DMAE, y puede mejorar la función visual en los pacientes de esta enfermedad.

La luteína es, junto con la zeaxantina, uno de los carotenoides más importantes para los humanos, siendo detectada en el plasma humano y en la leche materna y más significativamente en la mácula de la retina humana donde juega un importante papel en la protección de la misma. Estudios clínicos han revelado los beneficios que supone la ingesta adecuada de luteína en la protección contra la aparición y/o progresión de enfermedades de elevada incidencia en países desarrollados, como son cáncer (Astorg, 1997; Demming-Adams y Adams III, 2002; Heber y Lu, 2002), enfermedad cardiovascular (Dwyer et al., 2001), cataratas y degeneración macular senil (Olmedilla et al., 2001; Shi et al., 2002; Mares-Perlman et al., 2002; Granado et al., 2003; Krinsky et al., 2003). Este tipo de enfermedades tienen que ver con el déficit de luteína en el organismo y la correspondiente pérdida de protección antioxidante (Kijlstra et al., 2012).

En particular, la degeneración macular senil o degeneración macular asociada a la edad (DMAE) es la primera causa de pérdida de visión, que puede culminar en ceguera en personas de edad superior a 50 años, siendo una enfermedad degenerativa que afecta a la mácula lútea, responsable de la visión central directa. La Imagen 2.6 muestra el deterioro progresivo de la mácula lútea en personas afectadas por esta enfermedad y los efectos sobre la visión que esto produce.

Los beneficios de la utilización de luteína se han constatado especialmente en el caso de la degeneración macular senil, trastorno de la visión central caracterizado por la pérdida de la agudeza visual como consecuencia de la degeneración que se produce en la mácula o parte central de la retina. Se ha demostrado que el consumo de una dieta rica en luteína reduce el riesgo de sufrir degeneración macular senil y otras dolencias asociadas a la edad (Dwyer et al., 2001; Schünemann et al., 2002). Aunque el mecanismo de la acción protectora que desempeña este pigmento no es totalmente conocido, se le atribuye la capacidad de filtrar la luz azul o de neutralizar los radicales libres que genera esta radiación, etc.



Imagen 2.6

Cambios que provoca la degeneración macular senil (DMAE) en la retina (parte superior de la imagen) y sus correspondientes consecuencias en la visión humana (parte inferior de la imagen).

**Imagen 2.7**

Algunos productos comerciales basados en luteína.

Aunque la luteína se encuentra ampliamente distribuida en alimentos como frutas, verduras y yema de huevo, la ingesta de este pigmento se encuentra en torno a 1,5 mg por día en países como Canadá, cifra que podría considerarse representativa para una población occidental media (Jonson-Down et al., 2002). Siguiendo recomendaciones dietarias como elevación del consumo de alimentos ricos en luteína, particularmente frutas y verduras, es posible conseguir una ingesta de luteína próxima a los 3 mg por día, si bien el mantenimiento de estos niveles requiere una disciplina difícil de seguir. Para la prevención de las enfermedades degenerativas mencionadas previamente, la ingesta recomendada de luteína es de 6 mg por día, lo cual es difícil de alcanzar por modificaciones en la dieta (Krinsky et al., 2003; Silva, 2004). Por tanto, especialmente en grupos de riesgo, no es suficiente con el seguimiento de una dieta rica en luteína y se deben de administrar suplementos que aumenten la cantidad de este carotenoide (Imagen 2.7).

Lo expuesto anteriormente pone de manifiesto el interés y los potenciales beneficios de disponer de fuentes de luteína para su aportación como suplemento en los casos mencionados. Concretamente, una de las vías más interesantes de cara a desarrollar una estrategia preventiva de la DMAE es una adecuada ingestión de luteína en la dieta.

Otras aplicaciones de la luteína

Otro de los usos actuales más extendidos de la luteína es como colorante natural en alimentación humana, en productos tales como mantequilla, margarina, quesos, bebidas refrescantes y pasta. Además, al igual que otros carotenoides, se añade a piensos de acuicultura para incrementar la coloración de los salmónidos, y de otros tipos

de peces y mariscos. También se usa ampliamente en la alimentación avícola para mejorar la pigmentación tanto de la piel, como de la carne y de las yemas de huevos (Alam et al., 1968; Livingston, 1986).

Las ventas de luteína como aditivo de piensos en EE.UU. superaron los 150 millones de dólares en 1994 (Johnson y Schroeder, 1995). El hecho de que los ésteres de luteína sean más solubles en aceites vegetales que los carotenoides sintéticos es un factor favorable para el uso de este compuesto como colorante alimenticio (Philip y Berry, 1975). Por otro lado, la luteína también es usada en la industria cosmética, aumentando de este modo su valor comercial.

2.2.6.- FUENTES PARA LA OBTENCIÓN DE LUTEÍNA Y OTROS ANTIOXIDANTES

La luteína se encuentra ampliamente presente en plantas superiores. Generalmente, este pigmento es producido por verduras y hortalizas de color verde oscuro, como coles de Bruselas, guisantes, espinacas, lechuga o judías, considerándose éstas como las principales fuentes de luteína que pueden aportarse en la dieta. Además, la luteína presenta la ventaja de que se encuentra más disponible en los alimentos que otros carotenoides como el β -caroteno (Shoefs et al., 2002).

La fuente comercial más importante de producción de luteína pura son los pétalos de la flor de Marigold o caléndula (*Tagetes erecta*) (Imagen 2.8). Esta planta, también denominada “clavelón de la India”, es de las fuentes naturales más ricas en xantófilas, principalmente luteína (Navarrete-Bolaños et al., 2005). Se han referenciado contenidos de luteína en los pétalos de Marigold de hasta 5.000 ppm como mezcla de ésteres, generalmente en forma de mono o diésteres de los ácidos palmítico o mirístico, lo que corresponde a unas 2.500 ppm de luteína pura (Piccaglia et al., 1998). Además, junto a este carotenoide aparece la zeaxantina, representando ambos pigmentos un 88-92 % del total de xantófilas en Marigold, siendo la luteína el componente mayoritario (Delgado-Vargas et al., 1997).





Imagen 2.8
Flor de Marigold o caléndula (*Tagetes erecta*).

De la flor de caléndula se extrae gran parte de la luteína comercializada actualmente, siendo esta la mayor fuente de este pigmento, que se comercializa generalmente como oleorresina (Imagen 2.7). El extracto saponificado de este pigmento es utilizado ampliamente como aditivo en complementos dietéticos, en la industria farmacéutica, o como suplemento en piensos para mejorar la pigmentación de la piel de aves de corral y la coloración de los huevos. Sin embargo, el contenido de luteína en Marigold varía entre cosechas, estimándose el contenido medio de las flores de Marigold (botones y pétalos tal como se cosechan) en 300 ppm. En cuanto a la productividad, con Marigold se puede llegar a obtener un máximo 22 Kg/(Ha·año) de luteína, considerando la realización de cuatro cosechas anuales en las mejores condiciones de cultivo (Bosma et al., 2003). Esta variabilidad, que dificulta los procesos industriales, así como la baja producción por unidad de superficie, hace que resulte interesante buscar fuentes alternativas de luteína.

En este sentido, algunas microalgas han sido referenciadas como potencialmente útiles para la producción de luteína por su elevado contenido en este compuesto. Entre ellas cabe citar, por ejemplo, *Muriellopsis sp.*, *Chlorella zofigiensis*, *Chlorella protothecoides*, y *Scenedesmus almeriensis* (Del Campo et al., 2000, 2001; Shi et al., 2002; Sánchez et al., 2008a). Los contenidos en luteína en estas microalgas varían en función de las condiciones de cultivo (Tabla 2.7). En muchos casos, la producción de luteína está ligada a la irradiancia que el cultivo recibe, de modo que la acumulación de este pigmento puede incrementarse al aumentar la irradiancia. Esto está relacionado con el papel fotoprotector que ejercen las xantófilas (Niyogi et al., 1997). Así pues, cuando microalgas productoras de luteína como *Muriellopsis sp.*, *Chlorella zofigiensis* o *Scenedesmus* son expuestas a una irradiancia mayor, dentro de unos límites que no resulten dañinos para el aparato fotosintético celular, se produce un incremento en la

acumulación de este pigmento (Senger et al., 1993; Del Campo et al., 2000, 2001; Sánchez et al., 2008b).

Tabla 2.7

Contenido en luteína de algunas microalgas a nivel de laboratorio y escala semi-industrial (Molina et al., 1994; Del Campo et al., 2000, 2001; Shi et al., 2002).

Microalga	Luteína (mg·g ⁻¹)	Condiciones y productividad de luteína
<i>Chorella zofigiensis</i>	3,42	Escala de laboratorio
<i>Muriellopsis zp.</i>	4,30	Fotobiorreactor tubular externo (50 L): 170 mg·m ⁻² ·día ⁻¹
<i>Chlorella protothecoides</i>	5,35	Cultivo heterotrófico, escala de laboratorio: 49 mg·L ⁻¹ ·día ⁻¹
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	11	Fotobiorreactor tubular externo (3000 L): 387 mg·m ⁻² ·día ⁻¹

Aunque la luteína puede actuar como protección del aparato fotosintético celular, frente al daño causado por el exceso de irradiación u otros tipos de estrés (Demming-Adams y Adams III, 2002), en las microalgas consideradas como potenciales productoras de luteína, la concentración de biomasa sigue siempre una tendencia paralela a la acumulación de luteína, y por tanto es considerada un metabolito primario, asociado al crecimiento. Por tanto, la máxima productividad de luteína se alcanza para las condiciones que optimizan la productividad de biomasa de la especie considerada. En este sentido, con *Scenedesmus almeriensis* se han referenciado productividades de luteína de hasta 1.400 Kg/(Ha·año) empleando un fotobiorreactor tubular de 3.000 L (Sánchez et al., 2008a), muy superiores a los 22 Kg/(Ha·año) obtenidos a partir de Marigold (Bosma et al., 2003).

Dado su papel esencial en el metabolismo vegetal y concretamente en la estructura y función del aparato fotosintético, la luteína se encuentra muy presente en plantas superiores como se ha mencionado anteriormente, contándose frutas y verduras entre sus fuentes principales para consumo humano, y siendo especialmente ricas las de hoja verde. Sin embargo, ninguna de estas fuentes es suficiente para complementar la ingesta habitual de la población hasta la dosis de luteína recomendada para la prevención de enfermedades degenerativas (6 mg/día). Para esto, habitualmente se recurre al uso de extractos enriquecidos con luteína que, en su mayoría, proceden de flores de caléndula (Imagen 2.8) y sirven para suplementar dietas de los grupos de riesgo.



A pesar de la abundante presencia de la luteína en plantas superiores y algunos productos que se usan para la alimentación animal (harina de alfalfa, gluten de maíz y flores de caléndula), la reducida concentración de luteína en estas materias primas hace que se estén buscando otras fuentes en las que el pigmento se encuentre en mayores concentraciones. Así, se están realizando esfuerzos considerables para hacer posible la producción comercial de este carotenoide a partir de microalgas (Del Campo et al., 2001; García-González et al., 2005). La biomasa de microalgas es una fuente ventajosa de luteína debido a su elevado contenido en este pigmento con respecto a las fuentes tradicionales anteriormente mencionadas, y a que aparece como molécula libre en lugar de la mezcla de ésteres que habitualmente se encuentra en los extractos comerciales procedentes de fuentes tradicionales.

Es importante resaltar en este punto, la existencia de la microalga *Scenedesmus almeriensis*, una nueva especie descubierta y patentada por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería, que contiene una elevada cantidad de luteína (hasta 7.000 ppm), constituyendo ésta el carotenoide mayoritario (Tabla 2.8) (Fernández et al., 2010). Este elevado contenido en luteína, hace que esta microalga sea una alternativa importante a la obtención de luteína mediante la flor de caléndula.

Tabla 2.8
Composición de la microalga *Scenedesmus almeriensis* (Fernández et al., 2010).

Pigmento	Contenido (mg·g ⁻¹)
Violaxantina	0,234
Astaxantina	0,210
Luteína	7,010
Cantaxantina	0,125
Ésteres de astaxantina	0,204
β-caroteno	0,756

2.3.- EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

El aceite de oliva virgen es el mosto oleoso procedente únicamente del fruto del olivo (*Olea Europaea Sátiva*), la aceituna. Es un producto totalmente natural, que cuando es obtenido por sistemas mecánicos adecuados y procede de frutos de buena calidad, posee excepcionales características organolépticas (olor, color y sabor), siendo el único entre los aceites vegetales que puede consumirse crudo, conservando íntegro su



contenido en vitaminas, ácidos grasos esenciales y otros productos naturales de gran importancia dietética. El aceite de oliva virgen es obtenido únicamente por procedimientos mecánicos o por medios físicos, como son el lavado, la decantación, la centrifugación y el filtrado.

Los aceites de oliva vírgenes se clasifican en dos tipos (Reglamento N° 61/2011 Diario Oficial de la Unión Europea de la Comisión de 24 de Enero 2011).

- Aceite de oliva virgen extra: aceite de oliva virgen cuya acidez libre, expresada en contenido de ácido oleico, es como máximo 0,8 g por cada 100 g ($<0.8^\circ$), y en cuanto a sus características organolépticas la mediana de los defectos es igual a 0 y la del atributo "frutado" es superior a 0.
- Aceite de oliva virgen: aceite de oliva virgen cuya acidez libre, expresada en contenido de ácido oleico, es como máximo de 2 g por cada 100 g ($<2^\circ$), y en relación a las características organolépticas la mediana de los defectos es superior a 0 e inferior o igual a 2,5 y la del atributo "frutado" es superior a 0.

El consumo de aceite de oliva virgen se ha relacionado con un perfil lipídico de menor riesgo de padecer enfermedades coronarias (Gimeno, 2004; Perona et al., 2004) y con un menor riesgo de desarrollar algunas neoplasias malignas (Lipworth et al., 1997; Trichopoulou y Lagiou, 1997; Owen et al., 2000). Un número creciente de estudios apunta al papel crucial que desempeña el aceite de oliva como integrante básico de la "dieta mediterránea", en sus efectos beneficiosos sobre la salud humana (<http://www.predimed.es/>). Por ejemplo, se ha demostrado que el aceite de oliva reduce el colesterol total en plasma, gracias a su composición de ácidos grasos. También disminuye la fracción de colesterol transportada por las lipoproteínas de baja densidad (LDL), mientras que incrementa la fracción transportada por las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Por otra parte, la incidencia de enfermedades cardiovasculares y muertes por enfermedades coronarias es menor entre los habitantes de regiones donde existe hábito de consumo de aceite de oliva (Aparicio y Hardwood, 2003; De Torres, 2013).

Desde el punto de vista bromatológico, se establece que la composición del aceite de oliva queda dividida en dos tipos de compuestos (Tabla 2.9): la fracción mayoritaria, también conocida como saponificable que está básicamente constituida por triglicéridos y, en menor proporción, por diglicéridos, monoglicéridos, ácidos grasos libres, etc.,



representando el 98-99% del peso total del aceite, y la fracción minoritaria, que supone el 2% restante del peso total, constituida por pigmentos, compuesto volátiles, polifenoles, tocoferoles, esteroides, etc., éstos constituyentes menores son importantes para la estabilidad, sabor y aroma del aceite de oliva.

Tabla 2.9
Composición del aceite de oliva virgen. (Mérida y Pérez, 2014).

Fracción Saponificable	Fracción Insaponificable
	Fosfolípidos
	Ceras
	Ésteres de esteroides
	Hidrocarburos
	Alcoholes grasos
	Esteroides
	Tocoferoles
	Dialcoholes triterpénicos
	Pigmentos
	Compuestos fenólicos
	Compuestos volátiles y aromáticos
Triglicéridos	
Monoglicéridos	
Diglicéridos	
Ácidos grasos libres	

2.3.1.- ANTIOXIDANTES PRESENTES EN EL ACEITE DE OLIVA VIRGEN

Los principales antioxidantes del aceite de oliva virgen son los compuestos fenólicos, incluyendo los fenoles lipofílicos e hidrofílicos. Se puede afirmar que el aceite de oliva virgen puede ser diferenciado de otros aceites vegetales por su particular composición en compuestos fenólicos (Boskou, 1996; Capella et al., 1997; Servili y Montedoro, 2002).

Los pigmentos, presentes en el aceite de oliva virgen, también tienen propiedades antioxidantes. Se ha descrito la doble capacidad, antioxidante en la oscuridad y prooxidante en presencia de luz, de las clorofilas (Endo et al., 1984; Fakourelis et al., 1987; Gutiérrez et al., 1992). Los carotenoides también presentan un importante papel como antioxidantes en el aceite de oliva virgen (Fakourelis et al., 1987; Kiritsakis y Osman, 1995).



2.3.1.1.- Compuestos Fenólicos

Los fenoles hidrofílicos del aceite de oliva virgen constituyen un grupo de compuestos, metabolitos secundarios de las plantas, que presentan importantes propiedades organolépticas y para la salud. La concentración de estos compuestos en el mesocarpio de las aceitunas puede suponer el 1-3 % del peso de la pulpa fresca. Se trata de compuestos de carácter polar que pasan al aceite en pequeñas cantidades en el proceso de extracción como consecuencia del equilibrio físico-químico entre dos fases inmiscibles: agua y aceite. Estos compuestos reciben el nombre de polifenoles, tratándose de un término convencional ya que no todos ellos son polihidroxi-derivados.

El contenido total en polifenoles en el aceite de oliva virgen oscila entre 50 y 500 mg/kg de ácido cafeico (Gutiérrez et al., 1977), si bien se han descrito aceites con un contenido superior a los 1.000 mg/kg (Uceda et al., 2004; Servili et al., 2009). Los compuestos fenólicos le confieren al aceite de oliva virgen determinadas propiedades a nivel químico, organoléptico y de la salud (De Torres, 2013).

A nivel químico, el efecto antioxidante de estos compuestos ha quedado demostrado en muchos trabajos. Tienen especial interés los orto-difenoles, principalmente la oleuropeina y el hidroxitirosol. La actividad antioxidante del hidroxitirosol se debe tanto a un efecto quelante de iones de metales como a un efecto secuestrador de radicales libres, habiendo demostrado tener una capacidad antioxidante igual o superior a la de otros antioxidantes como las vitaminas E y C (Visioli y Galli, 1998).

En cuanto a la implicación de los compuestos fenólicos en las propiedades sensoriales del aceite de oliva virgen, en la bibliografía se informa de que estos compuestos son responsables de los atributos positivos: amargo, picante y astringente (Andrewes et al., 2003). El amargor, atributo sensorial positivo (COI, 1987), es función del contenido en polifenoles totales (Gutiérrez et al., 1977; Beltrán et al., 2005). El amargor de los aceites puede ser cuantificado químicamente mediante la medida del K_{225} (Gutiérrez et al., 1992), pues este parámetro está relacionado con la evaluación sensorial del amargo (COI, 1987).

2.3.1.2.- Tocoferoles

Los tocoferoles son los compuestos responsables de la actividad desarrollada por la vitamina E. El término general vitamina E se utiliza para designar a un grupo de ocho especies naturales de tocoferoles (α , β , γ , y δ) y tocotrienoles. Junto con las vitaminas A, D y K constituyen el grupo de las vitaminas liposolubles, caracterizadas por ser derivados del núcleo isoprenoide, solubles en lípidos y en disolventes orgánicos. Son compuestos esenciales, puesto que el organismo no puede sintetizarlos, por lo que su aporte se realiza a través de la dieta en pequeñas cantidades, siendo los aceites vegetales una de sus principales fuentes (Sayago et al., 2007).

La vitamina E es sintetizada de forma exclusiva por las plantas. Se encuentra principalmente en los aceites vegetales (soja, maíz, algodón y girasol), semillas, plantas y en el tejido adiposo de los animales. Se localiza principalmente en las hojas y partes verdes de las plantas, que contienen más α -tocoferol que las partes amarillas, mientras que el γ -tocoferol se encuentra en bajas concentraciones (Gerald y Combs, 1992). También se encuentran en algunas algas marrones, verdes y rojas, y en algunas levaduras y hongos, pero no en las bacterias (Codoceo y Muñoz, 1999). Los tocotrienoles no se encuentran en las plantas verdes, pero sí en el salvado y el germen de ciertas semillas y cereales (De Torres, 2013).

Los tocoferoles existen solo en forma de fenoles libres, mientras que los tocotrienoles pueden presentarse en la naturaleza en forma esterificada (Aguilera, 2006).

En el aceite de oliva virgen se ha descrito la presencia de α , β , y γ -tocoferol. El α -tocoferol es el mayoritario, alcanzando valores superiores al 95 % del total. También se ha descrito la presencia de tocotrienoles en algunas variedades de aceite (Agramont et al., 1986), si bien este hallazgo no ha sido corroborado en posteriores trabajos. El contenido medio en tocoferoles en el aceite de oliva virgen oscila entre 50 y 300 mg/kg (Boskou, 1996). En cuanto a la función de la vitamina E en el organismo humano, una de las teorías más aceptada indica que actúa de forma coordinada con otras moléculas y enzimas para la defensa de las células (especialmente glóbulos rojos, células musculares y células nerviosas) frente a los efectos nocivos producidos por los radicales libres, considerándose actualmente como un importante antioxidante que aporta sustancias beneficiosas al organismo. Así, la actividad antioxidante de la vitamina E radica en su capacidad de protección de las membranas celulares, acción que realiza impidiendo la



oxidación de las mismas por los radicales libres. Dicha oxidación llevaría a una degradación del organismo, especialmente a la aparición de enfermedades cardíacas o posibles cánceres. Esta vitamina, junto con las vitaminas A y C, conforma el grupo de las vitaminas antioxidantes (Gerald y Combs, 1992). La vitamina E tiene muchos más efectos de los que su descubridor hubiera podido imaginar. Como antioxidante, defiende las células reduciendo el estrés oxidativo, estimula el sistema inmunológico y frena el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer. Así mismo, ayuda a reducir los niveles de colesterol (Packer y Obermüller-Jevic, 2002). Sin embargo, su utilidad en la prevención de trombos en las arterias es aún discutible (Stanley, 2005).

2.3.1.3.- Pigmentos

El aceite de oliva virgen tiene un color que va desde el verde-amarillo hasta el dorado, dependiendo de la variedad y del estado de madurez del fruto, que está relacionado con la presencia de diversas cantidades de ciertos pigmentos. La composición y el contenido total de pigmentos, presentes de forma natural en el aceite de oliva virgen, son importantes parámetros para la determinación de su calidad. Los pigmentos también están involucrados en mecanismos de auto-oxidación y foto-oxidación. Los pigmentos presentes en el aceite de oliva se agrupan en dos clases: clorofilas y feofitinas, y carotenoides (Carrasco, 2006).

Clorofilas y feofitinas

Las clorofilas son los pigmentos responsables del color verde de los aceites de oliva vírgenes. Su estructura consiste básicamente en cuatro anillos pirrólicos sustituidos, uno de los cuales está reducido, que están coordinados con un ión Mg^{2+} para formar un complejo planar muy estable. En medio ácido se produce la sustitución del magnesio por hidrógeno dando lugar a las feofitinas. Este proceso se produce siempre que se rompe la integridad celular, lo que ocurre cuando los productos vegetales son sometidos a golpes, rotura, trituración y calentamiento. En el aceite de oliva, como consecuencia del proceso de elaboración, se pueden encontrar clorofilas y feofitinas "a" y "b", la diferencia entre ambas es que la "a" tiene un grupo metilo en el carbono número 3 mientras que la "b" posee un grupo formilo (Ranalli, 1992a). Su contenido en los aceites de oliva vírgenes varía entre 1 y 20 mg/kg (De Torres, 2013).

Se ha observado que el aceite de oliva virgen es sensible a la radiación de 320-700 nm (Vázquez, 1980). Esta sensibilidad es debida a la presencia de clorofilas que



absorben la luz en esa zona del espectro. Las clorofilas y feofitinas tienen un efecto prooxidante sobre los lípidos en presencia de la luz, mientras que en la oscuridad actúan como antioxidantes (Interesse et al., 1971). Por ello, el aceite de oliva virgen, que contiene pigmentos verdes, debe ser protegido de la luz durante su almacenamiento, para minimizar los efectos de la oxidación (Kiritsakis, 1980). Estos pigmentos facilitan la formación de oxígeno singlete, lo que provoca la oxidación del aceite en presencia de luz (Carlsson et al., 1976; Fakourelis et al., 1987; Lee et al., 1988). El oxígeno singlete reacciona rápidamente con las insaturaciones de los ácidos grasos para dar hidroperóxidos, que son inestables y se descomponen en radicales libres, iniciándose así la reacción de auto-oxidación en cadena (Carlsson et al., 1976).

Carotenoides

Los carotenoides son moléculas liposolubles isoprenoides, presentes en todos los organismos fotosintéticos, cuyo color va del amarillo al rojo. La estructura básica de los carotenoides es un tetraterpeno de 40 carbonos, simétrico y lineal, formado a partir de ocho unidades isoprenoides de 5 carbonos. Este esqueleto básico puede modificarse de varias formas, como por ejemplo, por hidrogenación, deshidrogenación, ciclación, migración del doble enlace, acortamiento o extensión de la cadena, reordenamiento, isomerización, introducción de funciones oxigenadas, o por combinaciones de estos procesos, dando como resultado una gran diversidad de estructuras. Los carotenoides se dividen según su naturaleza química en dos grupos, carotenos y xantófilas. Los carotenos no presentan sustituciones en la cadena hidrocarbonada mientras que las xantófilas son derivados oxigenados, que contienen uno o más grupos funcionales (hidroxilo, carbonilo, alcoxi, carboxilo, etc.).

Como ya se ha mencionado en la sección 2.2, los carotenoides presentan importantes propiedades como colorantes, antioxidantes, favorecedores del bronceado, en el tratamiento de enfermedades de la piel y oftalmológicas, e incluso como agentes de prevención de ciertos tipos de cáncer (VERIS, 1997; Demming-Adams y Adams III, 2002). Sólo las plantas, las algas, y algunos hongos y bacterias sintetizan de forma natural los carotenoides, y por tanto los mamíferos necesitan ingerirlos a través de la dieta. Los carotenoides son de los pigmentos más ampliamente reconocidos debido a sus relevantes aplicaciones, de forma que un elevado número de ellos han encontrado aplicación comercial; entre estos se incluyen el β -caroteno, licopeno, astaxantina, cantaxantina y la luteína.



En los aceites de oliva, los carotenoides se encuentran presentes en un intervalo comprendido entre los 5-100 mg/kg y dependiendo de la naturaleza del aceite se ha encontrado luteína en concentraciones que varían desde 2-8 mg/kg (Cichelli y Pertesana, 2004).

2.3.2.- IMPORTANCIA DE LA DIETA MEDITERRÁNEA

El término "dieta mediterránea" hace referencia a los patrones alimentarios propios de los países mediterráneos (especialmente España, Portugal, Francia, Italia, Grecia y Malta). Aunque existen distintas variantes de la dieta mediterránea, se puede hablar de unos ciertos componentes comunes. El principal aporte de grasa está constituido por el aceite de oliva, rico en grasas monoinsaturadas; un alto consumo de vegetales, legumbres, cereales, frutos frescos y secos; un moderado consumo de pescado, carne de ave, leche, y productos derivados de la leche; y, por último, un bajo consumo de carne roja (Renaud et al., 1995; Trichopoulou y Lagiou, 1997) y un consumo moderado de vino (Renaud y De Lorgeril., 1992).

Existen evidencias científicas de que la dieta mediterránea clásica tiene un efecto protector en los procesos asociados con la lesión oxidativa (Renaud et al., 1995), lo que se atribuye a su alto contenido en compuestos con propiedades biológicas antioxidantes y al elevado contenido en ácidos monoinsaturados (Fitó, 2003).

Así, por ejemplo, se ha comprobado (López-Miranda et al., 2000) que la dieta mediterránea mejora la resistencia a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). Los primeros ácidos grasos en peroxidarse son los ácidos grasos poliinsaturados de las LDL (Esterbauer et al., 1987). Este proceso es inhibido por antioxidantes como la vitamina E, encargados de la captación y neutralización de los radicales libres presentes en las partículas de LDL (Bays y Dujovne, 1993). Los antioxidantes polifenólicos, presentes en el aceite de oliva virgen, contribuyen notablemente en la susceptibilidad de las LDL a la oxidación (Gutfinger, 1981).

Por otra parte, varios estudios indican que una dieta rica en grasas monoinsaturadas puede mejorar el perfil lipídico (Grundy et al., 1988; Mensink y Katan, 1992), fenómeno que conlleva una menor incidencia de padecer enfermedades cardiovasculares en el área mediterránea, como consecuencia de una dieta basada fundamentalmente en el consumo de aceite de oliva (De Torres, 2013).



2.3.3.- PARÁMETROS DE CALIDAD DE LOS ACEITES DE OLIVA

Un concepto de calidad muy aceptado es el que la define como “conjunto de las propiedades y características que proporcionan al producto la capacidad de satisfacer exigencias explícitas (requisitos organolépticos y requisitos técnico-comerciales) o intrínsecas (requisitos nutricionales y requisitos de seguridad)” (Mirandola et al., 1989; Galoppini y Fiorentini, 1991; Diniosi et al., 1992).

En general, se entiende también por calidad la conformidad entre las normas, indispensables o declaradas, y las características de un producto. En el uso corriente del término en muchos idiomas, la palabra calidad lleva implícito un concepto positivo que, sin adscribirse a una característica concreta, tiende a sintetizar un juicio resultante de una suma de valores de peso y características diferentes en relación con la naturaleza del producto mismo (Fiorino, 1996).

El primer inconveniente al valorar la calidad de un determinado producto es establecer de una manera clara las cualidades que se buscan en el mismo, lo que a su vez estará en función del uso que se le vaya a dar. De esta forma, y concretamente para el aceite de oliva, se puede hablar de calidad desde diferentes puntos de vista: calidad reglamentada, nutricional, comercial, etc.

Se puede considerar que el color, el sabor y el aroma son los principales parámetros relacionados con la calidad del aceite de oliva. Los mencionados atributos suelen estar relacionados con la presencia de algunos de los compuestos que se encuentran en el aceite. Se analizará a continuación, un poco más en profundidad, cada uno de ellos.

Dentro de la evaluación sensorial, el color es un criterio básico. No existe una relación clara entre los principales parámetros de los aceites de oliva recomendados por el Comité Oleícola Internacional (e.g. acidez, índice de peróxidos, coeficientes de extinción en el ultravioleta, valoración organoléptica) y el color del aceite de oliva, lo que plantea la necesidad de la medida del color de los aceites, sobre todo en cuanto a preferencia del consumidor, para llegar a tener una completa caracterización y valoración del aceite (Pérez et al., 2003; Melgosa et al., 2009).

Las características cromáticas del aceite de oliva pueden variar dependiendo del método empleado para la obtención del mismo, es decir, dependen del sistema de



molienda y batido de la pasta de la aceituna. En general, podemos decir que el color de los aceites de oliva vírgenes se encuentra entre un amarillo no muy intenso y un verde más o menos intenso, dependiendo del contenido relativo de los principales pigmentos (clorofilas y carotenoides) que se encuentran de manera natural en el fruto.

Las clorofilas dan al aceite su color amarillo-verdoso, mientras que los carotenos le confieren un color entre amarillo y rojo (Mínguez-Mosquera et al., 1991). Es interesante resaltar, que los pigmentos también están involucrados en mecanismos de auto-oxidación y foto-oxidación. El nivel de estos pigmentos está relacionado con factores genéticos, grado de maduración de las aceitunas y condiciones físicas durante la extracción del aceite.

Como se ha mencionado anteriormente, los métodos sensoriales oficiales para la evaluación de la calidad del aceite de oliva no requieren la determinación del color; éste se evalúa por medio de métodos instrumentales y se expresa como valores de absorción a longitudes de onda características, o como la medida de sus tres atributos característicos (tono, pureza y luminosidad), o mediante el uso de escalas de referencia específicas como son las escalas ABT (Gutiérrez y Gutiérrez, 1986), UOCS (Melgosa et al., 2004) y MUOCS (Salmerón et al., 2012).

El gusto es la sensación percibida cuando las papilas gustativas son estimuladas por algunas sustancias solubles. Los cuatro sabores básicos característicos son dulce, salado, ácido y amargo.

El aroma que emana de un aceite de oliva virgen es realmente la suma de sensaciones percibidas cuando varios compuestos químicos alcanzan y estimulan los receptores del olor localizados en las neuronas del epitelio olfativo (Carrasco et al., 2010).

Calidad sensorial del aceite de oliva

La caracterización de un alimento es un proceso largo y complejo que normalmente involucra a varias disciplinas científicas. El análisis sensorial debería ser una de ellas y, concretamente, la obtención del perfil descriptivo o “huella sensorial” del producto debería representar una parte fundamental de esa caracterización. En general, cualquier proceso sensorial descriptivo de un alimento debería seguir una serie de etapas que garanticen su objetividad y validez. La calidad sensorial de un alimento indica su nivel de aceptación y apetencia, y generalmente se determina por un conjunto de características evaluadas a



través de los órganos sensoriales. Así, el análisis sensorial se fundamenta en la capacidad de los sentidos para reaccionar ante estímulos químicos, físicos y físico-químicos. El sistema nervioso periférico permite la interconexión entre el entorno y el cerebro, que al estar dentro del cráneo obviamente no puede interactuar directamente con el mundo exterior.

Los cinco sentidos permiten evaluar las siguientes propiedades sensoriales:

- Apariencia (e.g. grado de traslucidez), color, tamaño y forma mediante la vista.
- Consistencia y características relacionadas (e.g. fluidez, viscosidad, dureza, fibrosidad, flexibilidad, etc.) mediante el tacto y el oído.
- Aroma, mediante el olfato.
- Sabor, mediante el gusto.
- Flavor, mediante una combinación del olfato, gusto y tacto.

En el caso particular del aceite de oliva, los atributos de calidad que se pueden detectar a través de los órganos sensoriales no son tan numerosos como en otros alimentos, ya que algunos, como el tamaño, la forma y las sensaciones de dureza, fibrosidad, flexibilidad, etc., no son significativas en alimentos líquidos, y otros atributos, tales como la turbidez y la viscosidad se pueden medir fácilmente con los instrumentos adecuados. Por lo tanto, sólo el color, el olor, el sabor, junto con sensaciones tales como aceitoso, fluido, picante, astringente, etc., suelen ser importantes en la evaluación de la calidad sensorial de los aceites de oliva.

A pesar del progreso que se ha hecho en las últimas décadas en el campo analítico y el esfuerzo realizado por numerosos grupos de investigación para identificar y cuantificar los compuestos químicos volátiles y no volátiles responsables del flavor y sus interrelaciones, hay ciertas cuestiones que no pueden resolverse completamente usando sólo el análisis instrumental. El análisis sensorial es, por tanto, un medio muy efectivo para evaluar diferencias cualitativas y cuantitativas en los estímulos sensoriales originados por los alimentos, y para determinar si estos son del agrado de los consumidores o su nivel de preferencia (Carrasco et al., 2010).

La evaluación sensorial de los aceites de oliva vírgenes se puede justificar por una de las 5 razones siguientes (Angerosa, 2003):



- Establecer una calidad básica del producto que verifique la ausencia o presencia de defectos sensoriales y su intensidad correspondiente.
- Determinar la pertenencia de un aceite a una denominación de origen protegida (DOP).
- Poner de manifiesto modificaciones de los perfiles sensoriales en relación con la variedad, origen geográfico, tecnología y tiempo de vida del producto.
- Encontrar características sensoriales críticas en la preferencia de los consumidores.
- Evaluar, en términos sensoriales, las diferencias en preferencia entre consumidores habituales y potenciales.

2.3.4.- EL COLOR DEL ACEITE DE OLIVA

El color del aceite de oliva es un indicador de su calidad y, aunque su medida no es requerida por la regulación de la Comunidad Económica Europea (CEE, 1991) en la determinación oficial de las características del aceite de oliva, tiene un papel importante, entre otras razones, porque es un parámetro independiente de los mencionados por el Comité Oleícola Internacional (COI, 1987). Más aún, desde el punto de vista del consumidor, la especificación precisa del color de los aceites de oliva se hace necesaria para una completa valoración y caracterización del mismo (CEE, 1991; Martínez et al., 2010). El color es un primer criterio de juicio sobre la calidad del aceite de oliva, que influye notablemente sobre las preferencias del consumidor y puede también afectar a las decisiones de los expertos que trabajan en paneles de cata. Esta influencia sobre la aceptabilidad del alimento por parte del consumidor ha despertado un gran interés entre productores y elaboradores, y ha impulsado en los últimos años el desarrollo de técnicas y aparatos de fácil manejo en la industria e incluso en el campo (Calvo et al., 2001; Meléndez-Martínez et al., 2005), así como también nuevas líneas de investigación sobre la relación existente entre coordenadas colorimétricas y contenido en pigmentos (Meléndez-Martínez et al., 2003; Ruiz et al., 2005).

Para la caracterización de los aceites de oliva, son numerosos los estudios realizados que utilizan sus componentes químicos mayoritarios, como son los ácidos grasos (Alonso y Aparicio, 1993), y muy pocos los que utilizan componentes minoritarios (polifenoles, esteroides, alcoholes triterpénicos y pigmentos).

Entre los primeros estudios en los que se utiliza el contenido en pigmentos como variable para la caracterización está el realizado por Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera en el año 1996b. Actualmente para la caracterización, tipificación y análisis de autenticidad de aceites italianos y griegos se está utilizando información como la de la fracción clorofílica y carotenoide, o luteína y β -carotenos, entre otras (Ranalli et al., 2005; Giuffrida et al., 2007).

En esta Tesis se va a obtener el perfil colorimétrico de diferentes AOVE's enriquecidos con antioxidantes o carotenoides (luteína y β -caroteno) procedentes de microalgas, basándonos en los parámetros colorimétricos de tales aceites en el espacio CIELAB (L^* , a^* , b^*). Desde 1976 la Comisión Internacional de Iluminación (CIE) ha recomendado dicho espacio, junto con CIELUV, para la especificación cuantitativa del color (CIE, 2004). Actualmente en todas las aplicaciones industriales que tratan con objetos de color CIELAB es mucho más empleado que CIELUV (Kuehni, 1990), que casi sólo se emplea en las industrias relacionadas con fuentes de luz e iluminación. Hay que mencionar también que la adición de antioxidantes a aceites de oliva produce a veces colores que están fuera del rango proporcionado por las escalas ABT (Gutiérrez y Gutiérrez, 1986), UOCS (Melgosa et al., 2004) y MUOCS (Salmerón et al., 2012), motivo por el que en esta Tesis se ha decidido usar CIELAB como espacio de especificación del color en lugar de estas escalas específicas de color de aceites de oliva vírgenes extra.

Los pigmentos responsables del color del aceite de oliva forman parte de los componentes minoritarios y no tienen relación química con los ácidos grasos. Estos pigmentos están involucrados en los mecanismos de auto-oxidación y foto-oxidación, y se pueden dividir en dos grupos: clorofilas y carotenoides. Las clorofilas son las responsables del color verde del aceite y los carotenoides del amarillo. Cada estado de madurez de la aceituna tiene unos valores diferentes de concentración de pigmentos (Moyano, 2002).

La concentración de clorofilas en los aceites va a depender, entre otros factores, del sistema empleado en la extracción. En centrifugación directa el contenido en clorofilas es mayor que mediante el prensado clásico. También depende de la madurez y del tipo de frutos, siendo superior el contenido en clorofilas en las primeras épocas del periodo de recogida de la aceituna (Mínguez-Mosquera et al., 1991).

El contenido de carotenoides del aceite de oliva varía de 5 a 100 mg/kg. De todos ellos, el mayoritario es la luteína (2-8 mg/kg) y, al igual que en las clorofilas (su concentración varía entre 1 y 20 mg/kg), su cantidad depende del método de extracción, entre otros parámetros (Baeten et al., 2001; Cichelli y Pertesana, 2004).



2.4.- FUNDAMENTOS DE CIENCIA DEL COLOR

2.4.1. ESPECIFICACIÓN DEL COLOR

El color es una percepción que se genera en el cerebro al interpretar las señales nerviosas que le envían los fotorreceptores de la retina del ojo, que a su vez son sensibles a las distintas longitudes de onda del espectro electromagnético de la luz. Se puede decir que el color de los objetos no existe por sí mismo, es sólo una percepción del cerebro, que a menudo está también relacionada con las condiciones de observación de dichos objetos (Fairchild y Melgosa, 2012).

El fenómeno de la percepción del color puede ser dividido en dos partes, en una primera aproximación. La primera parte consiste en fenómenos de tipo físico-químico y requiere usualmente de la conjunción de tres elementos: una fuente de luz, un objeto y un detector. La interacción de la luz con el objeto puede dar lugar a fenómenos físicos como la refracción, la transmisión, la dispersión, etc. En la segunda parte ocurren una serie de procesos complicados y no del todo conocidos donde el receptor (el ojo) transmite información al cerebro que la interpretará como color (Delgado-Vargas y Paredes-López, 2003).

El color depende de la luz y consecuentemente de la fuente de ésta. La luz está compuesta de diferentes longitudes de onda de radiación y la luz visible es el componente más importante en relación a la apreciación del color (la luz ultravioleta también tiene cierta influencia, en particular en materiales fluorescentes y fosforescentes). La luz visible comprende una parte muy pequeña del espectro electromagnético, con radiaciones de longitudes de onda comprendidas entre 380 y 780 nm en el vacío, aproximadamente (Figura 2.4). Los colores percibidos por el ojo humano están asociados con la radiación de luz en los siguientes rangos de valores, aproximadamente: azul-violeta ($380 < \lambda < 480$ nm), verde ($480 < \lambda < 560$ nm), amarillo ($560 < \lambda < 590$ nm), naranja ($590 < \lambda < 630$ nm) y rojo ($630 < \lambda < 780$ nm).

En nuestra vida diaria, estamos rodeados por un elevado número de colores. Los sujetos con visión normal del color (en torno al 94% de la población) a menudo no damos importancia a la percepción del color pero éste tiene una gran presencia en nuestras vidas: influye en nuestros gustos en la selección de alimentos y otros tipos de compras, a la hora de seleccionar información en mapas o páginas web, etc. Aunque los colores nos afectan mucho y su importancia es creciente, nuestro conocimiento del color y de su



control es aún incompleto, lo que conduce a una gran cantidad de problemas a la hora de diseñar y mantener el color de un producto. Como el juicio se hace frecuentemente de acuerdo con la impresión o la experiencia personal, es necesario utilizar estándares comunes y uniformes, tales como los observadores patrón propuestos por la CIE, con el fin de poder obtener una especificación universal, rigurosa y precisa del color.

Incluso cuando tan sólo miramos a nuestro alrededor, una gran variedad de colores entra en nuestros ojos. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre con la longitud o el peso, no existe una escala física sencilla para medir el color, y no todo el mundo contesta del mismo modo cuando se le pregunta por un color determinado (Konica Minolta, 2007). El color percibido es realmente un ente complejo, en el que aún no está completamente determinado el número de dimensiones o variables independientes que es necesario considerar (Fairchild, 2005). Normalmente se considera que en el color se pueden distinguir tres dimensiones o atributos (tono, claridad y saturación), por simplicidad de representación (e.g. en los atlas de color, como el Munsell, NCS, etc.).

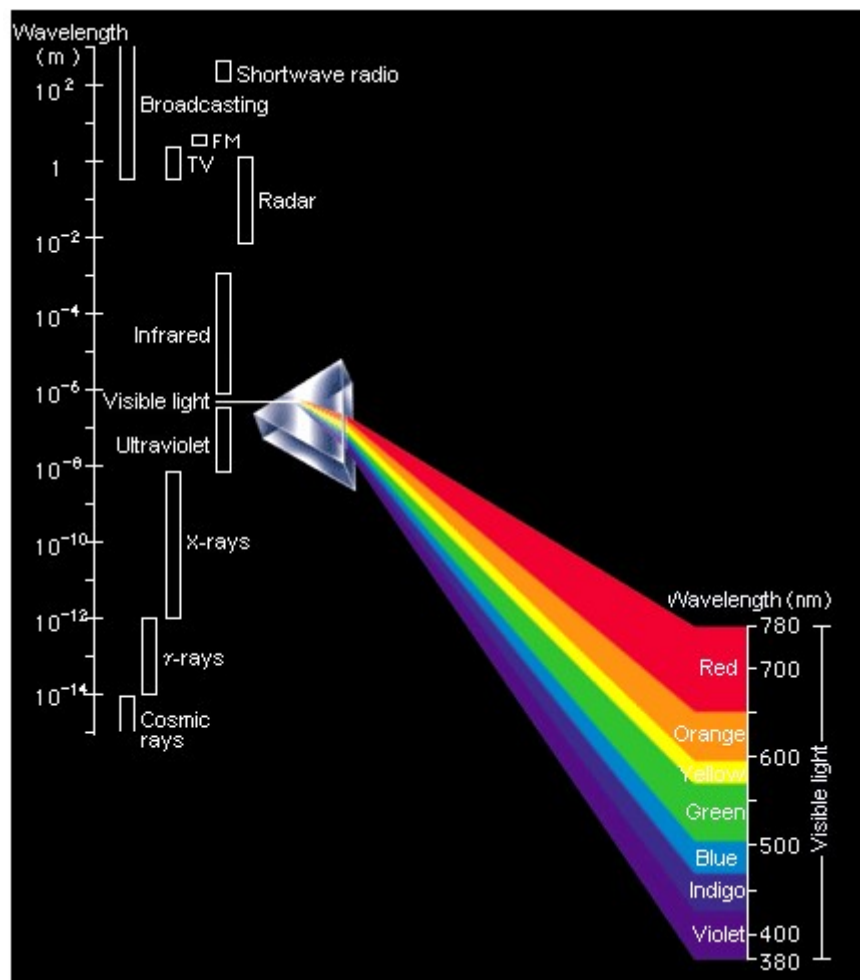


Figura 2.4

Espectro electromagnético (izquierda), zona visible del espectro (derecha).

El color es una cuestión de percepción y de interpretación subjetiva, por lo que en los experimentos suele haber una variabilidad inter-observador (de unos observadores respecto a otros) e intra-observador (de un mismo observador repitiendo varias veces el mismo experimento) no despreciables, que siempre es preciso tener en cuenta. En todo caso, la especificación del color mediante palabras es muy imprecisa, como también lo es la especificación acudiendo a conjuntos de muestras con una ordenación sistemática, tal como las que se presentan en los llamados “atlas de color”. Afortunadamente, la Comisión Internacional de Iluminación (CIE) ha establecido las bases para la especificación numérica del color (CIE, 2004), que tiene su punto de partida en los llamados valores triestímulo X , Y , Z , en cuya definición intervienen los tres elementos básicos de la percepción del color antes mencionados: fuente de luz, objeto y sistema visual humano. A partir de los valores triestímulo, la CIE ha propuesto también espacios de color más apropiados que el espacio de los valores triestímulo (e.g. los espacios CIELUV y CIELAB), en los que se pueden distinguir o calcular los 3 principales atributos de la percepción cromática: tono, claridad y saturación, que se definen en los párrafos siguientes.

Tono

El tono (*hue* en inglés) es el atributo del color más intuitivo o fácil de entender, ya que es a lo que nos referimos cuando en el lenguaje corriente decimos que un objeto es rojo, anaranjado, amarillo, verde, azul, violeta, rosa, marrón, púrpura, etc. El blanco, el negro y el gris son también colores, pero sin cromaticidad (acromáticos) o con tonos neutros. Los colores que habitualmente distinguimos en el arco iris son un buen ejemplo de algunos de los tonos o colores no acromáticos. Las parejas de tonos rojo-verde y azul-amarillo suelen denominarse oponentes, por la imposibilidad de obtener un estímulo que sea percibido simultáneamente como rojo y verde (o como azul y amarillo). Además, la mezcla aditiva de los tonos rojo y verde (o azul y amarillo), en proporciones apropiadas produce estímulos neutros (colores acromáticos) en las denominadas experiencias de cancelación de tono. La continuidad de tonos da como resultado las denominadas ruedas de color o círculos de tonos (e.g. Figura 2.5, arriba), en las que suelen aparecer los tonos en el mismo orden en que los vemos en el arco iris, y los extremos azul y rojo están conectados mediante los colores denominados púrpuras. Los tonos púrpura son estímulos no espectrales (no aparecen en los espectros de ninguna sustancia) que se obtienen por mezcla aditiva de los tonos azul y rojo correspondientes a los extremos del espectro visible.



Claridad-Luminosidad

Con independencia de su tono, un estímulo de color cualquiera puede ser más o menos luminoso, es decir tener más o menos cantidad de luz. Así, hablamos de colores claros y oscuros según que su luminosidad sea alta o baja. La luminosidad puede medirse independientemente del tono. Si se observa la parte inferior de la Figura 2.5 (que es un corte transversal de la superior, a lo largo de la línea recta que une A (verde) y B (rojo-púrpura)), la luminosidad aumenta hacia la parte superior y disminuye hacia la parte inferior. El negro y el blanco son estímulos acromáticos de luminosidad baja y alta, respectivamente. La claridad es la luminosidad relativa de un estímulo, es decir la luminosidad de un estímulo en comparación con un blanco patrón iluminado de la misma manera que el estímulo. Un mismo trozo de papel blanco observado a plena luz del sol y a la sombra presenta diferente luminosidad, pero su claridad o luminosidad relativa no varía.

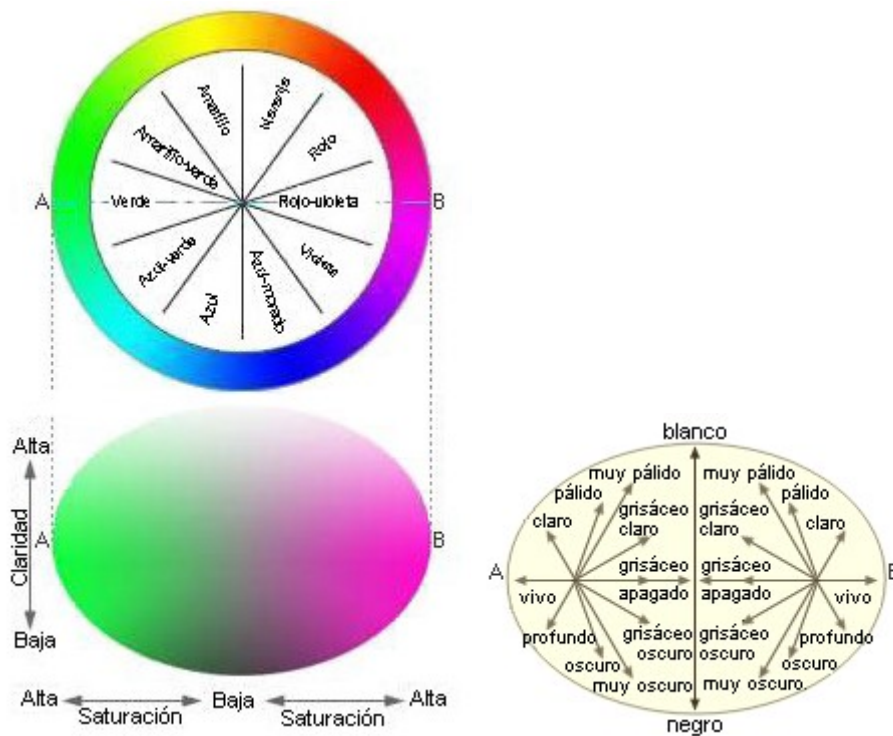


Figura 2.5

Rueda del color. Ejemplo de un círculo de tonos y de los atributos de claridad y saturación

Saturación

Con independencia del tono y luminosidad, los estímulos de color pueden ser más o menos vivos o intensos. Así, los colores espectrales (producidos por las lámparas espectrales de los distintos elementos químicos) son muy vivos, pero si les añadimos blanco se van haciendo menos vivos o más pálidos, y se puede decir que se van “desaturando”. Existe pues un tercer atributo del color, completamente independiente del tono y de la luminosidad, que podemos llamar “saturación”. En realidad, la literatura específica (Fairchild, 2005) considera aquí varios atributos distintos, denominados “colorido”, “croma” y “saturación”, pero no entraremos aquí en su distinción por estar fuera de los objetivos de esta Tesis. Prestando atención de nuevo la Figura 2.5, se aprecia que la saturación cambia para los estímulos rojo-púrpura y verde respectivamente, a medida que cambia la distancia horizontal respecto al centro. Los colores son apagados o poco saturados cerca del centro y se hacen más vivos o saturados a medida que nos alejamos del centro. En una escala ideal que fuera del blanco al negro pasando por los grises (lo que se denomina una escala de grises) tenemos una serie de estímulos acromáticos o de saturación nula. En la parte derecha de la Figura 2.5, se muestran algunos adjetivos generalmente utilizados para describir la luminosidad y la saturación de los colores.

Tono, luminosidad y saturación son por lo tanto los tres atributos principales del color y pueden combinarse para crear el llamado sólido de color, un ente tridimensional como el que se muestra en la Figura 2.6a. Los tonos conforman círculos centrados en el eje del sólido, con la luminosidad como variable en la dirección vertical y la saturación como variable en la dirección horizontal (Figura 2.6b). El *Munsell Book of Color* o atlas de color Munsell es una famosa colección de muestras de color con un total de 40 páginas, en cada una de las cuales se tiene un conjunto de muestras con un mismo tono (Hue), en las que la claridad (Value) varía en la dirección vertical y la saturación (Chroma) en la dirección horizontal (Figura 2.7). Este atlas sería una posible ejemplificación del sólido de color al que nos estamos refiriendo.



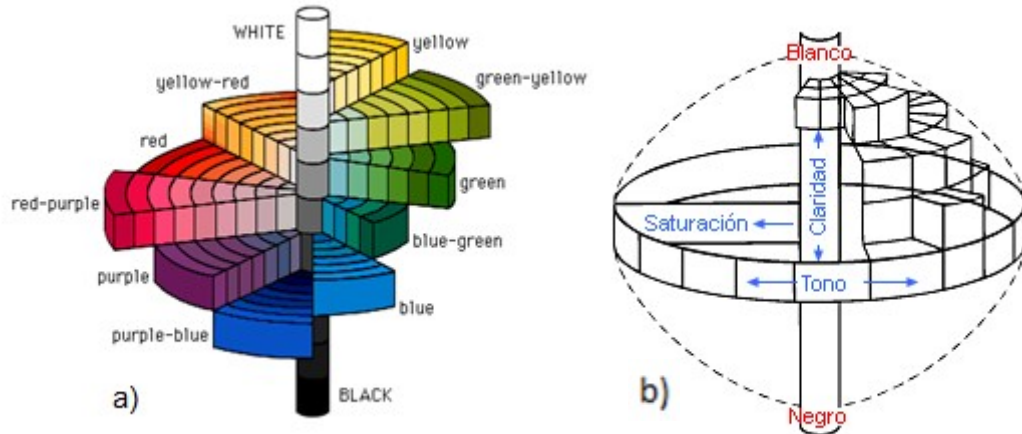


Figura 2.6

Diferentes representaciones de los atributos del color en el sólido de color

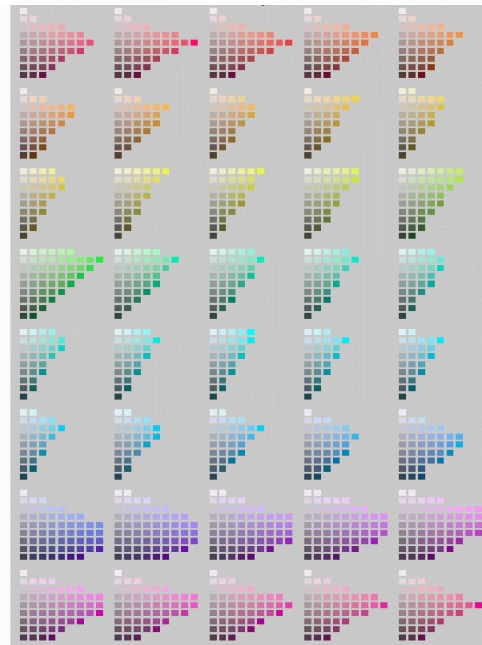


Figura 2.7

Representación de las 40 cartas o tonos (Hue) del atlas Munsell

Como ya se ha dicho, el color es una percepción, de modo que estrictamente hablando, un objeto (e.g. una muestra de aceite de oliva) no tiene un color fijo, más bien su color percibido depende de varios factores, como, por ejemplo, el tipo de luz que lo ilumina. Un mismo objeto tiene una apariencia diferente según la fuente que lo ilumine: la luz del sol, una bombilla convencional, o una lámpara fluorescente. En realidad, cuando se dice que el color percibido es el resultado de la interacción de la luz que ilumina con el objeto y con el sistema visual humano, sólo estamos haciendo una primera aproximación al problema, pues de hecho, el color percibido de un objeto puede depender también de otros factores adicionales. Por ejemplo, es bien sabido que el fondo o campo circundante de un

cierto estímulo influye en el color percibido de dicho estímulo, de manera que, por ejemplo, un fondo claro/oscura induce un color oscuro/claro: son los llamados efectos de contraste simultáneo o de inducción cromática, que son más notables cuando disminuye el tamaño del estímulo respecto al del campo circundante. En las cabinas de iluminación convencionales el suelo y las paredes suelen ser de un color gris neutro, a fin de evitar estos efectos de inducción cromática a la vez que se controla la luz que incide sobre el objeto. El tamaño del objeto también puede tener una cierta influencia en el color percibido según investigaciones recientes (Xiao et al., 2011), de modo que un mismo estímulo nos parece un poco más luminoso y saturado cuando su tamaño es grande, sin que el tamaño tenga una influencia destacable en la percepción del tono. Esto tiene ciertas implicaciones prácticas, por ejemplo a la hora de elegir la pintura de una pared grande a partir de los colores disponibles en un determinado muestrario o atlas de color en el que las muestras disponibles son usualmente de tamaño bastante pequeño. Algunos materiales (e.g. algunas pinturas metalizadas usadas en las carrocerías de coches) tienen propiedades gonioaparentes; es decir, su color cambia con la dirección de iluminación y observación. Estos materiales gonioaparentes son bastante atractivos para algunos diseñadores y consumidores, pero la caracterización precisa de su color es bastante complicada, requiriendo como mínimo del uso de espectrofotómetros multiángulo (Melgosa et al., 2014).

Por último, se puede también mencionar que aún dentro de lo que se denominan personas con “visión normal del color” existen diferencias en la percepción del color que pueden tener cierta relevancia. Por ejemplo, es conocido que con la edad hay cambios en la visión del color, como consecuencia de la disminución del tamaño pupilar, amarilleamiento del cristalino, cambios retinianos, etc. El envejecimiento generalizado de la población occidental hace que el estudio de estos cambios y la elección de diseños válidos para personas de todas las edades (en señalización visual, páginas webs, etc.) sea un tema de creciente interés en la actualidad.

2.4.2.- ESPACIOS DE COLOR

Se han propuesto distintos métodos para cuantificar el color y expresarlo numéricamente con el objetivo de poder comunicar los colores de un modo universal y preciso. Por ejemplo, para intentar mejorar la imprecisión que conlleva la especificación del color mediante el uso de palabras, en 1905 el artista estadounidense A. H. Munsell creó un método de ordenación de los colores y lo materializó realizando el “atlas de color” Munsell: un gran número de muestras de papel con distintos colores clasificadas de acuerdo con su método de ordenación, en el que se distinguen los atributos de tono



(Hue), claridad (Value) y saturación (Chroma). La comparación visual de las muestras del atlas con una muestra de color dada nos permite especificar el color de dicha muestra mediante tres parámetros relacionados con los atributos antes mencionados. Concretamente, mediante el atlas Munsell cualquier color se expresa como una combinación de letras y números (H V/C) en términos de su tono (H), claridad (V) y croma (C), según una comparación visual que a veces puede resultar problemática. Por ejemplo, a menudo el color buscado no coincide con ninguna de las muestras del atlas Munsell, lo que hace necesario realizar una interpolación visual subjetiva entre las muestras disponibles en el atlas (o incluso una extrapolación), que puede ser bastante imprecisa.

La organización internacional más importante desde el punto de vista de la estandarización de la luz y el color es la Commission Internationale de l'Éclairage (Comisión Internacional de la Iluminación - CIE), que ha desarrollado varios sistemas para expresar el color numéricamente de forma objetiva. Se trata así de evitar la subjetividad e imprecisión inherentes a la especificación de un color mediante la comparación visual realizada por una determinada persona (o un panel de observadores) mediante el uso de un determinado atlas de color. Los dos sistemas CIE más conocidos son el sistema Yxy , creado en 1931 basándose en los valores triestímulo XYZ , y el sistema $L^*a^*b^*$ (o CIELAB), creado en 1976 para proporcionar diferencias de color más uniformes en relación con las diferencias visuales. Tanto XYZ , como Yxy , o $L^*a^*b^*$ pueden considerarse ejemplos de espacios de color. Un espacio de color es simplemente un sistema de especificación numérica del color mediante el uso de 3 números que varían en escalas continuas (téngase en cuenta que las escalas Munsell de Hue, Value y Chroma no son continuas sino discretas). A veces se deja aparte el atributo de luminosidad (relacionado con el valor triestímulo Y) y entonces los espacios de color quedan reducidos a dos dimensiones que constituyen lo que se llama un "diagrama de cromaticidad" (e.g. el célebre diagrama de cromaticidad CIE xy con forma de huella de caballo). Aún no disponemos de un espacio de color ideal en el que sus 3 dimensiones se correspondan con exactitud con los atributos del color percibido. Tal espacio de color suele decirse que debe ser "uniforme", lo que quiere decir que las diferencias de color visualmente iguales a un estímulo dado, deben ser estímulos situados en dicho espacio sobre la superficie de esferas de un mismo radio centradas en los estímulos dados. CIELAB (o el espacio L^*C^*h derivado de CIELAB) son sólo espacios de color aproximadamente uniformes.



Espacio de color XYZ

Los valores triestímulo X, Y, Z (Ecuaciones 2.1, 2.2 y 2.3) determinan un espacio de color, del que se deriva inmediatamente el espacio de color Yxy , siendo ambos espacios los primeros que fueron propuestos por la CIE en 1931 (CIE, 2004). Como ya se ha dicho, el cálculo de los valores triestímulo de un objeto implica conocer 3 parámetros: 1) la distribución espectral de la fuente de luz que ilumina el objeto (E_λ); 2) la reflectancia o transmitancia espectral del objeto iluminado (R_λ); 3) las sensibilidades espectrales del ojo humano (o sea, las llamadas “funciones de mezcla” $\bar{x}_\lambda, \bar{y}_\lambda, \bar{z}_\lambda$ que constituyen los “observadores patrón” establecidos por la CIE):

$$X = \sum E_\lambda R_\lambda \bar{x}_\lambda \quad \text{Ecuación 2.1}$$

$$Y = \sum E_\lambda R_\lambda \bar{y}_\lambda \quad \text{Ecuación 2.2}$$

$$Z = \sum E_\lambda R_\lambda \bar{z}_\lambda \quad \text{Ecuación 2.3}$$

Más concretamente, el valor triestímulo Y está relacionado con la luminosidad o cantidad de luz, que puede dejarse aparte y considerar sólo las coordenadas de cromaticidad x, y (resultado de normalizar los valores triestímulo mediante su suma) (Ecuaciones 2.4 y 2.5), lo que conduce al diagrama de cromaticidad CIE x, y mostrado en la Figura 2.8.

$$x = \frac{X}{X+Y+Z} \quad \text{Ecuación 2.4}$$

$$y = \frac{Y}{X+Y+Z} \quad \text{Ecuación 2.5}$$

En el diagrama CIE x, y los estímulos espectrales (máxima saturación) están situados sobre el borde curvo del diagrama de cromaticidad (lugar espectral), y el estímulo acromático (blanco) aproximadamente en su centro, mientras que los extremos azul y rojo del espectro visible quedan conectados por una línea recta denominada línea de púrpuras. La saturación o croma de los estímulos en este diagrama crece conforme nos aproximamos al lugar espectral o a la línea de púrpuras (Figura 2.8).

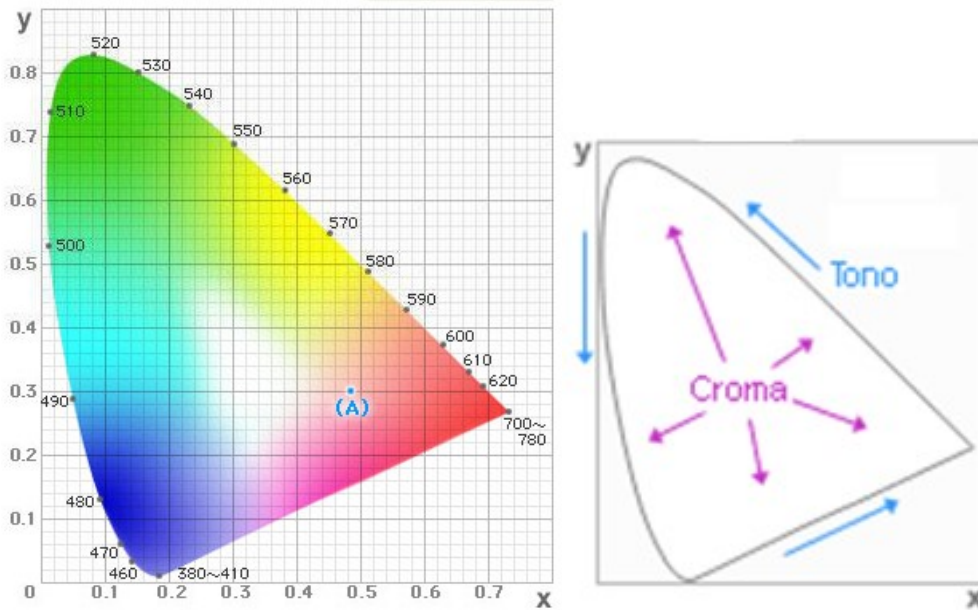


Figura 2.8

Diagrama de cromaticidad CIE x, y basado en el espacio de color XYZ.

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

El espacio de color $L^*a^*b^*$ (también llamado CIELAB) es actualmente uno de los espacios más populares para medir el color de los objetos y se utiliza ampliamente en casi todos los campos. Es uno de los espacios de color aproximadamente uniformes definidos por la CIE en 1976 para resolver uno de los principales problemas del espacio Yxy : en este último espacio iguales distancias no se correspondían en absoluto con iguales diferencias de color percibidas. En CIELAB, L^* indica claridad (luminosidad relativa) mientras que a^* y b^* indican cromaticidad (Figura 2.9). Las ecuaciones de cálculo de las coordenadas L^* , a^* , b^* a partir de los valores triestímulo X, Y, Z , suponiendo un determinado blanco de referencia, pueden encontrarse en la literatura (CIE, 2004). En la parte inferior de la Figura 2.9 se muestra el plano de cromaticidad a^*b^* en el que podemos observar que $+a^*$ es la dirección del rojo, $-a^*$ es la dirección del verde, $+b^*$ es la dirección del amarillo y $-b^*$ es la dirección del azul. El centro del plano a^*b^* es un color acromático; a medida que los valores de a^* y b^* aumentan y el punto se separa del centro, la saturación del color se incrementa.

La parte izquierda de la Figura 2.10 es una representación de CIELAB que puede asociarse tanto con el sistema Munsell como con el sólido de color (Figura 2.6) previamente mencionados, lo que hace que el sistema CIELAB resulte para mucha gente bastante intuitivo o fácil de entender. La parte derecha de la Figura 2.10 muestra algunos

adjetivos usualmente empleados para designar los colores situados en distintas zonas del espacio CIELAB.

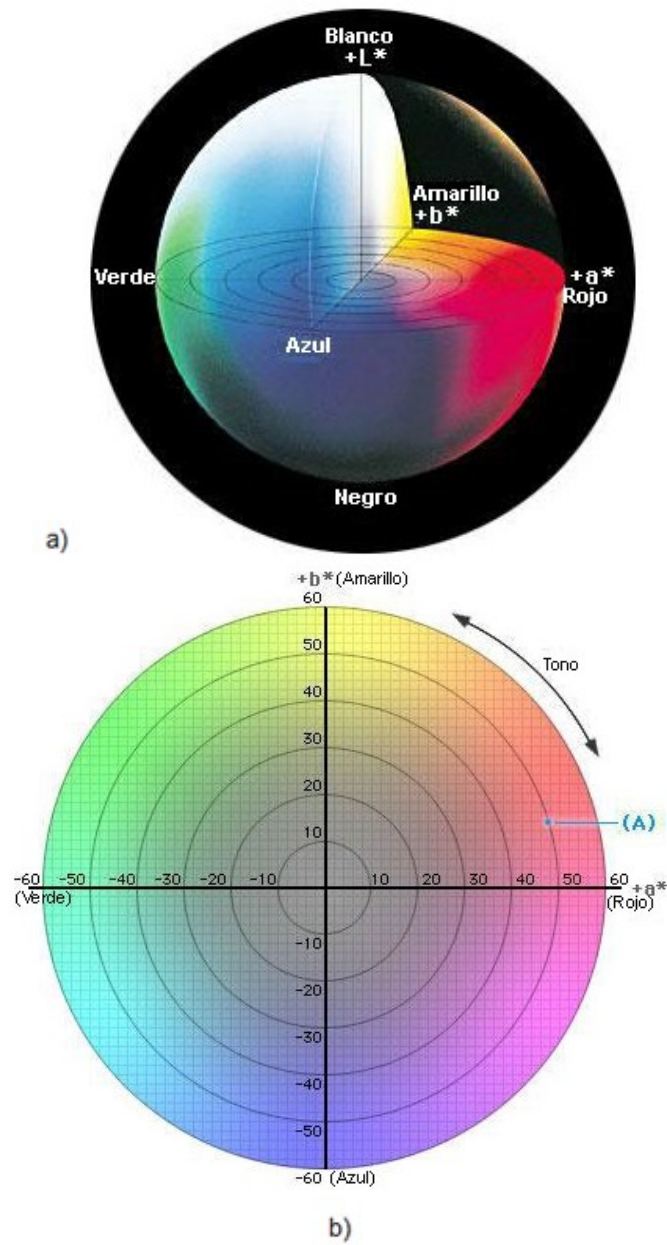


Figura 2.9

- a) Espacio de color CIELAB con las coordenadas $L^*a^*b^*$.
 b) Plano CIELAB con coordenadas a^* y b^* (L^* constante).

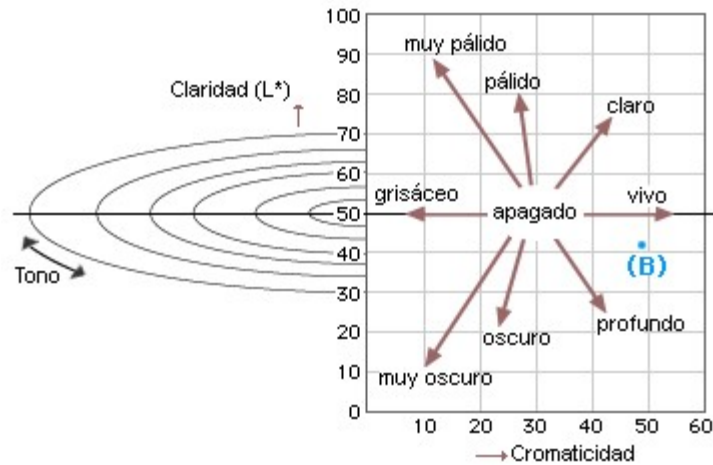


Figura 2.10

Vista del espacio de color $L^*a^*b^*$ (izquierda) y algunos calificativos usados para designar los colores situados en distintas posiciones de este espacio (derecha).

Espacio de color L^*C^*h

El espacio de color L^*C^*h es en realidad el mismo espacio de color $L^*a^*b^*$, pero utilizando coordenadas cilíndricas en lugar de coordenadas rectangulares. En este espacio de color, L^* es la misma claridad (luminosidad relativa) del espacio de color $L^*a^*b^*$, mientras que C^* es el cromatismo CIELAB y h es el ángulo de tono CIELAB (ver Figura 2.11). En realidad, las designaciones oficiales (CIE, 2004) del cromatismo y ángulo de tono en CIELAB son C_{ab}^* y h_{ab} , respectivamente. El valor de cromatismo C_{ab}^* (Ecuación 2.6) es nulo para estímulos neutros o acromáticos (saturación nula), y aumenta de acuerdo con la distancia respecto al centro. El ángulo del tono h_{ab} (Ecuación 2.7) se define comenzando en el eje $+a^*$ y se expresa en grados: 0° sería el eje $+a^*$ (rojo), 90° sería el eje $+b^*$ (amarillo), 180° sería el eje $-a^*$ (verde) y 270° sería el eje $-b^*$ (azul).

$$C_{ab}^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}} \quad \text{Ecuación 2.6}$$

$$h_{ab} = \tan^{-1} \frac{b^*}{a^*} \quad \text{Ecuación 2.7}$$

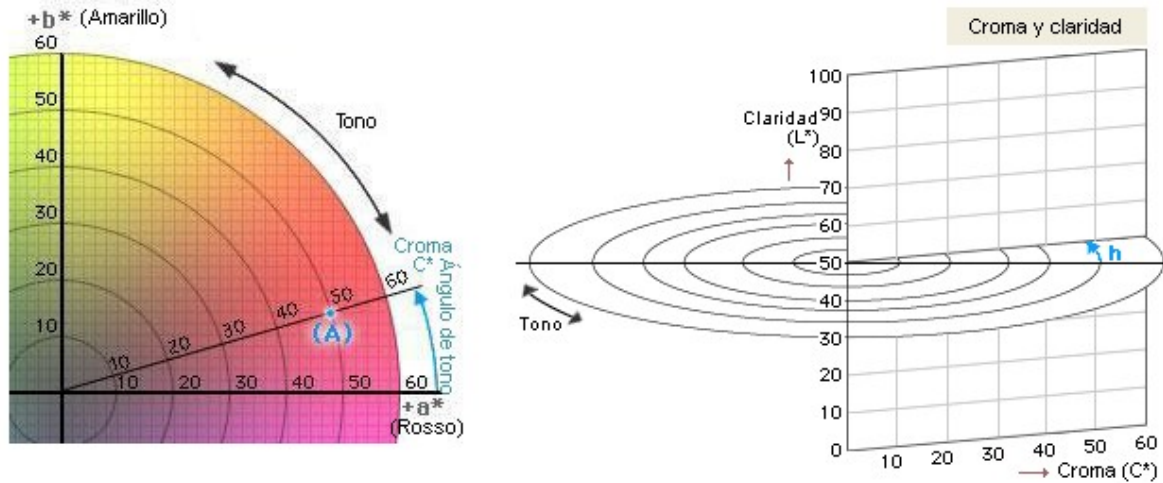


Figura 2.11
Parámetros del espacio de color $L^* C^* h$.

Espacio de color Hunter Lab

El espacio de color de Hunter Lab fue desarrollado por R.S. Hunter y es también un espacio de color más uniforme visualmente que el espacio de color Yxy definido por la CIE en 1931. Similar al espacio de color CIE $L^*a^*b^*$, sigue en uso en varios campos, como la industria de pinturas de los EE.UU., y está incluido en el software de algunos instrumentos de medida del color. Como se ha apuntado, son numerosos los espacios de color propuestos a lo largo de los años, éste es sólo un ejemplo más. En todo caso, conviene hacer notar que los espacios de color actualmente recomendados por la CIE son solamente CIELUV y CIELAB, siendo este último el que más se usa en la práctica, salvo en la industria relacionada con fuentes de iluminación.

2.4.3.- MEDIDA DE LA DIFERENCIA DE COLOR

Desde un punto de vista práctico, más allá de la especificación numérica del color, interesa la medida de diferencias de color. En efecto, dados dos estímulos de color con diferentes coordenadas en un determinado espacio de color, puede ser que la diferencia entre esos estímulos no sea visualmente perceptible (es decir, esté por debajo del umbral de discriminación del ojo humano), en cuyo caso sería una diferencia totalmente aceptable en un proceso de control de calidad industrial. Ahora bien, si esos dos estímulos son percibidos como ligeramente distintos o como muy distintos, el cambio de color podría ser inaceptable en un control de calidad, e indicar que por alguna/s causa/s el color del material ha sufrido una degradación o cambio que es preciso controlar/subsanar. A partir de las coordenadas de color de dos estímulos en un cierto

espacio de color podemos calcular su diferencia de color ΔE , por ejemplo como una simple distancia Euclídea entre dichos puntos.

Una “fórmula de diferencia de color” es un cálculo matemático que, a partir del color de dos estímulos dados, nos da un determinado número ΔE , que debe estar bien correlacionado con la diferencia de color visualmente percibida por sujetos con visión normal del color (ΔV) entre dichos estímulos. Los instrumentos comerciales de medida del color suelen incorporar en su software el cálculo de diferencias de color mediante varias fórmulas de diferencia de color. La distancia Euclídea en CIELAB, ΔE^*_{ab} (Ecuación 2.8), es una de las fórmulas de diferencia de color más usuales (Figura 2.12), y afortunadamente esta distancia puede expresarse también como el resultado de las diferencias en claridad (ΔL^*), croma (ΔC^*_{ab}) y tono (ΔH^*_{ab}) CIELAB (Ecuación 2.9), lo cual resulta bastante más intuitivo al ser éstos los 3 atributos básicos del color percibido:

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Ecuación 2.8}$$

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta C^*_{ab})^2 + (\Delta H^*_{ab})^2]^{1/2} \quad \text{Ecuación 2.9}$$

donde el símbolo Δ indica la diferencia de la magnitud correspondiente entre las 2 muestras cuya diferencia de color se desea calcular, salvo en el caso de la diferencia de tono, ΔH^*_{ab} , que está relacionada con la diferencia en ángulo de tono (Δh_{ab}), calculándose mediante la Ecuación 2.10 (CIE, 2004):

$$\Delta H^*_{ab} = 2\sqrt{C^*_{ab,1}C^*_{ab,2}} \sin\left(\frac{\Delta h_{ab}}{2}\right) \quad \text{Ecuación 2.10}$$

donde dentro del radicando aparecen los valores del croma CIELAB de las 2 muestras comparadas.

La ecuación 2.9 permite calcular los porcentajes de diferencia en claridad, croma y tono que hay en una diferencia de color total ΔE^*_{ab} . La Figura 2.13 muestra algunos términos utilizados para describir diferencias en claridad y croma en CIELAB. Sin embargo, desde el punto de vista perceptivo, suele ser frecuente que las diferencias de claridad, croma y tono CIELAB tengan distinto peso o importancia en la diferencia de color total. En efecto, a partir de esta idea se han propuesto numerosas fórmulas de diferencia de color basadas en CIELAB que a menudo son mucho más eficientes que la propia fórmula CIELAB (Ecuaciones 2.8 y 2.9), en el sentido de predecir mejor los



resultados de la percepción visual humana (Melgosa et al., 2014). Un ejemplo de una fórmula de este tipo es CIEDE2000 (CIE, 2004), que es la fórmula de diferencia de color actualmente recomendada por ISO y CIE como estándar (CIE, 2013), en particular para una serie de condiciones de observación próximas a las más habituales en las aplicaciones industriales.

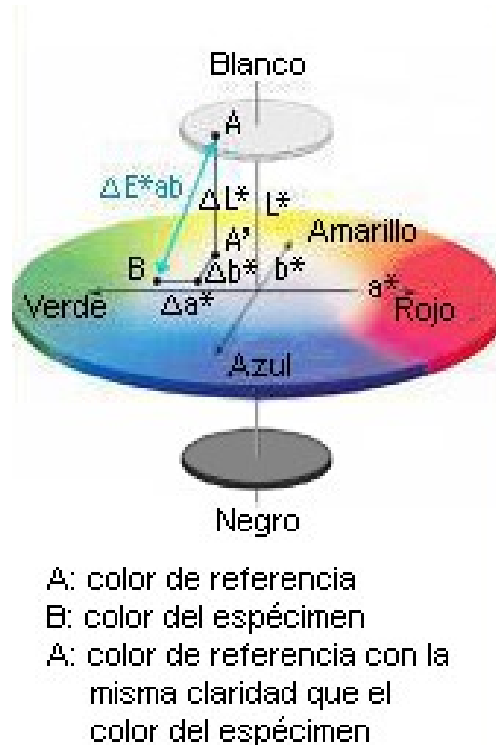


Figura 2.12
 Diferencias de color en el espacio $L^*a^*b^*$.

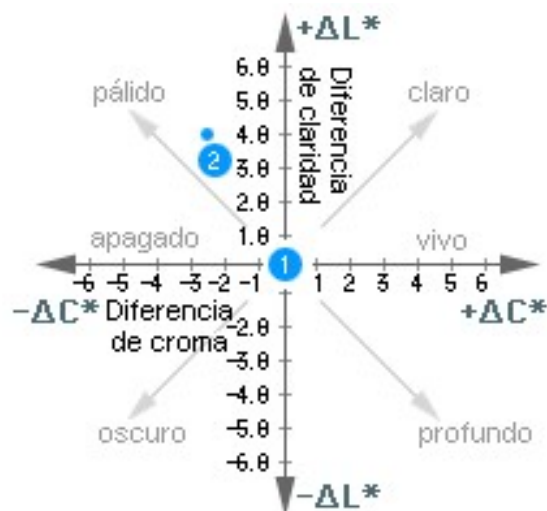


Figura 2.13
 Términos para describir diferencias de color en claridad y cromancia CIELAB.

2.4.4.- EMOCIONES Y PREFERENCIAS SUSCITADAS POR EL COLOR

Definir una emoción es algo bastante complejo. En una primera aproximación se puede decir que en una emoción se desencadena el siguiente proceso: estímulo, reconocimiento del estímulo, conciencia del estímulo, sentimiento subjetivo, comportamiento y efecto de dicho comportamiento (Plutchik, 1980). El color, siendo un estímulo, tiene una fuerte influencia en la generación de emociones en el ser humano. Por ejemplo, algunos colores pueden hacernos sentir felices y otros pueden hacernos sentir tristes. A lo largo de la historia de la psicología hay diversos estudios que relacionan el color y las emociones (Birren, 1978; Johnson et al., 1986). Pero no fue hasta 1997, en el 8º Congreso Cuatrienal de la Asociación Internacional del Color (AIC) en Kyoto, cuando en el mundo de la colorimetría se explicitó el interés por este campo de la psicofísica. Cinco años después, la AIC organizó un congreso en Bangkok en el que el tema principal reunía psicología, colorimetría y diseño dentro del mundo de las emociones de color. En la actualidad, el Comité Técnico 1-86 de la CIE (Presidente: L. C. Ou) trabaja sobre modelos de emociones suscitadas por el color y armonía, lo que supone un reconocimiento explícito al creciente interés que este tema suscita dentro de la comunidad científica dedicada al estudio del color.

Aunque el término “emoción de color” no está del todo bien precisado, una posible definición del mismo seguida por diversos autores es: “(...) aquella consecuencia de un estímulo de color que puede ser expresada a través de las palabras” (Sato et al., 2000; Ou, 2004). Si aceptamos esta definición, la investigación sobre emociones de color tratará de relacionar emoción y color por medio de términos semánticos (Osgood et al., 1957). En estudios iniciales sobre respuestas emocionales al color, Norman y Scott en 1952 indicaron una importante limitación, pues realmente no se medía la respuesta emocional del observador ante un color, sino más bien la respuesta emocional del observador ante materiales de color que se observaban bajo unas determinadas condiciones de iluminación. Es decir, no se tenía en cuenta que las emociones pueden ser evocadas simplemente por el color, sino que se asociaban a la experiencia visual completa. Esta perspectiva resulta muy interesante, ya que conviene hacer notar que en la práctica, por encima de las emociones suscitadas por el color de forma genérica o abstracta, interesa el color de objetos concretos (e.g. aceites de oliva, vinos, ropa, pelo, automóviles, etc.).

Los colores pueden afectar al estado de ánimo de las personas. Por ejemplo, se ha estudiado el comportamiento de 625 personas en 9 oficinas prácticamente iguales, siendo la única diferencia entre ellas que las paredes estaban pintadas de colores distintos



(Kwallek et al., 1996). Se analizó el estado de cada uno de los sujetos antes y después de trabajar en cada una de las oficinas. Los resultados mostraron que las mujeres tendían a un estado depresivo en oficinas de colores poco saturados; al contrario, los hombres tendían a tener este comportamiento en las oficinas cuyas paredes estaban pintadas de colores saturados. Además se mostró con una significación alta una tendencia general a tener más faltas ortográficas cuando se trabajaba en ambientes con las paredes blancas.

Ante la limitación planteada por Norman y Scott, Ou plantea responder a la siguiente pregunta: “Si todos los atributos de apariencia salvo el color están controlados ¿habrá relación directa entre color y emociones?” (Ou, 2004). Para responder a esta pregunta, Ou propone dos niveles emocionales, uno reactivo y otro reflexivo. A nivel reflexivo, el factor dominante es el significado del estímulo visual. Es decir, a este nivel hay que tener en cuenta el contexto bajo el cual el estímulo es percibido. Aislar la interacción entre color y emoción es complicado de hacer a un nivel reflexivo. A nivel reactivo, las emociones están determinadas por las configuraciones del estímulo visual, incluyendo los atributos visuales (como el color, la forma, la textura, etc.) pero manteniendo el estímulo y su contexto sin variación. Esto implica que a un nivel reactivo sí que se puede establecer un enlace directo entre color y emoción. De acuerdo con estas ideas, podemos definir las emociones suscitadas por el color (o emociones de color) (Ou, 2004) como el resultado de la relación entre un estímulo de color y sus correspondientes respuestas a nivel reactivo, usualmente determinadas por la configuración del estímulo y la experiencia visual completa (Gómez-Robledo, 2011).

Es posible llegar a cuantificar las emociones de color. Para empezar, se puede establecer un orden en las emociones de color que percibimos: por ejemplo, dos colores nos pueden parecer cálidos cuando los observamos, pero quizá uno más que el otro. Puesto que el hecho de medir es comparar observables, uno de los objetivos en el campo de las emociones de color es establecer una escala de emociones de color que nos permita relacionar un punto concreto en un espacio de color con una determinada emoción y la “intensidad” de dicha emoción. Así, se han propuesto (Sato et al., 2000) un primer conjunto de ecuaciones para emociones de color, las cuales tratan de relacionar las coordenadas CIELAB de un conjunto de muestras del sistema SCOTDIC (muestras textiles de colores), con pares de emociones opuestas, evaluadas por un amplio grupo de sujetos con visión normal del color. Por ejemplo, para el par de emociones “fuerte-débil” las ecuaciones daban valores comprendidos entre +100 y -100, donde +100 corresponde a lo más “fuerte” que puede resultar un color y -100 a lo más “débil”. La Ecuación 2.11 se

corresponde a la emoción “fuerte-débil”, que fue creada en base a la diferencia de color entre cada estímulo y el color más “débil”, según el trabajo de Sato et al., 2000.

$$CE_{fuerte-débil} = \sqrt{[k_L(L^* - L_0^*)]^2 + [k_a(a^* - a_0^*)]^2 + [k_b(b^* - b_0^*)]^2} + k_M \quad \text{Ecuación 2.11}$$

CE es el valor predicho para esa emoción de color (Color Emotion); L^* , a^* , b^* son las coordenadas CIELAB del estímulo analizado, L_0^* , a_0^* , b_0^* , son las coordenadas del color evaluado como “más débil”, y k_i son las constantes características del modelo. En las investigaciones que se realizan actualmente, para cada uno de los pares de emociones estudiadas se proponen diferentes modelos o ecuaciones de emociones de color, ajustando las respuestas experimentales de grupos de observadores a las coordenadas de color de los estímulos visualizados (Sato, 2000; Xin, 2004). Los trabajos de L.C. Ou tienen un objetivo similar al de T. Sato, 2000: buscar una relación entre las coordenadas de color y la intensidad de cada par de emociones. Pero, a diferencia de los trabajos de Sato, Ou no obtiene la medida de la intensidad de cada una de las emociones promediando las respuestas de los sujetos del experimento sino por medio de la Ley de Thurstone del Juicio Comparativo (Thurstone, 1994) y la Ley de Torgerson del Juicio Categórico (Torgerson, 1958). Estas leyes permiten situar en un continuo psicológico la intensidad percibida de ciertos estímulos sin necesidad de conocer la intensidad física de los mismos.

Relacionado con el tema de las “emociones” suscitadas por el color están las llamadas “preferencias de color”. Una definición simple de preferencia de color es la dada por Nemcsics (1993): “un color es preferido cuando gusta más que otro”. Nuestra intuición nos dice que las preferencias de color deben estar relacionadas con las emociones del color, siendo quizá como una especie de resultado global de las mismas. Según Crozier (1999), “si un azul es un color preferido y la felicidad es una emoción que gusta entonces seguramente el azul estará más asociado con felicidad que con emociones como tristeza”. En la práctica, la frontera entre emociones de color y preferencias de color no está bien definida para muchos autores, llegándose incluso a considerar la “preferencia” como una “emoción” más del tipo “me gusta - no me gusta”. Uno de los estudios más antiguos sobre preferencias de color es el de Cohn, que propuso una aproximación empírica a las mismas, y observó que, aunque una gran cantidad de estudios de preferencias de color están centrados en estudiar distintas combinaciones de color, también hay trabajos que tratan de estudiar la dependencia de las preferencias de color con distintos factores como la edad, el género o las diferencias culturales (Cohn, 1984). Por otro lado, Goethe sugirió que los



colores tienen un contenido o significado psicológico intrínseco. Al igual que Norman y Scott habían propuesto anteriormente para las emociones de color, las preferencias de color están ligadas a un determinado contexto o situación concreta. Por ejemplo, el color preferido para un coche, puede ser muy distinto del preferido para el exterior de una casa, o una bebida, etc. Se habla así de preferencias de color "ligadas al contexto", habiéndose estudiado preferencias de color en muy distintos ámbitos (Roa et al., 2001).

La edad ha sido un factor importante en la investigación sobre preferencias de color. Por un lado, ciertos autores sugieren que la edad tiene una gran influencia en las preferencias de color (Norman y Scott, 1952), mientras que otros apuntan justo lo contrario (Dorcus, 1926; Child et al., 1968). También parece ser objeto de debate en preferencias de color la influencia que pueda tener el sexo de los sujetos. Unos trabajos muestran que hay diferencias evidentes (Garth, 1924; Shen, 1937) mientras que otros concluyen que no hay muchas diferencias entre hombres y mujeres (Child et al., 1968; Eysenck, 1941; Camgöz et al., 2002). Históricamente parece que ha habido una cierta evolución desde principios del siglo XX hasta la actualidad, en la que las diferencias entre resultados para distintos sexos han disminuido. Otro factor estudiado en las preferencias de color es la influencia de la cultura del observador; es decir, podría haber distintas preferencias de color en función de la raza, el entorno social, etc. La mayor parte de los estudios sugieren que hay diferencias importantes en función de la cultura. Así, se han encontrado diferencias entre indios "puros", blancos "puros" y mestizos (Garth, 1922) y también diferencias entre sujetos de Irán y Kuwait (Choungorian, 1968). Otros autores indican que existen diferencias entre culturas aunque no son tan marcadas como sería de esperar, y han desarrollado modelos predictivos que relacionan las coordenadas CIELAB de los estímulos con la intensidad de la emoción y la preferencia de color (Xin et al., 2004 y Ou et al., 2004a, 2004b y 2004c). Se han comparado de sujetos procedentes de Japón, Corea y Taiwán (Xin et al., 2004), así como de sujetos de Reino Unido y Taiwán (Ou, 2004; Gómez, 2011). El estudio de preferencias y emociones de color considerando sólo sujetos con visión normal del color es otro aspecto común a la mayoría de las investigaciones que se han realizado hasta ahora, con muy pocas excepciones (Álvaro et al., 2015). No obstante, es generalmente reconocido que hay que prestar una mayor atención al estudio y resolución de los problemas relacionados con visión defectiva del color, que afectan a un número importante de personas, especialmente varones (Lillo et al., 2014).

En definitiva, puede decirse que la influencia de la edad, el género y la cultura sobre las preferencias y emociones de color es actualmente un tema bastante abierto, especialmente cuando se trata de preferencias y emociones de color ligadas a contextos



específicos. Este es el caso de la presente Tesis Doctoral en la que nos referiremos a las preferencias y emociones suscitadas por el color de aceites de oliva vírgenes extra puros y con adición de determinadas concentraciones de antioxidantes procedentes de un tipo concreto de microalga. Aunque sería deseable poder estudiar todas las posibles variables con influencia en los resultados, por el momento nuestro estudio en esta Tesis se ha restringido a la variable que nos parece que puede ser más importante: el hecho de que los sujetos que realizan el experimento de emociones de color sean o no españoles o, dicho de otro modo, el hecho de que dichos sujetos estén acostumbrados o no al consumo del aceite de oliva.

2.5.- FACTORES QUE INFLUYEN EN EL COLOR Y AFECTAN A LA PRESENCIA DE ANTIOXIDANTES EN EL ACEITE DE OLIVA

Como se ha comentado anteriormente, el aceite de oliva virgen es el zumo natural de un fruto, que puede consumirse directamente, a diferencia de cualquier otro tipo de aceite vegetal. Debido a esta forma “natural” de obtención, todo el proceso, desde el olivo hasta que el aceite llega al consumidor, debe estar controlado para conseguir y mantener aceites de oliva de calidad.

En principio, cualquier variedad de aceituna es apta para obtener aceites de buena calidad, siempre que se utilicen las técnicas de cultivo adecuadas y todas las operaciones del proceso de elaboración se realicen en las mejores condiciones. Sin embargo, si se quieren obtener aceites con determinados atributos positivos es necesario partir de determinadas variedades que puedan aportar estos atributos.

Según algunos autores, la variedad es la variable más importante para caracterizar las diferentes producciones olivícolas (Fiorino y Nizzi, 1991; Pannelli y Servili, 1991), mientras que en otros casos se piensa que las diferencias en composición debidas al estado de maduración son mucho mayores que las propias del cultivar (Civantos et al., 1999). Se han realizado algunos trabajos específicos en los que se considera la variación del color del aceite de oliva virgen extra como consecuencia de la variedad y estado de madurez de la aceituna, así como de la campaña de cosecha (Moyano, 2002; Melgosa et al., 2005).

La influencia de la variedad de aceituna en las características químicas del aceite de oliva se debe, por un lado, a la acumulación de determinados triglicéridos y, por otro, y en mayor medida, a la formación y evolución de los otros componentes. De las técnicas



de cultivo, la que más influye en la obtención de aceites de calidad es la protección fitosanitaria del árbol. Para alcanzar esta calidad es absolutamente necesario que los frutos se conserven sanos y que permanezcan en el árbol hasta el momento de la recolección. La tecnología de extracción y separación puede modificar la cantidad de pigmentos liposolubles que pasan a las diversas fracciones aceite/agua/orujo, por lo que parece necesario conocer mejor su contenido en las diversas partes del fruto, la influencia de los mecanismos de extracción y sus relaciones de dispersión en las distintas fracciones de la elaboración. De los numerosos factores que influyen en la calidad del aceite de oliva virgen, algunos de ellos, tales como la variedad de aceituna, el grado de maduración o el sistema de extracción utilizado, inciden directamente sobre las características organolépticas, y concretamente sobre el color (Humanes y Civantos, 1992; Fedeli, 1996; Alba et al., 1997; Uceda y Hermoso, 1999; Civantos, 2009). Como es de imaginar, existe una gran cantidad de factores que influyen sobre la presencia de antioxidantes en el aceite de oliva virgen, los agronómicos y los tecnológicos (también conocidos como industriales o de transformación). En los siguientes epígrafes nos referiremos a todos estos factores, pues su influencia es una referencia de interés para los estudios de esta Tesis, centrados en aceites con antioxidantes procedentes de microalgas, tanto por lo que se refiere a su cambio de color como a su estabilidad física y química.

2.5.1.- FACTORES AGRONÓMICOS

Los factores agronómicos inciden en la calidad del aceite de oliva ya que afectan directamente a la aceituna. Se clasifican en:

Intrínsecos: Aquellos que difícilmente pueden modificarse. Entre ellos se encuentra la variedad y el medio en el que se desarrolla la planta.

Extrínsecos: Son los que pueden ser controlados, con relativa facilidad, por el agricultor. Se pueden incluir en este apartado las prácticas culturales, la recolección y el transporte.

2.5.1.1.- Factores agronómicos intrínsecos

Variedad de aceituna

La variedad de aceituna influye en el color del aceite obtenido en función de la composición en pigmentos que presente. Como se ha dicho anteriormente, las clorofilas comunican la tonalidad verde, y los carotenos participan en la coloración amarillo-rojiza, de modo que la proporción relativa de clorofilas y carotenos es lo que principalmente determina el color resultante del aceite. Algunas variedades producen aceites verdes independientemente del grado de maduración, mientras que otras sólo producen aceites verdes cuando el fruto no está totalmente maduro (Ridgway, 1993).

El estudio de pigmentos cloroplásticos (clorofilas y carotenoides) en frutos de las variedades “Hojiblanca” y “Manzanilla”, ha puesto de manifiesto que la composición cualitativa es idéntica para ambas variedades y que además se mantiene inalterada a lo largo del tiempo, debiéndose las diferencias en el color de las mismas a diferentes cantidades de los pigmentos (Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández, 1986b). Se han señalado diferencias cuantitativas en el contenido en pigmentos entre los frutos de éstas dos variedades, siendo los procedentes de “Manzanilla” los menos pigmentados, y manteniendo, en ambos casos, el mismo grado de diferencia en los distintos estados de maduración (Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández, 1987, 1989).

En el caso de la variedad “Arbequina”, sin embargo, se han identificado algunos pigmentos no encontrados en otras variedades, tales como clorofilidas, xantófilas esterificadas, α -caroteno, ϵ -caroteno, y fitoflueno (Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera, 1999).

También se han observado diferencias varietales relacionadas con el color en aceites procedentes de variedades italianas y de 34 tipos diferentes de olivo catalán, donde se encontraron como tonalidades más frecuentes las comprendidas entre los índices 2/3 y 2/9 de la escala ABT modificada (Tous y Romero, 1992; Ranalli, 1992a; Ranalli, 1992b; Montedoro et al, 1993; Ranalli y Serraiocco, 1996).

Un estudio más reciente sobre la composición de clorofilas y carotenos de 9 variedades de aceites de oliva vírgenes de las principales regiones de producción española ha mostrado, igualmente, diferencias cuantitativas que dependen de la variedad y grado de maduración de los frutos, pero en este caso se ha encontrado que los *cis*- α -carotenos, las



xantófilas mono- y di-esterificadas y la feoforbida “a” fueron pigmentos exclusivos de la variedad “Arbequina”, un hecho que, según los autores, podría ser utilizado como un diferenciador quimo-taxonómico de los aceites de esta variedad (Gandul-Rojas y Mínguez-Mosquera, 1996a).

Estudios posteriores han confirmado la dependencia entre el nivel de pigmentos fotosintéticos en el aceite y la variedad de aceituna, teniendo siempre en cuenta que el grado de madurez de la aceituna es, igualmente, un importante factor a considerar, ya que implica una pérdida gradual de pigmentos clorofílicos y carotenoides y un incremento de compuestos antociánicos. Las velocidades relativas de desaparición de clorofilas y carotenos son marcadamente diferentes entre variedades, implicando que también su velocidad de catabolismo es una característica propia de cada variedad (Roca y Mínguez, 2001).

Factores ambientales

El clima ejerce una gran influencia sobre la composición química y la calidad del aceite. Se ha observado que existe una notable influencia de las condiciones meteorológicas sobre la evolución en el crecimiento del fruto y su maduración (Jacoboni et al., 1999), lo que produce modificaciones del color del aceite de oliva obtenido de una misma planta en distintas cosechas. En un estudio del efecto de los factores agronómicos y estacionales sobre la producción del olivo y las características cualitativas de los aceites se ha puesto de manifiesto que las condiciones climáticas, en particular las precipitaciones, influyen en la composición química de los aceites. Los compuestos que más se ven influenciados son los alcoholes alifáticos, los compuestos fenólicos y los componentes del espacio de cabeza, de particular importancia en lo que respecta a las características organolépticas y de calidad del aceite de oliva virgen (Pannelli et al., 1994). También se ha observado que aceites procedentes de la misma variedad y cultivados en distintas áreas geográficas presentan características significativamente diferentes respecto a la composición aromática, concentración de compuestos fenólicos y composición ácida (Ranalli et al., 1997), mostrando que la tipicidad de los aceites está definida también por la zona de producción y consecuentemente por factores climáticos y edafológicos (De Torres, 2013).

2.5.1.2.- Factores agronómicos extrínsecos

Estado de maduración del fruto

El periodo de crecimiento y desarrollo del fruto del olivo se puede establecer en unos 200 días como cifra media, siguiendo, como en la mayoría de las drupas, una curva doble sigmoideal, con una etapa de latencia inicial y otra final. Se produce una primera fase de crecimiento rápido en la que el endocarpio es el principal tejido en desarrollo. En una segunda fase, de crecimiento lento, el endocarpio se endurece progresivamente y tanto el embrión como el hueso alcanzan su tamaño final que ya no varía. La tercera fase, de crecimiento rápido debido al aumento de tamaño de las células de la pulpa, determina el tamaño real del fruto. En esta fase comienza la biosíntesis del aceite y su acumulación se reduce de manera progresiva, siendo éste el proceso de maduración (Hermoso et al., 1999).

Cuando el fruto está completamente desarrollado, la pulpa representa un 70-90%, el hueso un 9-27% y la semilla (alojada en el interior del hueso) un 2-3% del peso total del fruto. Los componentes mayoritarios de la pulpa y de la semilla son el agua y el aceite. En la pulpa, el agua representa un 50-60% y el aceite un 20-30%. En la semilla, los contenidos de agua y aceite tienen valores del orden del 30 y del 27% respectivamente. Por su parte, el hueso tiene contenidos medios más bajos, del orden del 9% de agua y menos del 1% de aceite. Además, presentan cantidades variables de azúcares, polisacáridos y proteínas.

En el aceite se producen cambios en la proporción de componentes menores, aunque las tendencias a lo largo de la maduración varían según las diferentes familias químicas. En el caso de los ácidos grasos, se ha observado una disminución del ácido palmítico y un aumento del ácido linoleico; el contenido en polifenoles y el grado de amargor alcanzan un máximo cuando la mayoría de los frutos están en envero, disminuyendo conforme avanza la maduración; el contenido en tocoferoles y esteroides presenta una tendencia a disminuir durante el periodo de maduración (Uceda y Hermoso, 1999; Civantos, 2009).

Durante el desarrollo del fruto se producen una serie de cambios que pueden utilizarse como indicadores más o menos específicos de la maduración. Uno de ellos es la variación del color del fruto. La aceituna, que al principio tiene color verde, vira a un color amarillento como consecuencia de una fuerte reducción del contenido en clorofilas. Después comienza la acumulación de antocianinas aumentando su concentración en las



células y la intensidad del color, que puede ir del rojizo al violáceo intenso y al negro (Vázquez-Roncero y Maestro, 1970). En la mayoría de las variedades, la coloración de la piel comienza en el ápice (inicio del envero) y continúa hacia el extremo opuesto junto al pedúnculo (final del envero). Después comienza a colorearse el mesocarpio, desde la parte más exterior hasta que el color violáceo llega al hueso. Se considera como periodo de maduración, según este criterio, el tiempo transcurrido desde la aparición de las manchas violáceas, hasta la coloración definitiva de la piel (Humanes y Civantos, 1992), siendo dicho tiempo variable y estando afectado por las características varietales y las condiciones climáticas.

Se ha estudiado la evolución de los pigmentos cloroplásticos (clorofilas y carotenoides) en los frutos de las variedades "Hojiblanca", "Manzanilla", "Picual" y "Picudo", observándose que el descenso paulatino y homogéneo de la concentración de cada pigmento a medida que avanza la maduración, es lo que provoca los cambios de color de los frutos. A partir del estado de envero (aceitunas "pintonas"), en el que se produce el cambio cromático, las clorofilas decrecen más rápidamente que los carotenoides, dando paso, como se ha dicho anteriormente, a otro tipo de compuestos coloreados, las antocianinas (Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández, 1986a; Mínguez-Mosquera et al., 1990; Hidalgo et al., 1993).

En el caso del aceite, se produce también una considerable disminución del contenido en pigmentos. En los aceites obtenidos durante el periodo de maduración de aceitunas de siete variedades de la zona del Montsiá (Tarragona), se puso de manifiesto que, en los primeros meses, se produce una brusca disminución del contenido en pigmentos carotenoides (determinados por la medida espectrofotométrica a 450 nm). Esta reducción pasa a ser más suave posteriormente, que según los autores podría deberse, principalmente, a dos fenómenos: las oxidaciones que inevitablemente afectan a este tipo de estructuras, y la dilución de los pigmentos debida al aumento del rendimiento en aceite una vez que se detiene la síntesis de carotenoides en las etapas iniciales de maduración (López et al., 1986).

De forma paralela a lo que ocurre en la aceituna, otros autores también han observado en aceites procedentes de las variedades "Hojiblanca" y de la italiana "Frantoio" que a lo largo del proceso de maduración hay una ostensible disminución tanto de clorofilas como de carotenos (β -caroteno), aunque la relación carotenos/clorofilas tiende a aumentar de forma considerable (Mínguez-Mosquera et al., 1990; Garrido et al., 1990a; Garrido et al., 1990b; Caselli et al., 1993). A la misma conclusión llegan otros autores, que



además estudian la correlación existente entre la concentración de pigmentos y las características del color de los aceites, observando que los parámetros cromáticos disminuyen con la maduración, planteándose la posibilidad de obtener índices de color que permitan la clasificación de los aceites según el origen y la variedad de la aceituna (Mínguez-Mosquera y Garrido-Fernández, 1991).

En un estudio sobre la calidad de los aceites de la Denominación de Origen catalana “Borjas Blancas” durante 5 campañas, se observó que cuando se utilizaba el sistema continuo de elaboración los índices de clorofilas y carotenos eran mayores al principio que al final de campaña, mientras que, al parecer, en el sistema de prensa ocurría al contrario (Graell et al., 1992). Sin embargo, estudiando la calidad del aceite de oliva virgen de la Denominación de Origen “Les Garrigues” (Lérida), durante la campaña 1995/1996, se observó que el color se mantenía dentro de los tonos del amarillo y no había diferencias importantes entre aceites de principio y final de campaña (Motilva et al., 1998), en contra de lo observado en algunas campañas precedentes como la 1992/93, en la que los aceites de principio presentaron colores más verdosos que los del final (Solé, 1995). Esto se atribuyó a la climatología anómala de la campaña estudiada que propició un avanzado estado de madurez de las aceitunas en el inicio de la recolección.

En general, se considera que las variedades de maduración escalonada mantienen el color verde del aceite relativamente más tiempo que las de maduración precoz, incluso cuando la recolección se efectúa en épocas más avanzadas. La variación y la atenuación del color del aceite dependen, en realidad, de la velocidad de caída del cromoplasto del fruto, donde la clorofila puede estar presente pero enmascarada por otros pigmentos neoformados no liposolubles (Fiorino y Nizzi, 1991).

Los polifenoles totales y los compuestos volátiles van aumentando a lo largo del ciclo de maduración del fruto, presentando máximos en el momento en que el árbol ofrece la mayor cantidad de aceitunas en envero, para disminuir apreciablemente a continuación (Civantos, 2009).

Condiciones de cultivo

Las condiciones climáticas y la zona de producción del olivar ejercen también influencia en las características de los aceites. En un estudio sobre la influencia ejercida por el clima en alguna variedad de olivo portugués se encontró que existía una cierta variación en el color del aceite de una región a otra, observando además una gran



influencia de las condiciones ambientales unidas a las de extracción (Vidal y Lefèvre, 1945). Sin embargo, posteriormente, estudiando la variación regional del color de los aceites vírgenes portugueses, no fue posible la delimitación de zonas utilizando técnicas estadísticas multivariantes como el análisis de componentes principales. Los resultados obtenidos pusieron de manifiesto que son ciertos factores regionales, como el estado sanitario y de maduración de las aceitunas, procesos tecnológicos, etc., los principales responsables de las diferencias de color en los aceites vírgenes portugueses (Vasconcelos, 1985).

Por otra parte, se ha encontrado que los aceites de la variedad "Arbequina" producidos en Andalucía, Aragón y en la zona de la Denominación de Origen "Les Garrigues" son más verdosos que los de otras zonas estudiadas (Tous et al, 1997). Los aceites del tipo "Les Garrigues", "Siurana-Montsant" y de Aragón se diferencian principalmente, respecto de los del tipo "Siurana-Camp" y de Andalucía, por tener un color amarillo más intenso.

De forma generalizada se atribuye al cultivar la capacidad de aportar a los aceites unas características peculiares y diferenciales, que son apreciadas por consumidores y catadores expertos, distinguiéndolos por su origen.

La influencia conjunta de estos factores, variedad y medio agrológico, puede verse reflejada en las características peculiares, el color entre ellas, de los aceites que pertenecen a las diferentes Denominaciones de Origen: los de "Siurana" y "Les Garrigues", de color verdoso cuando son de recolección temprana y de color amarillo los de recolección tardía, son considerados como productos especiales de inconfundible aroma, color y sabor, bien diferenciados de otros aceites; en los aceites de "Baena" el color oscila entre el verde intenso y el amarillo dorado; los de "Sierra de Segura" son de color amarillo verdoso; en los de "Priego" se diferencian los tipos "Picudo", de color amarillo, "Hojiblanca", de color amarillo dorado, y "Picual", de color amarillo verdoso (Consejería de Agricultura y Pesca, 1966, 1993, 1995 ; Ministerio de Agricultura, 1977, 1979).

Época de recolección

La elección del momento adecuado de recolección es fundamental para la elaboración de un aceite de calidad. De esta decisión dependerán en gran medida las características del aceite obtenido. Obviamente, un factor a tener en cuenta sería la finalización del periodo de formación del aceite en el fruto. Para la variedad "Picual" se



considera que el aceite está completamente formado cuando el fruto alcanza un índice de madurez con valores próximos al 3,5, lo que se corresponde con el momento en que la mayoría de los frutos se encuentran en envero, pocos están negros y aún quedan frutos de color verde-amarillento. En este punto se podría pensar que los frutos en el árbol aún verdes pudieran aumentar su contenido en aceite si se retrasa la recolección. Beltrán et al., (2005) observaron que cuando se había alcanzado este grado de madurez de los frutos el contenido graso sobre materia seca se había estabilizado, no observándose diferencias en el contenido graso sobre materia seca de la pulpa (De Torres, 2013). Un retraso en la época de recolección y, en consecuencia, un incremento en el grado de maduración del fruto conlleva la disminución de determinados componentes como los compuestos fenólicos (Beltrán et al., 2005).

Riego

El olivar se ha cultivado tradicionalmente en condiciones de secano. Es un cultivo bien adaptado a los secanos mediterráneos, con producciones aceptables, y capaz de sobrevivir a periodos de intensa sequía. Sin embargo, desde hace tiempo se ha comprobado experimentalmente que la práctica del riego aumenta considerablemente el rendimiento del olivar, incluso cuando las aportaciones de agua son muy reducidas (Orgaz y Fereres, 2004). El riego de los olivos es un factor decisivo en la composición de los aceites, fundamentalmente en cuanto a los componentes antioxidantes se refiere.

Se ha estudiado el efecto de la aplicación de diferentes estrategias de riego al olivo de la variedad "Arbequina" sobre la composición del aceite, encontrándose que los aceites que procedían de los frutos de árboles más regados, contenían menos cantidad de pigmentos (clorofílicos y carotenoides), atribuyéndose este hecho a que al aumentar el volumen de agua aplicada al olivo, las pastas que se obtienen son más fluidas, por lo que atravesarían las cribas del molino con más facilidad, sufriendo sus tejidos un menor daño y produciéndose una menor extracción de pigmentos, localizados principalmente en el epicarpio de los frutos (Tovar et al., 2001). Sin embargo, otros autores indican que el contenido en pigmentos de los aceites procedentes de frutos de la variedad "Cornicabra", no se ve influenciado por el riego (Gómez-Rico et al., 2007).

En cuanto al contenido en α -tocoferol presente en el aceite de oliva, no se aprecian diferencias significativas en su concentración con el riego del olivar para las variedades "Cornicabra", "Arbequina" y "Morisca" (Tovar et al., 2001; Gómez-Rico et al., 2007, 2009).



El contenido total en polifenoles, atendiendo a los trabajos desarrollados hasta ahora donde se relaciona riego y calidad, casi siempre permite diferenciar los aceites producidos en riego de los de secano. Normalmente, el contenido en polifenoles aumenta significativamente al reducirse la cantidad de agua de riego aportada, siendo máximo en el olivar no regado. Esta tendencia ha sido observada por diferentes autores en distintas variedades y zonas de cultivo, como la variedad “Kalamata” en Italia (Patumi et al., 2002), “Leccino” en Italia (Gucci et al., 2004), “Arbequina” en Cataluña (Tovar et al., 2002), “Arbequina” en EE.UU. (Berenguer et al., 2006) y también la variedad “Picual” en la provincia de Jaén (Salas et al., 1997).

Plagas y enfermedades

Las plagas y enfermedades del olivo inciden negativamente sobre la calidad de los aceites y, en particular, la infección por la mosca del olivo (*Bactrocera oleae*) origina aceites con un menor contenido en compuestos fenólicos (Zunin et al., 1995).

El empleo de algunos inductores de autodefensa del olivo (Brotomax) parece originar un mayor contenido de compuestos fenólicos en los aceites de diferentes variedades (Botia et al., 2001).

Las plagas y enfermedades pueden alterar el color del aceite, destacando el caso del *Colletotrichum gloeosporioides*, que produce una alteración conocida como aceituna jabonosa, y que incide directamente en la calidad, produciéndose aceites de coloraciones rojizas y elevada acidez, que aumenta linealmente con el porcentaje de frutos atacados (Civantos et al., 1999; Trapero y Blanco, 1999).

Se ha observado que la utilización de determinadas sustancias que ayudan a la separación de la aceituna del pedúnculo también produce cambios de color en los aceites. Se obtienen aceites más amarillos si se utiliza ácido oleico y más verdes en el caso de otros compuestos liberadores de etileno (Petruccioli, 1971).

Por otro lado, el sistema de recolección y los mecanismos de limpieza que se utilicen pueden influir en la cantidad de hojas que acompañen a la aceituna en el momento de su elaboración. Se ha estudiado el efecto de la adición de determinadas cantidades de hojas a aceitunas maduras, sobre la calidad del aceite, encontrándose que el contenido de pigmentos clorofílicos aumenta con la cantidad de hojas añadidas (Di Giovachino et al., 1996).





3. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ACEITES DE OLIVA VÍRGENES EXTRA ENRIQUECIDOS CON ANTIOXIDANTES

3.1.- INTRODUCCIÓN

En el presente capítulo se ha procedido a preparar y adicionar el extracto de antioxidantes (cuya composición en % en peso es: 13,3% de β -caroteno, 0,25% de luteína y 1% de otros carotenoides) a diferentes aceites de oliva vírgenes extra (AOVE's), estudiando cómo varía el color, a medida que va aumentando la concentración del extracto. Así, se ha utilizado un extracto de antioxidantes cuya concentración en luteína es de 2,3 mg/ml, y se han realizado sucesivas adiciones hasta llegar a concentraciones de luteína en los AOVE's de 0,16 mg/ml (174,3 mg luteína/kg aceite), considerando aceites con una densidad media de 0,918 kg/L, conforme a nuestras medidas, es decir, se han alcanzado concentraciones de luteína entre 22 y 87 veces superiores a las que presentan los aceites de oliva no enriquecidos (2-8 mg luteína/kg aceite) (Baeten et al., 2001; Cichelli y Pertesana, 2004; Aparicio Ruiz et al., 2011).

3.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1.- MICROALGA *SCENEDESMUS ALMERIENSIS*

La microalga clorofícea *Scenedesmus almeriensis* (Imágenes 3.1 y 2.5) se ha catalogado como una nueva especie, habiendo sido caracterizada genéticamente en la Universidad de Göttingen (Alemania). Ha sido aislada por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería y depositada en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos (CCAP) con el código CCAP 276/24. Esta especie ha sido patentada por la Universidad de Almería y la Fundación Cajamar para la producción industrial de luteína y extractos ricos en luteína de aplicaciones biotecnológicas. Se trata de una microalga termófila que muestra una temperatura óptima de crecimiento de 35 °C y soporta temperaturas de hasta 48 °C, lo que la hace especialmente apta para su producción en exteriores (Sánchez et al., 2008b). Esta microalga es también tolerante a elevadas irradiancias de hasta 1.625 microE/(m²·s), llegando a acumular hasta el 1% de su peso en luteína. Su velocidad de crecimiento es alta en comparación con otras especies de microalgas, lo que reduce el riesgo de contaminaciones en los cultivos. La productividad de biomasa en las instalaciones de Almería llega a valores de hasta 0,95 g/(L·día), siendo la productividad de luteína de hasta 5,3 mg/(L·día) (Sánchez et al., 2008a).



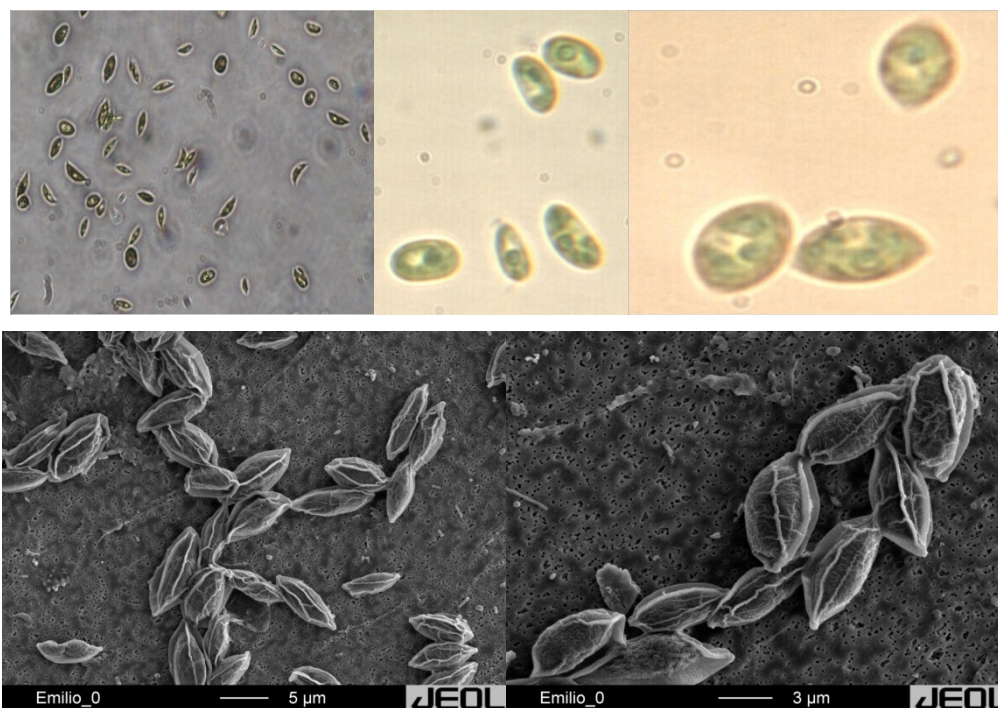


Imagen 3.1

Imágenes de *S. almeriensis* tomadas mediante microscopio óptico y electrónico.

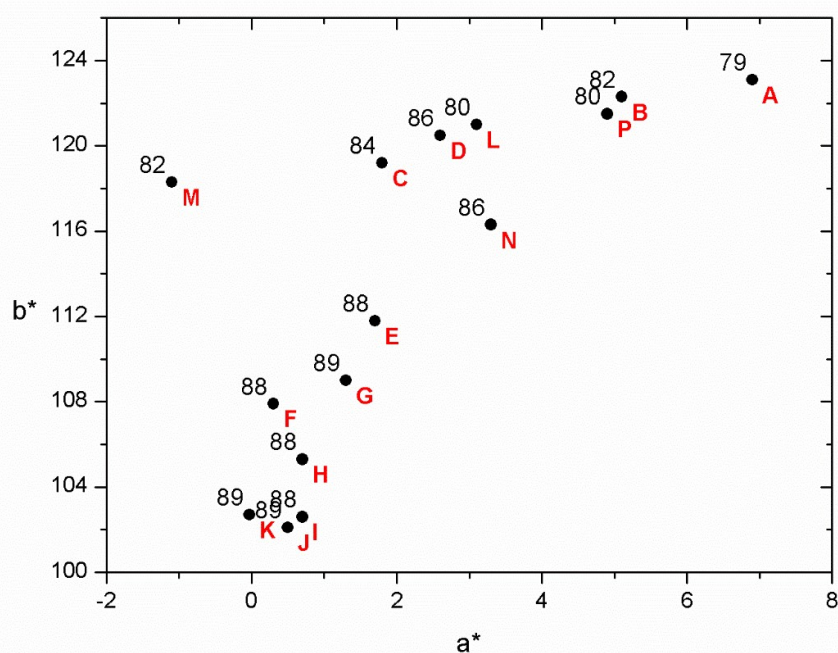
3.2.2.- ACEITES DE OLIVA VÍRGENES EXTRA

Se han utilizado AOVE's procedentes de diferentes variedades de aceituna, concretamente "Picual", "Arbequina", "Hojiblanca", "Frantoio" y "Royal". Los aceites se han obtenido comercialmente y proceden mayoritariamente de la provincia de Jaén, aunque también se han estudiado algunos AOVE's de las provincias de Granada, Córdoba y Málaga. Concretamente la Tabla 3.1 muestra las características principales de los 15 aceites estudiados, incluyendo sus coordenadas CIELAB para muestras medidas en espectrofotómetro con cubetas de espesor 1 cm suponiendo iluminante CIE D65 y observador patrón CIE 1931. La Figura 3.1 muestra las coordenadas de color de todos los aceites en el plano a^*b^* (los valores de la coordenada L^* de cada aceite se han redondeado, para mejor visualización). Puede observarse que los valores de L^* son altos (oscilando entre 79 y 89), los valores de a^* son bajos (oscilando entre -1 y 7), y finalmente los valores de b^* son muy altos oscilando en un rango relativamente más amplio que el de las otras dos coordenadas de color (entre 102 y 123). Los ángulos de tono CIELAB (h_{ab}) de estos 15 aceites oscilan en un pequeño rango comprendido entre $86,8^\circ$ y $90,5^\circ$, mientras que los valores de croma CIELAB (C_{ab}^*) son muy altos y similares a los valores de la coordenada b^* .

Tabla 3.1

AOVE's utilizados en las experiencias de enriquecimiento con extracto de antioxidantes procedente de la microalga *S. almeriensis*. Las 3 últimas columnas muestran los parámetros colorimétricos de los distintos aceites (L^* , a^* , b^*) medidos en cubeta de espesor 1 cm, suponiendo iluminante CIE D65 y observador patrón CIE 1931.

Aceite	Procedencia	Variedad de aceituna	L^*	a^*	b^*
A: Fuenroble (FR)	Jaén	Picual	78,8	6,9	123,1
B: Santuario de Mágina (SM)	Jaén	Picual	81,9	5,1	122,3
C: Oro Bailén (OB)	Jaén	Picual	83,7	1,8	119,2
D: Oro de Génave (OG)	Jaén	Picual	86,4	2,6	120,5
E: Hojiblanca	Málaga	Hojiblanca	87,8	1,7	111,8
F: La Cántara	Jaén	Picual	87,5	0,3	107,9
G: Melgarejo	Jaén	Picual	88,8	1,3	109,0
H: Carbonell	Nacional	Picual	88,0	0,7	105,3
I: Garay	Córdoba	Arbequina	88,2	0,7	102,6
J: Baena	Córdoba	Picual	88,8	0,5	102,1
K: Abades	Granada	Picual	89,1	-0,03	102,7
L: Castillo Canena Picual (CCP)	Jaén	Picual	80,3	3,1	121,0
M: Castillo Canena Arbequina (CCA)	Jaén	Arbequina	81,7	-1,1	118,3
N: Castillo Canena Frantoio (CCF)	Jaén	Frantoio	86,2	3,3	116,3
P: Castillo Canena Royal (CCR)	Jaén	Royal	80,1	4,9	121,5

**Figura 3.1**

Coordenadas CIELAB de los 15 AOVE's (Tabla 3.1) medidos en cubetas de espesor 1 cm bajo iluminante CIE D65 y observador patrón CIE 1931.

A título de ejemplo, la Imagen 3.2 muestra algunos de los diferentes AOVE's ensayados antes de las adiciones de extracto de antioxidantes.

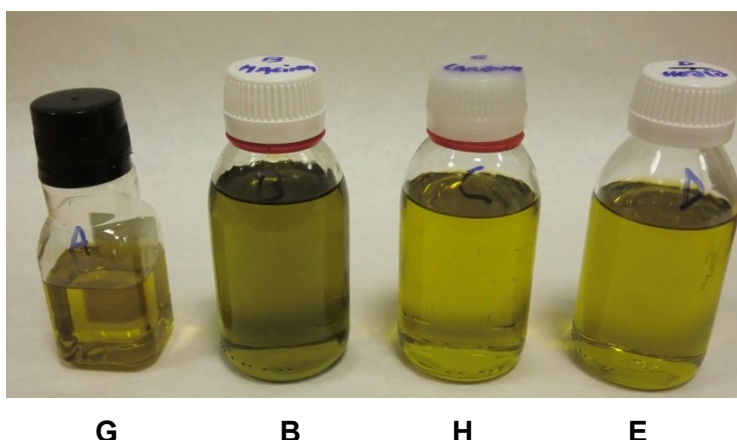


Imagen 3.2

Algunos de los AOVE's empleados en las experiencias de enriquecimiento en antioxidantes: G, B, H y E (según Tabla 3.1).

3.2.3- EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO DE ANTIOXIDANTES

Se han estudiado diferentes metodologías para la obtención del extracto, siendo la que mejores resultados ha arrojado, la extracción con hexano. Antes de la recuperación de los antioxidantes se ha estudiado también el proceso de ruptura celular, habiendo ensayado metodologías tales como: ultrasonidos, presión, congelación-descongelación y molino de bolas. Los mejores resultados se han obtenido usando molino de bolas con los siguientes parámetros de operación: 10 minutos de molienda, utilizando bolas de 2,8 cm de diámetro y adicionando alúmina como coadyudante.

La Imagen 3.3 muestra el esquema general del proceso de extracción y purificación utilizado.

Con el fin de eliminar el hexano se ha utilizado un rotavapor y se ha obtenido un concentrado en antioxidante de intenso color rojo-anaranjado. A continuación, para estabilizar los carotenoides se recomienda solubilizarlos en aceite de oliva virgen extra, obteniendo de esta forma una disolución con una concentración de luteína igual a 2,3 mg/ml (Imagen 3.4). Este producto puede ser usado directamente como complemento en luteína y otros carotenoides o en la formulación de alimentos especiales para consumo humano o animal.



Imagen 3.3

Esquema global para la obtención del extracto de antioxidantes



Imagen 3.4

Extracto de antioxidantes (2,3 mg/ml de luteína) en AOVE tras la eliminación de disolvente en rotavapor.

3.2.4.- OBTENCIÓN DE ACEITES ENRIQUECIDOS CON ANTIOXIDANTES

La composición del extracto, tal y como se ha mencionado anteriormente, es de: 14,55% en peso de antioxidantes (13,3% de β -caroteno, 0,25% de luteína y 1% de otros carotenoides) obtenido mediante HPLC.

Para realizar el cromatograma del extracto de antioxidantes (Figura 3.2), se ha utilizado una columna Phenomenex Luna C18, cuyas medidas son 250 mm x 2,5 mm. El análisis se realizó a 23 °C con un gradiente lineal durante 30 minutos. La fase móvil utilizada fue agua-metanol (80%) con 0,05% de trietilamina y 20% de acetato de etilo (con 0,05% de trietilamina) con un caudal de 1 ml/min.

Para obtener la concentración en mg/ml de los distintos carotenoides se ha calculado la densidad del extracto, mediante picnometría, obteniéndose los siguientes resultados:

- $\rho_{\text{extracto de antioxidantes}} = 0,907 \text{ g/ml}$
- $\rho_{\text{aceite}} = 0,918 \text{ g/ml}$
- Carotenoides totales: 132,43 mg/ml
- β - caroteno: 121,03 mg/ml
- Luteína: 2,3 mg/ml
- Otros: 9,1 mg/ml

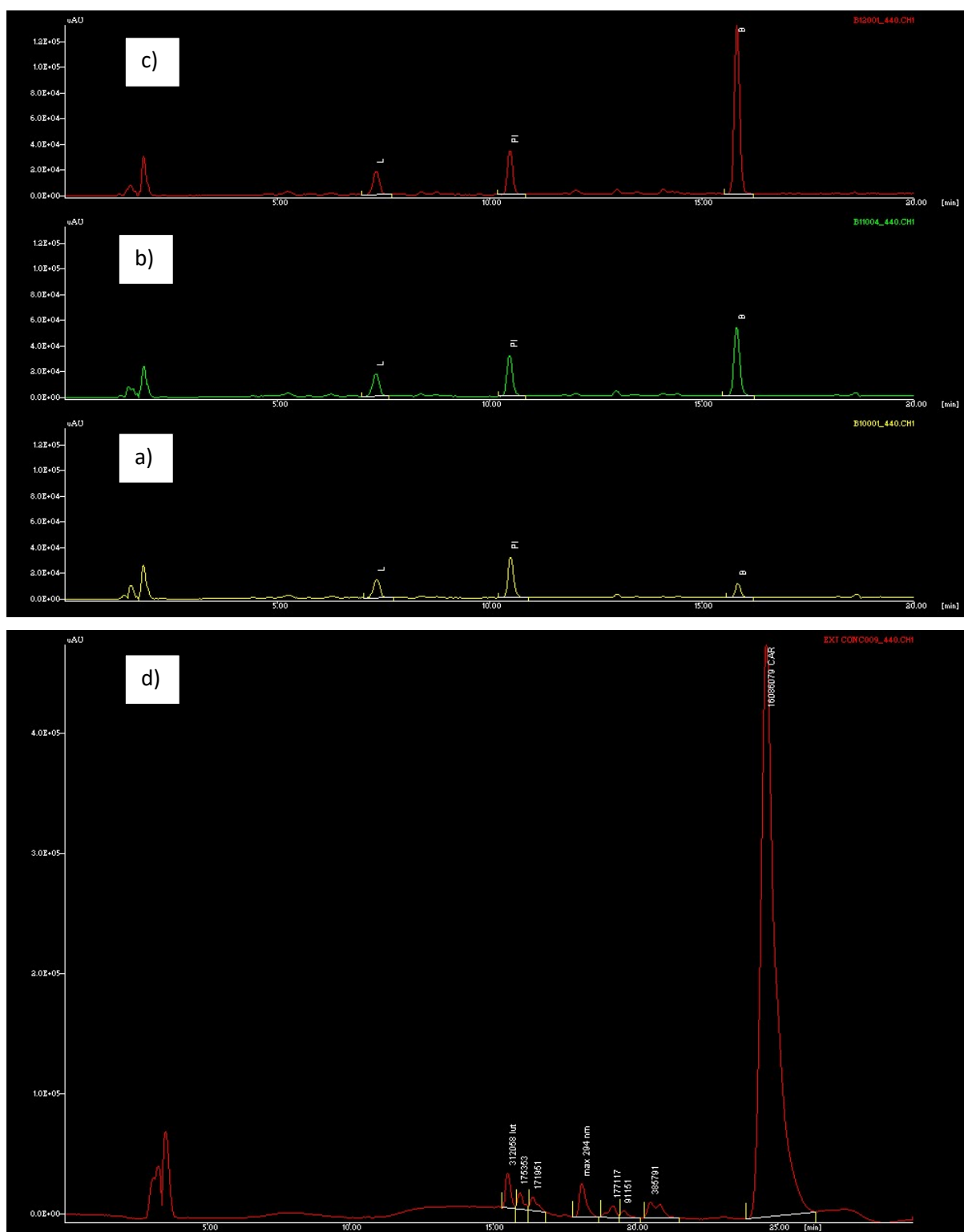


Figura 3.2

Cromatogramas del AOVE "C" sin enriquecer (a), AOVE "C" enriquecido con 0,05 mg/ml (b), AOVE "C" enriquecido con 0,1 mg/ml (c) y del extracto de antioxidantes (d). L= Luteína, PI= Patrón interno, B= β -caroteno

Una vez obtenido el extracto de antioxidantes, procedente del correspondiente tratamiento de la biomasa de la microalga *Scenedesmus almeriensis*, se ha procedido a caracterizar los diferentes aceites. Puesto que en este extracto hay un 0,25% de luteína en peso, el extracto tiene 2,3 mg de luteína/ml.

Con la idea de incorporar al organismo humano una cantidad de luteína suficiente para la prevención de las enfermedades asociadas a su déficit, que está comprendida entre 3 y 6 mg/día (Jhonson Down et al., 2002, Krinsky et al., 2003; Silva, 2004), se han preparado aceites con concentraciones de luteína comprendidas entre 0,02 y 0,16 mg/ml de aceite. Teniendo en cuenta que en España el consumo medio de AOVE por habitante y día según COI, (2011) es de 36 ml, con las muestras de aceite preparadas de esta manera se aportarían al organismo entre 0,72 - 5,76 mg de luteína por día. (Tablas 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5). En este sentido, para el resto de estudios realizados (foto-estabilidad y termo-estabilidad) se han elegido aceites con dos concentraciones de trabajo: 0,05 y 0,1 mg luteína/ml de aceite, que están dentro del rango anteriormente señalado (0,02 – 0,16 mg/ml aceite), apareciendo en las Tablas 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5 sombreadas las líneas correspondientes a estas dos concentraciones. Con estas concentraciones se aportarían al organismo 1,8 y 3,6 mg de luteína, respectivamente, con 36 ml de ingesta de AOVE diaria. Estas cantidades sumadas a las ingeridas con el resto de alimentos de la dieta mediterránea, permitirían alcanzar las cantidades de luteína recomendadas para la prevención de las enfermedades asociadas a su déficit (3-6 mg/día) (Krinsky et al., 2003; Silva, 2004).

Para alcanzar las concentraciones mencionadas de 0,05 y 0,1 mg luteína/ml de aceite se han pipeteado 311 y 636 µl, respectivamente, de nuestro extracto de antioxidantes y se han llevado a cubetas de 14 ml de AOVE, para las determinaciones de color con el espectrofotómetro descritas en la siguiente sección:

$$\frac{x \text{ ml extracto} * 2,3 \frac{\text{mg luteína}}{\text{ml extracto}}}{(14+x) \text{ ml aceite}} = 0,05 \frac{\text{mg luteína}}{\text{ml aceite}}; \quad x = 0,311 \text{ ml} = 311 \mu\text{l extracto} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

$$\frac{x \text{ ml extracto} * 2,3 \frac{\text{mg lut ína}}{\text{ml extracto}}}{(14+x) \text{ ml aceite}} = 0,1 \frac{\text{mg luteína}}{\text{ml aceite}}; \quad x = 0,636 \text{ ml} = 636 \mu\text{l extracto} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

3.2.5.- CARACTERIZACIÓN DEL COLOR DE LOS AOVE'S

La determinación espectrofotométrica del color permite caracterizar y monitorizar las muestras de AOVE's. Concretamente, las medidas de color se han realizado con un espectrofotómetro Konica Minolta CM-5 conectado a un ordenador dotado del software SpectraMagic NX PRO USB. El equipo proporciona medidas en el espacio de color CIELAB. Se ha supuesto iluminante D65 y observador patrón colorimétrico CIE 1931 en la realización de las medidas. Tras la correspondiente calibración del instrumento se procedió a medir los parámetros de color para las muestras. Así, se colocaron 14 ml de aceite en cubetas transparentes con unas dimensiones de 4,2 x 3,2 x 1,0 cm (paso de luz de 1,0 cm). Tras la medida inicial para caracterizar el aceite original sin ninguna adición de extracto de antioxidantes, se realizó el enriquecimiento mediante sucesivas adiciones de 100 µl de nuestro extracto de antioxidantes, y se midieron los correspondientes valores de los parámetros colorimétricos de cada muestra generada (L^* , a^* , b^*), así como las variaciones de los mismos con respecto al color al aceite original (ΔL^* , Δa^* , Δb^* y ΔE^*_{ab}).

Los resultados de diferencias de color usando fórmulas de diferencia de color más avanzadas que CIELAB, como la reciente fórmula CIEDE2000 (ISO/CIE, 2014), son cualitativamente similares a los obtenidos con CIELAB. El uso de CIELAB es suficiente para nuestro propósito principal de monitorizar los cambios, que en nuestro caso no tienen relación con un experimento visual de diferencias de color.

3.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1.- EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTIOXIDANTES

En cuanto a la obtención del extracto de antioxidantes a partir de la biomasa seca, se ha usado la técnica de extracción con disolventes biocompatibles. En este sentido, se ha optimizado un método que incluye tres etapas: rotura celular, saponificación y extracción. Hemos comprobado, que la rotura celular es necesaria con el fin de mejorar el rendimiento de extracción y que la mejor alternativa para aplicaciones industriales es el uso de un molino de bolas con los siguientes parámetros de operación: 10 minutos de molienda, bolas de 2,8 cm de diámetro y adición de alúmina como coadyuvante, como se ha mencionado anteriormente. El uso del molino de bolas asegura un ambiente cerrado



que previene la desnaturalización de la luteína por oxidación, aunque el impacto de las bolas provoca calentamientos locales, que puede causar la desnaturalización de diversos productos. Sin embargo, en la presente aplicación no ha ocurrido así ya que la biomasa ha sido analizada antes y después del tratamiento, habiéndose comprobado la integridad del contenido en extracto de antioxidantes.

Por lo que se refiere a la etapa de saponificación, se ha determinado que las condiciones óptimas son la saponificación durante 5 minutos a una temperatura de 40 °C utilizando una solución de KOH al 4% (40 g/L) y una concentración máxima de biomasa de 100 g/L. Se ha observado que la saponificación durante un tiempo mayor o a concentraciones de KOH superiores, reduce el rendimiento del proceso por degradación de los antioxidantes, fundamentalmente de la luteína.

Finalmente, tras haber estudiado diferentes metodologías para la obtención del extracto, se ha optimizado la extracción con hexano como disolvente biocompatible aceptado para productos de uso alimentario. Para ello, se ha propuesto un proceso de extracción y una proporción en volumen 1:1 de hexano y de muestra, habiendo estudiado el número de extracciones óptimo, que ha resultado ser de ocho, el cual permite recuperar el 95% de la luteína contenida en la biomasa (Figura 3.3).

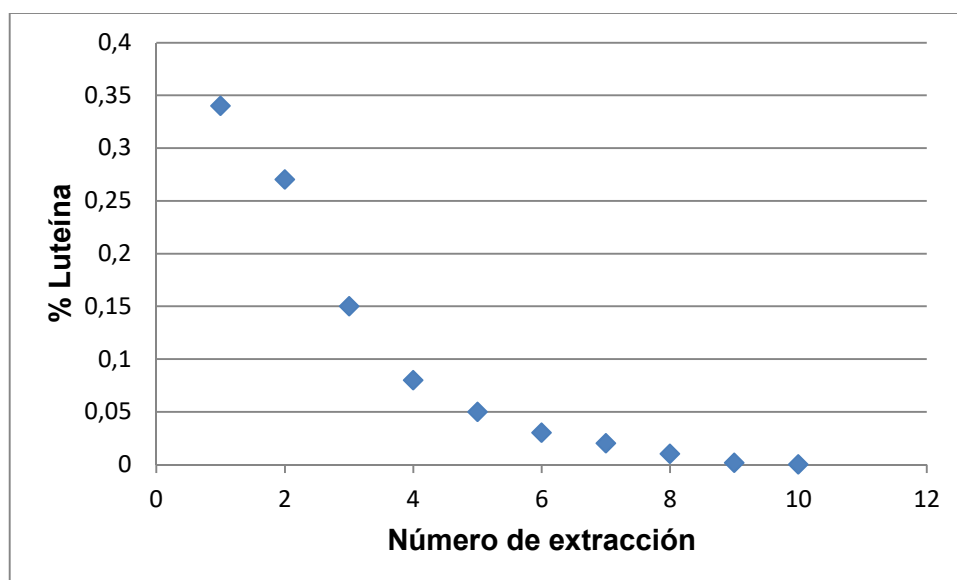


Figura 3.3
Representación del % de luteína recuperada frente al nº de extracciones.

3.3.2.- OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN COLORIMÉTRICA DE AOVE'S ENRIQUECIDOS CON ANTIOXIDANTES

Una vez obtenido el extracto de antioxidantes (cuya concentración de luteína es 2,3 mg/ml), se ha procedido a caracterizar colorimétricamente los diferentes AOVE's adquiridos con distintas denominaciones de origen (Tabla 3.1). Se puede observar que algunos aceites, como por ejemplo, los aceites "Melgarejo" y "Carbonell" (designados como "G" y "H" en la Tabla 3.1 y Figura 3.1) tienen coordenadas de color muy parecidas, pero aun así interesa estudiar el cambio de color que las adiciones de extracto producen en cada uno de ellos, ya que su composición química es muy diferente, como puede por ejemplo inferirse de su diferente grado de acidez.

Tras cada una de las adiciones de 100 µl de extracto de antioxidantes a 14 ml de muestra de cada tipo de aceite, se homogeniza la muestra de aceite enriquecido y se mide el color en el espectrofotómetro, obteniéndose los parámetros correspondientes a las muestras generadas y las diferencias de color (ΔE^*_{ab}) con el aceite original, al que no se había añadido ningún antioxidante. En las Tablas 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5 se muestran los datos correspondientes a los AOVE's "Santuario de Mágina", "Hojiblanca", "Melgarejo" y "Carbonell" (designados como "B", "E", "G" y "H", respectivamente en la Tabla 3.1 y Figura 3.1; véase también la Imagen 3.2), que fueron seleccionados para este ensayo acumulativo de adiciones.

Los resultados obtenidos muestran cómo con la primera adición de extracto, el color amarillo-verdoso de los AOVE's originales se modifica, en el sentido de que su claridad L^* disminuye (se obtienen aceites más oscuros), y sus coordenadas a^* y b^* aumentan ambas (aunque en mayor cuantía la coordenada a^*), de forma que el ángulo de tono disminuye y el croma aumenta (es decir, el aceite tras la primera adición de extracto de antioxidantes presenta un color más anaranjado y saturado).

Tabla 3.2

Parámetros colorimétricos en la adición de extracto de antioxidantes sobre el AOVE "Santuario de Mágina". Extracto de antioxidantes [luteína]= 2,3 mg/ml. Volumen inicial de aceite en cubeta=14 ml. $\rho_{\text{aceite}}=0,918$ g/ml (Aparicio et al., 2011).

Muestra	Extracto de antioxidantes adicionado (μl)	L^*	a^*	b^*	ΔE^*_{ab} $\pm\sigma = 0,028$	[luteína] mg/ml	mg luteína/kg aceite
0	-	81,9	5,1	122,3	-	-	
1	123	79,7	11,5	129,2	9,6	0,02	21,7
2	185	77,8	16,2	128,6	13,4	0,03	32,7
3	311	76,4	19,6	127,2	16,3	0,05	54,5
4	439	74,9	23,3	125,8	19,8	0,07	76,3
5	504	73,9	25,5	124,3	22,1	0,08	87,1
6	636	72,8	27,3	123,1	24,0	0,10	108,9
7	771	71,9	29,0	121,8	25,9	0,12	130,7
8	839	71,1	30,2	120,8	27,4	0,13	141,6
9	977	70,2	31,7	119,5	29,2	0,15	163,4
10	1047	69,4	32,9	118,2	30,8	0,16	174,3

Estos cambios de color eran de esperar, teniendo en cuenta el color oscuro y fuertemente rojo-anaranjado del extracto de antioxidantes adicionado. A medida que añadimos más cantidad de extracto de antioxidantes el color del aceite sigue cambiando, de modo que con crecientes cantidades de extracto de antioxidantes adicionado, los aceites tienden a oscurecerse (L^* disminuye) y a hacerse aún más anaranjados-rojizos (disminuye el ángulo de tono), mientras que su saturación se mantiene en valores muy altos, ligeramente superiores a los iniciales en la mayoría de los casos. El parámetro ΔE^*_{ab} es el que indica la diferencia de color entre dos muestras sujetas a comparación. Así, analizando el valor de ΔE^*_{ab} , éste crece de forma continua conforme se adiciona extracto y es interesante resaltar que de los 4 AOVE's ensayados en esta sección, el que genera menor variación del parámetro ΔE^*_{ab} es el correspondiente a "Santuario de Mágina" (Tabla 3.2).

La Figura 3.4 muestra los cambios de color en el plano a^*b^* para los 4 aceites (los valores de la coordenada L^* son los números que aparecen junto a cada punto, habiéndose redondeado aquí los valores de las medidas de L^* al número entero más próximo para facilitar la visualización), considerando las sucesivas adiciones de extracto realizadas al aceite natural original, cuyas coordenadas se indican mediante flechas rojas. Se puede observar que los colores de los 4 aceites siguen una tendencia similar con la adición del extracto (quizá el más discrepante sería el Santuario de Mágina, porque su color inicial es diferente al de los otros tres aceites): La claridad L^* disminuye, la coordenada a^* crece constantemente y de manera considerable (color más rojizo), la coordenada b^* sigue una tendencia "parabólica", con un fuerte crecimiento inicial hasta un cierto máximo, tras el cual empieza a decrecer suavemente. Se puede también observar que el cambio de color es más grande con las primeras adiciones que con las últimas.

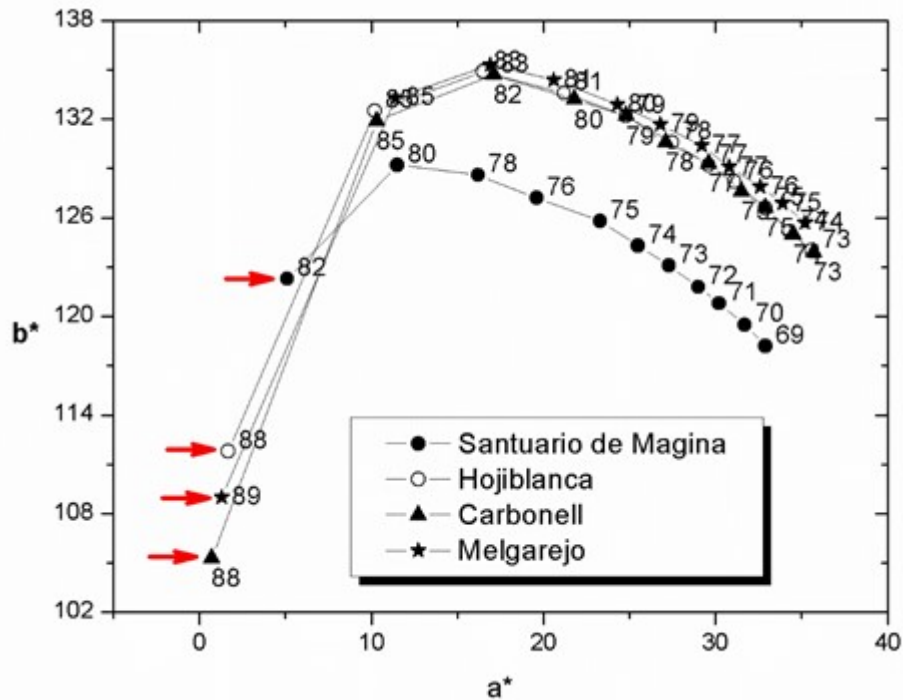


Figura 3.4

Cambios de color en el plano a^*b^* para los 4 aceites considerando diferentes adiciones de extracto. Las flechas rojas indican las posiciones de los aceites originales (sin extracto). Los números corresponden a la tercera coordenada CIELAB, L^* (valores redondeados al entero más próximo).

Una forma alternativa y más clara de interpretar el resultado de la Figura 3.4 es considerar separadamente los cambios en los 3 atributos perceptivos del color para el ojo humano: claridad (L^*), tono (h_{ab}) y croma (C^*_{ab}). Con este fin, las Figuras 3.5 y 3.6 muestran las evoluciones del color de los aceites (cuyos colores originales se señalan de nuevo con flechas rojas) en los planos tono-claridad y tono-croma de CIELAB, al ir añadiendo distintas cantidades del extracto de antioxidantes. Como se puede apreciar, las adiciones hacen decrecer el ángulo de tono h_{ab} desde un valor inicial en torno a 90 grados (tonalidades amarillentas) hacia valores menores (tonos más rojizos), como cabía esperar por el color del extracto añadido, mientras que la claridad disminuye de forma continua con las adiciones (o sea, las muestras se hacen más oscuras, como también era de esperar) y el croma sigue la tendencia "parabólica" antes mencionada para b^* (un crecimiento fuerte inicial hasta lograr un máximo y a partir de ahí un decrecimiento que podríamos considerar levemente asintótico).

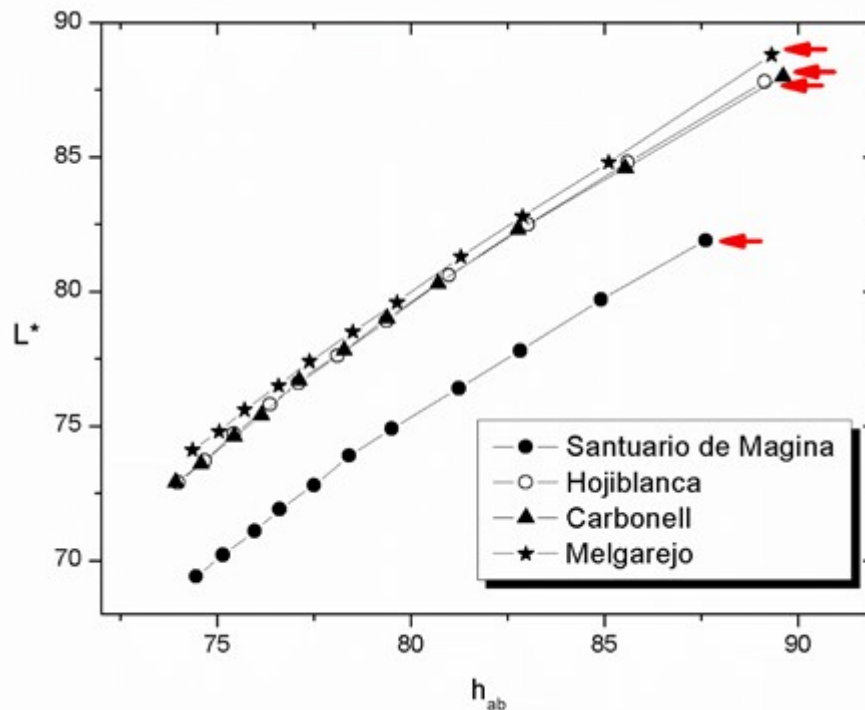


Figura 3.5

Evolución del color de los 4 aceites con diferentes adiciones de extracto, en el plano CIELAB con coordenadas ángulo de tono y claridad. Las flechas rojas indican las posiciones de los aceites originales (sin extracto).

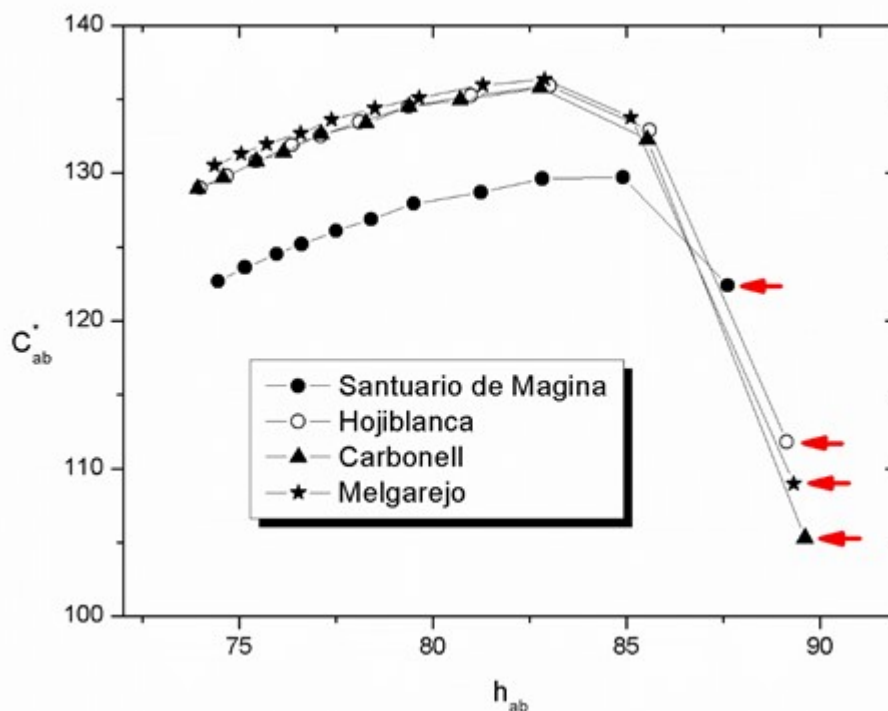


Figura 3.6

Evolución del color de los 4 aceites con diferentes adiciones de extracto, en el plano CIELAB con coordenadas ángulo de tono y cromía. Las flechas rojas indican las posiciones de los aceites originales (sin extracto).

En las Tablas 3.2, 3.3, 3.4 y 3.5, se observa que el efecto de la adición de extracto de antioxidantes para cuatro de los AOVE's ensayados es similar, si bien destaca un poco más la trayectoria correspondiente al aceite "B" "Santuario de Mágina" (Tabla 3.2) ya que el cambio de color con la primera adición de extracto es de 9,6 unidades CIELAB, bastante menor que el que se obtiene para los otros tres aceites (por encima de 20 unidades CIELAB). Esta diferencia entre el comportamiento colorimétrico de los aceites estudiados, puede estar relacionada con el hecho de que el color inicial del AOVE "Santuario de Mágina" es bastante diferente al de los otros aceites (ver Tabla 3.1). En efecto, al ser su coordenada b^* muy elevada ($b^*=122,3$), la primera adición de extracto difícilmente consigue aumentar aún más dicha coordenada, por lo que la diferencia de color total que produce dicha adición es bastante menor que la que se observa en los demás aceites. Por otra parte, como ya se apuntó previamente, la Figura 3.6 también nos muestra que, salvo para el AOVE "Santuario de Mágina", en las primeras adiciones de extracto el color cambia más que en las últimas, es decir, el cambio de color con la adición de extracto no es un proceso lineal, existiendo probablemente una cierta tendencia asintótica o de estabilización del color a partir de cierta cantidad de luteína adicionada (superior a la usada en nuestros experimentos). En cuanto a la naturaleza de los cambios de color que produce la adición del extracto de antioxidantes a los AOVE's, en general se puede decir que el cambio mayor es debido al cambio de tono, seguido por

el cambio de croma (importante también en muchos casos), y finalmente al cambio en claridad.

Tabla 3.3

Parámetros colorimétricos en la adición de extracto de antioxidantes sobre el AOVE "Hojiblanca".
Extracto de antioxidantes [luteína]= 2,3 mg/ml. Volumen inicial de aceite en cubeta=14 ml.
 $\rho_{\text{aceite}}=0,918$ g/ml (Aparicio et al., 2011).

Muestra	Antioxidante Adicionado (μ l)	L^*	a^*	b^*	ΔE^*_{ab} $\pm\sigma = 0,028$	[luteína] mg/ml	mg luteína/kg aceite
0	-	87,8	1,7	111,8	-	-	
1	123	84,8	10,2	132,5	22,6	0,02	21,7
2	185	82,5	16,5	134,9	27,9	0,03	32,7
3	311	80,6	21,2	133,6	30,2	0,05	54,5
4	439	78,9	24,8	132,2	32,1	0,07	76,3
5	504	77,6	27,5	130,6	33,6	0,08	87,1
6	636	76,6	29,6	129,2	34,7	0,10	108,9
7	771	75,8	31,1	128,2	35,7	0,12	130,7
8	839	74,7	32,9	126,6	37,0	0,13	141,6
9	977	73,7	34,3	125,2	37,9	0,15	163,4
10	1047	72,9	35,6	124,0	39,0	0,16	174,3

Tabla 3.4

Parámetros colorimétricos en la adición de extracto de antioxidantes sobre el AOVE "Carbonell".
Extracto de antioxidantes [luteína]= 2,3 mg/ml. Volumen inicial de aceite en cubeta=14 ml.
 $\rho_{\text{aceite}}=0,918$ g/ml (Aparicio et al., 2011).

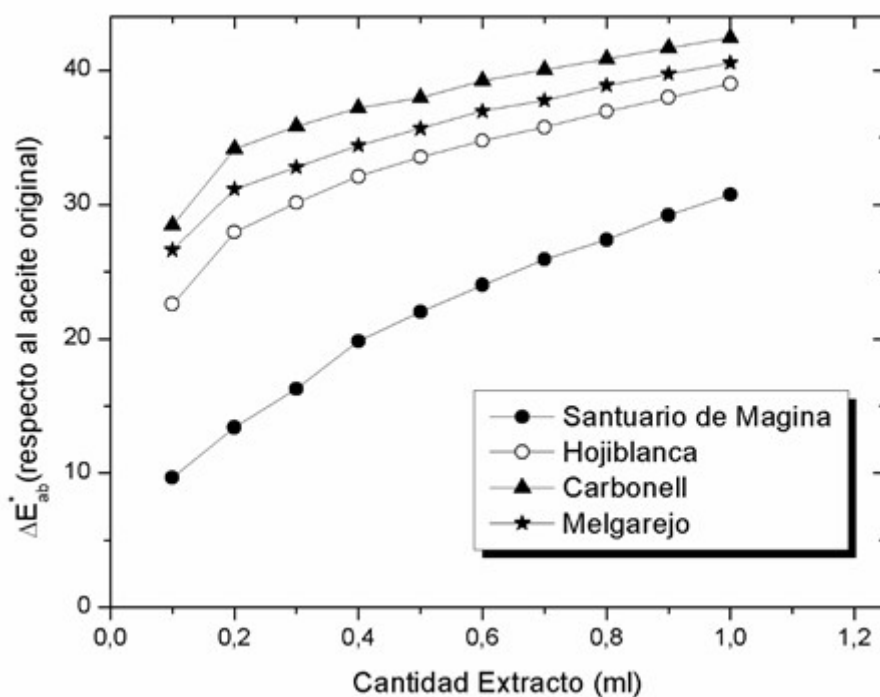
Muestra	Antioxidante Adicionado (μ l)	L^*	a^*	b^*	ΔE^*_{ab} $\pm\sigma = 0,028$	[luteína] mg/ml	mg luteína/kg aceite
0	-	88,0	0,7	105,3	-	-	
1	123	84,6	10,3	131,9	28,5	0,02	21,7
2	185	82,3	17,1	134,7	34,1	0,03	32,7
3	311	80,3	21,8	133,2	35,8	0,05	54,5
4	439	79,0	24,8	132,2	37,2	0,07	76,3
5	504	77,8	27,1	130,6	38	0,08	87,1
6	636	76,7	29,6	129,3	39,2	0,10	108,9
7	771	75,4	31,5	127,6	40,0	0,12	130,7
8	839	74,6	32,9	126,6	40,9	0,13	141,6
9	977	73,6	34,5	125,0	41,6	0,15	163,4
10	1047	72,9	35,7	123,9	42,4	0,16	174,3

Tabla 3.5

Parámetros colorimétricos en la adición de extracto de antioxidantes sobre el AOVE "Melgarejo".
 Extracto de antioxidantes [luteína]= 2,3 mg/ml. Volumen inicial de aceite en cubeta=14 ml.
 $\rho_{\text{aceite}}=0,918$ g/ml (Aparicio et al., 2011).

Muestra	Antioxidante Adicionado (μl)	L^*	a^*	b^*	ΔE^*_{ab} $\pm\sigma = 0,028$	[luteína] mg/ml	mg luteína/kg aceite
0	-	88,8	1,3	109,0	-	-	-
1	123	84,8	11,4	133,3	26,5	0,02	21,7
2	185	82,8	16,9	135,3	31,1	0,03	32,7
3	311	81,3	20,6	134,4	32,7	0,05	54,5
4	439	79,6	24,3	132,9	34,3	0,07	76,3
5	504	78,5	26,8	131,7	35,6	0,08	87,1
6	636	77,4	29,2	130,4	36,8	0,10	108,9
7	771	76,5	30,8	129,1	37,6	0,12	130,7
8	839	75,6	32,6	127,9	38,7	0,13	141,6
9	977	74,8	33,9	126,9	39,6	0,15	163,4
10	1047	74,1	35,2	125,7	40,4	0,16	174,3

Considerando las diferencias de color totales respecto al color de los aceites originales, los resultados son los que muestra la Figura 3.7.

**Figura 3.7**

Diferencias de color CIELAB en 4 AOVE's en función del enriquecimiento con extracto de antioxidantes de los mismos.

La Tabla 3.6 muestra, a modo de resumen, los parámetros colorimétricos de todos los AOVE's utilizados y de los mismos adicionados con extracto hasta una concentración en luteína igual a 0,1 mg/ml. Puede observarse que los aceites que cambian menos de color tras la adición de extracto respecto del color original sin la adición de la misma, son los cuatro primeros y los cuatro últimos de la Tabla 3.6, en donde los valores del parámetro que indica la variación de color total se mantienen por debajo de 30 unidades CIELAB. En el resto de aceites los valores son muy superiores, superando en los aceites "I", "J" y "K" las 40 unidades CIELAB de diferencia de color.

A la vista de los datos, puede deducirse que una adición de 600 µl de extracto de antioxidantes genera AOVE's con una concentración de luteína igual a 0,1 mg/ml, concentración que haría que la ingesta media estimada por el COI (Comité Oleícola Internacional) para la población de España, que es de 36 ml por persona y día, fuera suficiente para incorporar los 3 mg de luteína que se estima que son necesarios para la prevención de enfermedades degenerativas tales como las comentadas en el apartado de introducción.

El color que se obtiene con la adición de extracto obviamente difiere del aceite original sin enriquecer, aunque esta diferencia no es demasiado grande para el caso de concentraciones 0,05 mg/ml y tiene algo más de importancia en aceites enriquecidos hasta 0,1 mg/ml, en referencia a cantidad de luteína.

Para valorar la incidencia que estas variaciones colorimétricas pueden tener en los consumidores, se ha abordado el ensayo de preferencia de color correspondiente al capítulo 6 de esta Tesis Doctoral (Emociones y preferencias de color en AOVE's enriquecidos con antioxidantes. Estudios de apreciación visual de poblaciones acostumbradas o no al consumo de aceite de oliva).

Tabla 3.6

Parámetros colorimétricos de los AOVE's originales y enriquecidos con luteína (0,1 mg/ml). La última columna muestra las diferencias de color CIELAB para cada AOVE.

AOVE	Procedencia	L*	a*	b*	ΔE^*_{ab}
A: Fuenroble (FR)	Orcera (Jaén)	78,81	6,91	123,13	-
		71,10	25,81	120,28	20,60
B: Santuario de Mágina (SM)	Huelma (Jaén)	81,9	5,10	122,3	-
		72,8	27,3	123,1	24,00
C: Oro Bailén (OB)	Bailén (Jaén)	83,68	1,79	119,15	-
		73,62	26,57	124,32	27,24
D: Oro de Génave (OG)	Génave (Jaén)	86,42	2,63	120,52	-
		76,70	27,31	129,05	27,86
E: Hojiblanca	Antequera (Málaga)	87,8	1,69	111,8	-
		76,6	29,6	129,2	34,7
F: La Cántara	Cambil (Jaén)	87,39	0,33	107,96	-
		76,41	28,5	128,8	36,68
G: Melgarejo	Pegalajar (Jaén)	88,8	1,30	109,0	-
		77,4	29,2	130,4	36,8
H: Carbonell	Nacional	88,0	0,72	105,3	-
		76,7	29,6	129,3	39,0
I: Garay	Lucena (Córdoba)	88,18	0,67	102,6	-
		77,40	27,9	130,17	40,22
J: Baena	Baena (Córdoba)	88,75	0,46	102,14	-
		76,82	29,18	129,51	41,43
K: Abades	Loja (Granada)	89,08	-0,03	102,66	-
		78,07	27,96	131,20	41,46
L: Castillo Canena Picual (CCP)	Baeza (Jaén)	80,27	3,06	121,04	-
		71,59	25,17	120,81	23,75
M: Castillo Canena Arbequina (CCA)	Baeza (Jaén)	81,73	-1,10	118,34	-
		72,79	22,57	122,59	25,66
N: Castillo Canena Frantoio (CCF)	Baeza (Jaén)	86,47	3,31	116,3	-
		77,67	26,2	130,33	28,25
P: Castillo Canena Royal (CCR)	Baeza (Jaén)	80,11	4,88	121,54	-
		72,02	25,3	121,62	21,96

3.4.- CONCLUSIONES

Se han podido solubilizar cantidades adecuadas de extracto de antioxidantes en los diferentes AOVE's ensayados, prestando especial atención a los cambios de color producidos por la adición del antioxidante como variable de monitorización y estudio. Se ha procedido a adicionar extracto de antioxidantes a diferentes AOVE's, estudiando cómo varían los parámetros colorimétricos a medida que va aumentando la concentración de luteína. En este sentido, se ha utilizado un extracto de luteína de concentración igual a 2,3 mg/ml, y se han realizado sucesivas adiciones de 100 µl de extracto hasta llegar a concentraciones en los aceites de 0,16 mg/ml (174,3 mg luteína/kg aceite), es decir, se han alcanzado concentraciones de luteína entre 22 y 87 veces superiores a las que presentan los aceites de oliva no enriquecidos en luteína (2-8 mg luteína/kg aceite).

La adición de extractos confiere a los AOVE's un color más amarillento-naranja, debido a la concentración de los pigmentos, principalmente al β-caroteno.

Los resultados obtenidos muestran que enriqueciendo los aceites hasta una concentración de 0,1 mg luteína/ml, se obtienen aceites con propiedades físico-químicas y colorimétricas muy aceptables, que además permiten incorporar al organismo buena parte de la ingesta diaria de luteína recomendada (6 mg), teniendo en cuenta el consumo medio estimado de aceite de oliva por habitante y día para nuestro país (36 ml).



**4. MEJORA DE LA ESTABILIDAD Y DE
LA FRACCIÓN DE CAROTENOIDES EN
AOVE´S MEDIANTE LA ADICIÓN DE
EXTRACTOS PROCEDENTES DE LA
MICROALGA *SCENDESMUS
ALMERIENSIS***

4.1.- INTRODUCCIÓN

Actualmente, el consumo de frutas y verduras en todo el mundo es un motivo de preocupación constante. De acuerdo con Pomerleau et al., (2004), en el año 2000 se produjeron 2,7 millones de muertes en todo el mundo y el 1,8% del total de enfermedades se atribuyó al bajo consumo de frutas y verduras. Además, se estima que la baja ingesta de frutas y verduras es la causante de aproximadamente el 14% de las muertes por cáncer gastrointestinal, alrededor del 11% de las muertes por enfermedades del corazón y del 9% de las muertes por infarto cerebrovascular (World Health Organization, 2014). El consumo de frutas y verduras en todo el mundo es insuficiente, con especial atención en adolescentes y niños, siendo este punto destacado por organismos y autoridades internacionales: Organización para la Cooperación y el Desarrollo (OECD 2013); Consejo Europeo de Información sobre la Alimentación (EUFIC 2012); Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades (CDC 2013).

Con un consumo reducido de frutas y verduras, ciertos componentes bioactivos de los alimentos no se ingieren en las dosis adecuadas, teniendo repercusiones en el organismo humano (Duyn y Pivonka, 2000). Así, el consumo de frutas y verduras reduce la probabilidad de padecer cáncer (Block et al., 1992) y enfermedades cardiovasculares (Veer et al., 2000). Entre los componentes bioactivos más importantes se encuentran los carotenoides (Gaziano et al., 1995). Los carotenoides actúan en procesos biológicos dentro del organismo, teniendo repercusiones en la salud (Granado et al., 2003). Las cantidades de carotenoides que se encuentran en los tejidos humanos son casi exclusivamente debidos a la ingesta a través de la dieta mediterránea, principalmente de frutas y verduras, o de suplementos.

Dos de los carotenoides más relevantes son el β -caroteno y la luteína. El β -caroteno es un carotenoide utilizado tanto como agente colorante de alimentos como fuente de vitamina A en la alimentación animal. El β -caroteno se utiliza también para el tratamiento de asma y protoporfiria eritropoyética, y para reducir el riesgo de varios tipos de cáncer de mama y cáncer de pulmón, además de enfermedades cardiovasculares (Omenn et al., 1996). Por otro lado, la absorción de β -caroteno reduce el riesgo de padecer degeneración macular senil (DMAE) (Teikari et al., 1998). El β -caroteno se encuentra en verduras, como zanahorias, calabazas y batatas proporcionándole a las mismas ese color naranja, aunque también se puede producir a partir de la microalga *Dunaliella sp.*



La luteína es una xantófila con actividad antioxidante, recomendada para prevenir algunos tipos de cáncer (Nishino, 1998), así como enfermedades cardiovasculares (Peterson et al., 2012) y enfermedades de la retina (Ozawa et al., 2012). La cantidad estimada de ingesta diaria de luteína a través del consumo de frutas y verduras es de $1,5 \text{ mg}\cdot\text{día}^{-1}$, siendo esta cantidad insuficiente para alcanzar la cantidad diaria recomendada de $3-6 \text{ mg}\cdot\text{día}^{-1}$ (Seddon et al., 1994), por lo que una línea de trabajo es tratar de aportar la cantidad restante a través de suplementos. La luteína se produce comercialmente a partir de la flor de caléndula (*Tagetes erecta L.*), pero el contenido en luteína de las flores de caléndula es muy bajo (aproximadamente 0,03% del peso seco), mientras que las microalgas como *Muriellopsis sp.*, *Chlorella sp.* y *Scenedesmus sp.* pueden contener cantidades muy superiores de este compuesto, hasta 0,90% del peso seco (García-González et al., 2005; Yen et al., 2011). La producción de luteína procedente de una nueva cepa de microalgas rica en este compuesto, *Scenedesmus almeriensis*, ha sido patentada por el grupo de Biotecnología de microalgas de la Universidad de Almería. Así, la microalga *S. almeriensis* puede contener hasta 1,5% del peso seco de luteína junto con otros carotenoides como β -caroteno y se produce en fotobiorreactores tubulares cerrados, en modo continuo a gran escala, con un alto rendimiento, siendo, por lo tanto una fuente continua y fiable de este carotenoide (Sánchez et al., 2008a; Sánchez et al., 2008b; Fernández-Sevilla et al., 2010).

Por otro lado, es importante resaltar que frente al reducido consumo de frutas y verduras, se está produciendo un alto incremento en el consumo de aceite de oliva. Así, el consumo y la producción del aceite de oliva de alta calidad está aumentando constantemente en todo el mundo en los últimos años (IOC 2013a; IOC 2013b). Por lo tanto, el aceite de oliva podría ser un buen medio de transporte para mejorar y aumentar la ingesta de carotenoides a través de la dieta mediterránea. En este sentido, en la presente Tesis Doctoral, los principales objetivos son estudiar los efectos de la adición de diferentes concentraciones de extracto de antioxidantes ricos en carotenoides a los aceites de oliva vírgenes extra. En los AOVE's se han determinado los parámetros de color, calidad, composición (perfil de ácidos grasos, tocoferoles, pigmentos) y la estabilidad oxidativa con el fin de corroborar su eficacia como antioxidantes.

4.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1.- PRODUCCIÓN DE LA MICROALGA *SCENEDESMUS ALMERIENSIS*

La microalga *S. almeriensis* CCAP 276/24 se ha producido en un fotobiorreactor tubular exterior de tamaño industrial (3.000 L), en modo continuo, a una velocidad de dilución de 0,30 L/día, en Almería (España) en primavera. El medio de cultivo utilizado ha sido preparado en agua utilizando compuestos fertilizantes (NaNO_3 , KH_2PO_4 y micronutrientes). Para evitar la contaminación, el medio de cultivo fue ozonizado y pasado por ultrafiltración (0,02 micras). Los cultivos se realizaron a $\text{pH}=8,0$ con inyección de CO_2 , a una temperatura por debajo de 30°C pasando agua termostatzada a través de un intercambiador de calor situado en el interior del reactor. La biomasa se cosechó diariamente por centrifugación y seguidamente fue liofilizada y almacenada a -18°C . Esta biomasa liofilizada es la que se utiliza como materia prima para la extracción de los antioxidantes (Acién et al., 2012b).

4.2.2.- MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

La luteína actualmente se obtiene y se purifica a partir de flores de caléndula por el método de saponificación-extracción-recristalización (Morita et al., 2002). Una modificación de este método ha sido utilizada para recuperar los carotenoides a partir de biomasa liofilizada de *S. almeriensis* (Cerón et al., 2008). El primer paso es un proceso de ruptura celular, con alúmina en una proporción 1:1 w/w, utilizando un molino de bolas (Staatlich Berlin Ku 4) a una velocidad de rotación de 120 rpm y con bolas de 28 mm de diámetro, durante 5 min de funcionamiento para eliminar los ácidos grasos. El segundo paso es una saponificación utilizando KOH al 4% w/v, con una concentración de biomasa de 100 g/L durante 5 min. Se ha demostrado que tratamientos alcalinos más prolongados o el uso de mayores concentraciones de KOH reducen el rendimiento del proceso. Por último, la extracción con hexano se realiza usando una proporción de hexano:muestra 1:1 v/v, llevando a cabo un total de tres pasos para recuperar más del 90% de los carotenoides contenidos en la biomasa procesada. En cada paso se ha añadido un volumen de etanol igual al 1% del volumen total para evitar la emulsión (Camacho et al., 2007). Finalmente, el hexano se ha eliminado del extracto mediante destilación a vacío.



4.2.3.- PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS DE ACEITE DE OLIVA

Se han utilizado cinco aceites de oliva vírgenes extra comerciales (AOVE's) de la provincia de Jaén ("A", "B", "C", "D" y "F") (Tabla 3.1, página 86). Se ha partido de tres botellas de 750 ml de cada aceite de oliva ($n = 3$). De cada botella, se han preparado tres muestras de 50 ml cada una, correspondientes a: control (aceite de oliva sin extracto (I)); aceite de oliva con 0,1 mg de extracto por ml de aceite (II); y aceite de oliva con 0,21 mg de extracto por ml de aceite (III). Todos los aceites de oliva se han filtrado en presencia de sulfato de sodio anhidro antes de su uso. Una vez preparadas, las muestras se han homogeneizado y mantenido a 4 °C antes de los correspondientes análisis.

4.2.4.- PARÁMETROS FÍSICOS Y DE CALIDAD EVALUADOS

4.2.4.1.- Determinación de Color

Se ha utilizado un colorímetro modelo Konica Minolta CR-400 para la medición del color de los aceites de oliva con y sin la adición del extracto. Las diferencias de color (ΔE^*_{ab}) entre las muestras control consideradas como estándar (aceites de oliva sin adición del extracto) y los aceites enriquecidos (con adición del extracto) se han calculado a partir de los valores determinados de variables monocromáticas L^* , a^* , y b^* obtenidas mediante el método CIELAB, así como el índice de amarilleamiento (YI) tal y como describe Zamora et al., (2004):

$$\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad \text{Ecuación 4.1}$$

$$YI = \frac{142,86 b^*}{L^*} \quad \text{Ecuación 4.2}$$

L^* es una medida de luminiscencia o componente de luminosidad, que oscila de 0 a 100 (negro y blanco); los valores de a^* van del negativo al positivo (verde a rojo); y b^* también se extiende desde el negativo al positivo (azul a amarillo).

4.2.4.2.- Determinación de parámetros de calidad

La acidez libre (FA), el índice de peróxidos (PV) y los coeficientes de extinción específica a 232 y 270 nm (K_{232} y K_{270}) se han determinado de acuerdo a los métodos estándar de la Unión Europea (Anexos II y IX del Reglamento Europeo CEE 2568/91 del 11 Julio).

4.2.5.- DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE *p*-ANISIDINA

Los aldehídos insaturados y los productos de oxidación secundaria, se han determinado mediante el valor de anisidina (*p*-AV), como se detalla en la norma ISO 6885 (2006). Esta medida se basa en el incremento de absorbancia por gramos de aceite, medida a 350 nm (Genesys 10UV), de una solución de aceite de oliva en iso-octano, antes y después de la reacción con el reactivo *p*-anisidina en la oscuridad.

4.2.6.- ESTABILIDAD OXIDATIVA

La estabilidad oxidativa se ha determinado midiendo el tiempo de inducción a la oxidación, en un equipo Rancimat 743 (Metrohm CH, Suiza). Se ha burbujeado aire limpio, filtrado y secado (20 L/h) a través del aceite (3,00 g) calentando a $120 \pm 1,6$ °C, recogiendo los compuestos volátiles en agua, y midiendo continuamente el aumento de la conductividad. Se ha registrado el tiempo necesario para alcanzar la conductividad de inflexión.

4.2.7.- COMPOSICIÓN EN ÁCIDOS GRASOS

Los ácidos grasos se evaluaron como sus ésteres de metilo, después de la transesterificación alcalina en frío con una solución metanólica de hidróxido de potasio (Commission Regulation 2568/91 del 11 de Julio) y la extracción con n-heptano. El perfil de ácidos grasos se ha determinado con un cromatógrafo Chrompack CP 9001 equipado con un inyector split-splitless, un detector FID, un muestreador automático Chrompack CP-9050 y una columna capilar de sílice fundida de 50 m x 0,25 mm de diámetro interno recubierta con una película de 0,19 μ CP-Sil 88 (Varian). Se ha utilizado helio como gas portador a una presión interna de 110 kPa. Las temperaturas del inyector y del detector han sido de 250 a 230 °C, respectivamente. La temperatura del horno se ha programado a 120 °C durante los 3 primeros minutos con un aumento de 4 °C/min hasta 220 °C. La



relación de separación ha sido de 1:50 y el volumen inyectado de 1 μ l. Los resultados se han expresado en porcentaje relativo de cada ácido graso, calculado por la normalización interna del área del pico cromatográfico que eluye entre ésteres metílicos, mirístico y lignocérico. Una muestra de control (aceite de oliva 47118, Supelco) y una mezcla de ésteres de ácidos grasos estándar metílicos (FAME Supelco 37 Mix) se han utilizado con el objetivo de realizar la identificación y la calibración (Sigma, España).

4.2.8.- COMPOSICIÓN EN TOCOFEROLES

La composición en tocoferoles se ha evaluado siguiendo la norma internacional ISO 9936 (2006), con algunas modificaciones tal como se describe en el trabajo de Malheiro et al., (2013a). Los tocoferoles estándar (α , β , γ y δ) se han adquirido de Calbiochem (La Jolla, San Diego, CA) y Sigma (España), mientras que el estándar interno 2-metil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)chroman-6-ol (tocol) fue de Matreya Inc. (Pleasant Gap, PA). Una cantidad precisa de aceite de oliva filtrado y de extracto de *S. almeriensis* se han mezclado con una cantidad apropiada de disolución patrón interno (tocol) en un volumen de 1,5 ml de n-hexano y se ha homogeneizado por agitación. La preparación de la muestra se ha llevado a cabo en oscuridad y los tubos que contienen las muestras se han envuelto en papel de aluminio. La mezcla se ha centrifugado durante 5 minutos a 13.000 rpm y el sobrenadante se ha analizado mediante HPLC. El cromatógrafo de líquidos consiste en un sistema integrado Jasco (Japón) equipado con una unidad de datos Jasco LC-NetII/ADC, una bomba inteligente PU-1580, una unidad de gradiente cuaternario LG-1580-04, un desgasificador de cuatro líneas DG-1580-54 y un detector de fluorescencia FP-920 (λ_{exc} = 290 nm y λ_{em} = 330 nm). La separación cromatográfica se consiguió en una columna Supelcosil TM LC-SI (3 μ m) 75 x 3,0 mm (Supelco, Bellefonte, PA), operando a temperatura ambiente constante (23°C). Se ha utilizado como eluyente, a un caudal de 0,7 ml/min, una mezcla de n-hexano y 1,4-dioxano (97,5:2,5). Los datos se han analizado con el cromatógrafo ChromNAV - Data Station JASCO (Japón). Los compuestos se han identificado por comparación cromatográfica con patrones auténticos, por co-elución y por sus espectros de UV. La cuantificación se ha basado en el método de patrón interno, usando la respuesta de la señal de fluorescencia.

4.2.9.- COMPOSICIÓN DE LOS PIGMENTOS

Los extractos fueron preparados de acuerdo con Achir et al., (2010). Se ha añadido una cantidad adecuada de patrón interno de β -apo-carotenal (Sigma-Aldrich) a 200 mg de muestra de aceite de oliva, se ha mezclado con 2 ml de acetona en un agitador vortex durante 10 s, y se ha dejado durante la noche a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la cristalización del triacilglicerol. Los triacilgliceroles fueron separados por muestreo rápido seguido de centrifugación a 13.000 rpm. Estos pasos se han omitido en el análisis del extracto de *S. almeriensis*, siendo directamente diluido en acetona después de la adición del patrón interno. El extracto fue inyectado directamente en la columna de HPLC, Phenomenex Luna C18 (250 x 3,5 mm d.i) a $23\text{ }^{\circ}\text{C}$, y eluido con un gradiente lineal de 30 min con metanol acuoso al 80% (v/v) que contenía 0,05% de trietilamina y 20% de acetato de etilo (conteniendo 0,05% de trietilamina) a 1 ml/min. El análisis se ha realizado en el mismo equipo de HPLC descrito para el análisis de tocoferoles, excepto por el uso de un detector DAD (JASCO MD-2015-Plus, Japón). La luteína y el β -caroteno se han adquirido de Sigma. Las curvas de calibración se construyeron a 440 nm para la luteína y el β -caroteno frente al patrón interno.

4.2.10.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

4.2.10.1.- Análisis de la varianza

Se ha realizado un análisis de la varianza utilizando el procedimiento del Modelo Lineal General del software SPSS, versión 21.0 (IBM Corporation, Nueva York, EE.UU.). El cumplimiento de los requisitos del ANOVA, la normalidad de los residuos y la homogeneidad de la varianza, se han evaluado mediante el test de Kolmogorov-Smirnov con la corrección de Lilliefors (si $n > 50$), por el test de Shapiro-Wilk (si $n < 50$), y los test de Levene, respectivamente. Todas las variables dependientes se han analizado mediante un ANOVA de una vía con o sin corrección de Welch, dependiendo de si el requisito de la homogeneidad de las varianzas se cumplía o no. El principal factor estudiado ha sido el efecto de la adición de diferentes concentraciones del extracto de *S. almeriensis* en la calidad de los AOVE's (FA, PV, p -AV, TOTOX, K_{232} , K_{270} , y ΔK), los parámetros de color (a^* , b^* , L^* , ΔE^*_{ab} y YI), el perfil de ácidos grasos, la composición de tocoferoles (α -, β -, γ -, y tocoferoles totales), la estabilidad oxidativa y la composición de pigmentos (luteína y β -caroteno). En caso de que se detecte un efecto estadísticamente significativo, las muestras se comparan mediante el índice de Tukey, test de comparación múltiple o el



test de Dunnett T3, dependiendo de si la igualdad de las diferencias podrían ser asumidas o no. Todas las pruebas estadísticas se han realizado a un nivel de significancia del 5%.

4.2.10.2.- Análisis de los Componentes Principales (PCA)

Se ha aplicado el análisis de los componentes principales (PCA) para reducir el número de variables en los AOVE's enriquecidos con diferentes concentraciones de extracto de *S. almeriensis* (4 variables correspondiente a los parámetros de color - L^* , a^* , b^* , y YI ; 5 variables correspondientes a los parámetros de calidad -FA, PV, K_{232} , K_{270} y ΔK ; el índice de p -AV, el índice TOTOX; 4 variables correspondientes a los tocoferoles, incluyendo el contenido total de vitamina E (tocoferoles totales); la estabilidad oxidativa; el contenido de luteína y β -caroteno; con un total de 18 variables) a un número menor de nuevas variables derivadas (componentes principales) que resumen adecuadamente la información original, es decir, la adición de diferentes concentraciones de *S. almeriensis* a los AOVE's. Este análisis ha permitido el reconocimiento de patrones en los datos, utilizando las nuevas variables derivadas como dimensiones (mediante las puntuaciones de los componentes principales). Este PCA se ha realizado utilizando el software SPSS, versión 21.0 (IBM Corporation, Nueva York, EE.UU.).

4.2.10.3.- Análisis Discriminante Lineal (LDA)

Se ha utilizado el análisis discriminante lineal (LDA) como técnica de aprendizaje supervisado para clasificar las diferentes concentraciones de extracto de *S. almeriensis* añadido en función de su color y de la calidad de sus parámetros, TOTOX, p -AV, el contenido de tocoferoles, el perfil de ácidos grasos, el contenido en pigmentos del AOVE, y la estabilidad oxidativa (32 variables en total). Una técnica gradual, que utiliza el método lambda de Wilks con las probabilidades habituales de F (3,84 para entrar y 2,71 para eliminar), fue aplicada para la selección de variables. Este procedimiento utiliza una combinación de selección hacia adelante y procedimientos de eliminación hacia atrás, donde antes de seleccionar una nueva variable para ser incluida, se verifica si todas las variables seleccionadas previamente siguen siendo significativas. Con este enfoque, es posible identificar las variables significativas entre todas las variables en estudio. Para comprobar qué funciones discriminantes canónicas fueron significativas, se aplicó el método lambda de Wilks. Para confirmar la capacidad predictiva del modelo se utilizó un procedimiento de validación cruzada. Por otra parte, la sensibilidad y especificidad del modelo discriminante se calcularon a partir del número de individuos predicho

correctamente como perteneciente a un grupo asignado. La sensibilidad se calculó dividiendo el número de muestras de un grupo específico correctamente clasificado entre el número total de muestras que pertenecen a ese grupo específico. La especificidad se calculó dividiendo el número de muestras de un grupo específico clasificadas como pertenecientes a ese grupo, entre el número total de muestras de cualquier grupo clasificado como pertenecientes a ese grupo específico. El LDA se llevó a cabo utilizando el software SPSS, versión 21.0 (IBM Corporation, Nueva York, EE.UU.).

4.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1.- PARÁMETROS DE COLOR

El color de los AOVE's se ha utilizado para valorar la apariencia de los aceites tras la adición del extracto de *S. almeriensis*, ya que el aspecto visual de los aceites de oliva es un factor importante para la evaluación y preferencia de los consumidores (Gómez-Caravaca et al., 2007). En la Tabla 4.1 se presentan los principales valores CIELAB, L^* , a^* b^* obtenidos a partir de AOVE's con diferentes concentraciones de extracto de *S. almeriensis*. En los cinco aceites estudiados se aprecia el efecto en el color tras la adición del extracto. Los valores de a^* disminuyen con la concentración de extracto añadido de forma similar en los 5 aceites, existiendo diferencias significativas (Tabla 4.1). Esto significa que la coloración verde, típica de los AOVE's, pasa a una coloración más amarillo-naranja. Con respecto al valor b^* , se observa un aumento de este parámetro, principalmente con la adición de 0,1 mg de extracto por ml de aceite de oliva, ya que los aceites de oliva se hacen más amarillos con la adición del extracto procedente de *S. almeriensis* (Tabla 4.1 y Figura 4.1). La claridad (L^*) de los aceites de oliva disminuye significativamente en todas las muestras, se observa una proporción directa entre la concentración de extracto y la claridad observada, la cual convierte a los AOVE's con extracto adicionado más oscuros que los controles (aceites sin extracto) (Figura 4.1).

Los resultados obtenidos en a^* , b^* y L^* , muestran que la adición de extracto de *S. almeriensis* a los AOVE's provoca cambios significativos en su color, observaciones corroboradas por el parámetro ΔE^*_{ab} (diferencia de color). En la Figura 4.1 se observan las diferencias de color (Fig. 4.1a) entre los aceites de oliva con y sin extracto de *S. almeriensis* y el índice de amarilleamiento (YI) (Fig. 4.1b). Los valores ΔE^*_{ab} son más altos en AOVE's enriquecidos, lo que significa que las diferencias de color de los aceites con extracto aumentan (Fig. 4.1). El índice YI aumenta significativamente con la adición

del extracto, sin embargo, no se observan diferencias entre la adición de 0,1 mg/ml y 0,21 mg/ml.

El efecto de la adición de extracto de *S. almeriensis* se aprecia claramente, incluso a simple vista (Figura 4.1, derecha). El color adoptado por los aceites está relacionado con la composición del extracto, donde predominan los carotenoides (Cerón et al., 2008), como se discutirá en la sección 4.3.5.

4.3.2.- PARÁMETROS DE CALIDAD

La calidad de los AOVE's se ha evaluado para verificar si las adiciones de extracto de *S. almeriensis* causan modificaciones en la calidad. Las observaciones globales ponen claramente de manifiesto que no hay degradación de la calidad con la adición de extracto (Tabla 4.1). En cuanto a los valores de ácidos grasos (FA), en cuatro de los cinco aceites de oliva estudiados, no se observaron cambios significativos, excepto en el aceite "C", en el que la adición del extracto reduce los niveles de ácidos grasos libres, pero sin cambios significativos entre los aceites con extracto. Estos resultados son positivos, ya que la adición de extracto no provoca reacciones hidrolíticas en los aceites de oliva, manteniendo los niveles de ácidos grasos libres.

La posible aparición de procesos oxidativos en los AOVE's se controló mediante la determinación de varios parámetros de calidad (PV, K_{232} , K_{270} , ΔK , y p -AV) presentados en la Tabla 4.1. La peroxidación de los AOVE's disminuye con la adición de extracto de *S. almeriensis*, ya que en todos los aceites, excepto el "F", se observa una disminución significativa en el índice de peróxidos (PV). Por lo tanto, la formación de productos de oxidación primarios (principalmente hidroperóxidos) (Laguette et al., 2007) es inhibida, actuando el extracto de *S. almeriensis* como antioxidante. Los coeficientes de extinción específica a 232 y 270 nm (K_{232} y K_{270} , respectivamente) también corroboran que la adición de extracto tampoco afecta a la calidad de los aceites de oliva. En K_{232} y ΔK no se observaron cambios significativos en los aceites, sin embargo, la adición de extracto aumenta significativamente los valores de K_{270} de los AOVE's. El parámetro K_{270} es indicativo de la formación de productos secundarios de oxidación y mediante la evaluación de los valores obtenidos en el análisis de p -AV, se concluye claramente que la adición de extracto no influye en la oxidación secundaria de los aceites de oliva, por lo que los resultados obtenidos en K_{270} podrían estar relacionados con el color conferido a los aceites por la adición de extracto. Según Malheiro et al., (2011) el análisis de p -AV se utiliza para evaluar la rancidez oxidativa avanzada de aceites vegetales. El método

analítico se basa en la reactividad del enlace carbonilo aldehído sobre los grupos amina de *p*-anisidina, lo que lleva a la formación de la base de Schiff que absorbe a 350 nm. Esto permite la estimación de los productos de oxidación secundarios de los ácidos grasos insaturados, principalmente dienales y 2-alquenes (Labrinea et al., 2001). Por lo tanto, mediante el estudio de los parámetros de calidad (Tabla 4.1) de los AOVE's estudiados se puede deducir que la adición de extracto no influye negativamente ni en las reacciones oxidativas primarias (PV y K_{232}) ni en las secundarias (*p*-AV). De hecho, la adición es positiva, ya que se observa una menor formación de hidroperóxidos y un aumento general en la calidad de los AOVE's, como se aprecia en el valor de TOTOX (Tabla 4.1). El valor TOTOX es una herramienta útil en la evaluación de la degradación oxidativa de los aceites vegetales, siendo también considerado como el valor total de oxidación de acuerdo con la norma ISO 6885 (2006). De los cinco AOVE's analizados, el aceite "B" fue el único en el que no se observaron disminuciones significativas en el valor de TOTOX. Los AOVE's restantes presentaban un menor deterioro oxidativo con la adición de extracto. En este punto hay que resaltar que se han registrado valores más bajos de TOTOX en comparación con los obtenidos en AOVE's italianos (Cerretani et al., 2009).

Con respecto a todos los valores obtenidos en los parámetros de calidad de los AOVE's con y sin adición de extracto de *S. almeriensis*, todos los aceites podrían ser clasificados como AOVE's de acuerdo con la legislación Comunitaria Europea ((EU), nº 299/2013).

4.3.3.- PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

El perfil de ácidos grasos de los AOVE's con y sin diferentes concentraciones de extracto de *S. almeriensis* se observa en la Tabla 4.2. El perfil de ácidos grasos de los cinco AOVE's está compuesto principalmente por ácido oleico (C18:1), seguido de ácido palmítico (C16:0) y ácido linoleico (C18:2). En los AOVE's estudiados, la adición de extracto de *S. almeriensis* no conlleva cambios significativos en el perfil de ácidos grasos, excepto en algunas situaciones específicas. En dos AOVE's ("C" y "D") el contenido de ácido palmítico aumenta de manera significativa, mientras que en el "F" se observó la misma relación con el ácido linoleico. El contenido de ácido linolénico (C18:3) en los aceites de oliva "C" y "A", aumenta considerablemente (Tabla 4.2). En cuanto a las diferentes fracciones de ácidos grasos que componen los AOVE's estudiados, como se esperaba, debido a su alto contenido en ácido oleico, los MUFA (ácidos grasos monoinsaturados) fueron los más abundantes (> 77%), seguidos de los SFA (ácidos



grasos saturados) entre 14,40% y 17,15%, y los PUFA (ácidos grasos poliinsaturados) con valores comprendidos entre el 3,59% y 4,70% (Tabla 4.2). Los ácidos grasos trans han resultado ser siempre iguales o inferiores al 0,05% (Tabla 4.2).

4.3.4.- COMPOSICIÓN EN TOCOFEROLES

La composición detallada en tocoferoles de los AOVE's con diferentes concentraciones de extracto de *S. almeriensis* se observa en la Tabla 4.3. En los cinco aceites de oliva analizados, se han detectado y cuantificado tres tocoferoles: α -, β -, y γ -tocoferol. El α -tocoferol estaba presente en cantidades más altas, como era de esperar para los aceites de oliva (Malheiro et al., 2012), con contenidos comprendidos entre 119 y 429 mg/kg en los AOVE's control. Los valores de β -tocoferol fueron de 4 a 6 mg/kg, mientras que los de γ -tocoferol oscilaron entre 40 y 55 mg/kg en todas las muestras estudiadas (Tabla 4.3). La cantidad total de tocoferoles encontrada oscilaba entre 159 mg/kg (correspondiente al aceite "F" en las muestras control) y 511 mg/kg (aceite "C" con 0,1 mg/ml de extracto). La adición de extracto de *S. almeriensis* no afecta considerablemente a la cantidad de tocoferoles totales, así como a los tocoferoles individuales, excepto en algunos casos particulares (Tabla 4.3). Estas observaciones concuerdan con la ausencia de tocoferoles en el extracto de *S. almeriensis*. Principalmente el α -tocoferol, posee una importante acción antioxidante y vitamínica, el hecho de que la adición de *S. almeriensis* no comprometa su contenido es una buena señal, ya que ambas propiedades biológicas importantes se conservan en los aceites de oliva vírgenes extra.

4.3.5.- COMPOSICIÓN DE PIGMENTOS

El análisis llevado a cabo mediante HPLC del extracto de antioxidantes de *S. almeriensis*, reveló su composición, siendo el β -caroteno el compuesto más representativo con un 13,3% del extracto total, seguido por un 0,25% en luteína y un 1% de otros carotenoides no identificados. Las determinaciones espectrofotométricas corroboraron los resultados anteriores, con un promedio de 14,4% del total de compuestos carotenoides en el extracto de *S. almeriensis*.

La composición de los pigmentos de los cinco AOVE's con y sin adición de extracto de *S. almeriensis*, se muestra en la Figura 4.2a y Fig.4.2b. De los resultados obtenidos se puede deducir que los extractos de *S. almeriensis* son principalmente ricos en carotenoides: β -caroteno y luteína, siendo el primero el componente mayoritario. En



todos los AOVE's analizados, el contenido de luteína en los aceites control osciló entre 4,5 y 6,3 mg/kg (Figura 4.2b). La adición del extracto de *S. almeriensis* produce un aumento considerable del contenido en luteína en todos los AOVE's (excepto en el aceite "C"). El aumento en luteína con la adición de extracto a 0,1 mg/ml fue sólo estadísticamente significativo en los aceites "B" y "F", mientras que la adición de 0,21 mg/ml fue significativa en los aceites "B", "F" y "A" en comparación con los aceites control. Por lo tanto, la adición de 0,1 mg/ml sería la mejor opción a fin de mejorar el contenido en luteína de los AOVE's. Además, se ha observado que los extractos de *S. almeriensis* son muy ricos en otros carotenoides como el β -caroteno (Figura 4.2a). El contenido en β -caroteno en los AOVE's control ha variado entre 1,2 mg/kg (aceite "F") y 4,1 mg/kg (aceite "A"). Con la adición de 0,1 mg/ml de extracto, el contenido de β -caroteno aumentó 6,5 veces en el AOVE "A", 6,0 en el "B", 11,1 en el "C", 4,4 en el "D" y 8,3 veces en el "F". Con una adición de 0,21 mg/ml el contenido β -caroteno aumentó 9 veces en el aceite "A" y 25,8 veces en el aceite "F". El contenido en β -caroteno de los AOVE's con 0,21 mg/ml varió entre 30,1 y 37,1 mg/kg (en los aceites "C" y "A" respectivamente; Figura 4.2a). Comparando los AOVE's enriquecidos con hojas de olivo durante el proceso de extracción (Malheiro et al., 2013b), se encuentran AOVE's con un contenido inferior en luteína, pero mucho más alto en β -caroteno, que resulta de la adición del extracto de *S. almeriensis*, sin un incremento significativo en el contenido de clorofilas y feofitinas, como se observa con la adición de extracto de hojas de olivo durante el proceso de extracción.

El incremento en carotenoides ha provocado cambios significativos en el color y la calidad de los AOVE's como se ha comprobado en las secciones 4.3.1 y 4.3.2 y se puede apreciar en la Figura 4.1 y la Tabla 4.1 de este capítulo de Tesis.

4.3.6.- ESTABILIDAD OXIDATIVA

La estabilidad oxidativa de los AOVE's se ha evaluado con el fin de verificar si la adición de extracto de *S. almeriensis* podría mostrar o no alguna actividad antioxidante y pro-oxidante en los AOVE's. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 4.2c y muestran claramente que los extractos de *S. almeriensis* actúan como antioxidantes, protegiendo a los aceites frente a la oxidación. Un aumento significativo de la resistencia a la oxidación se ha verificado en todos los aceites de oliva. Además se observa que mediante la adición de 0,21 mg de extracto por ml de aceite, no se aprecian aumentos significativos en la estabilidad oxidativa comparado con la adición de 0,1 mg/ml (excepto en el aceite "A"). Así, se podría concluir que la adición de 0,21 mg/ml de extracto de *S. almeriensis* a los AOVE's podría ser excesiva, ya que no se han observado mejoras

adicionales, y podrían también posiblemente actuar como prooxidantes. La adición de 0,1 mg/ml ha aumentado la estabilidad oxidativa de los AOVE's de 11,85% (en el aceite "F") a 37,80% (en el aceite "B"), mientras que la de 0,21 mg/ml elevó la estabilidad oxidativa entre 15,76% (en el aceite "F") y 42,06% (en el aceite "C"). El aumento de la estabilidad oxidativa se relaciona con la composición del extracto de *S. almeriensis*, especialmente rico en β -caroteno. El β -caroteno es un compuesto antioxidante reconocido (Sies y Stahl, 1995), y de acuerdo con Aparicio et al., (1999), en condiciones normales, los carotenoides son responsables de aproximadamente el 6% de la estabilidad de los aceites de oliva. En este tipo de aceites, con grandes cantidades de β -caroteno, la contribución de los carotenoides a la estabilidad oxidativa es mucho mayor. Estas observaciones son importantes ya que la vida útil de los AOVE's podría incrementarse considerablemente, siendo interesante estudiar el impacto y la estabilización de los AOVE's con extractos de *S. almeriensis* durante el periodo de almacenamiento y procesamiento térmico.

4.3.7.- DISCRIMINACIÓN DE LOS ACEITES DE OLIVA POR LA ADICIÓN DE EXTRACTO DE *SCENEDESMUS ALMERIENSIS*

La adición de extracto de *Scenedesmus almeriensis* a diferentes concentraciones afecta claramente al color, la calidad, la composición y la estabilidad oxidativa de los AOVE's de una manera que hace posible la distinción de acuerdo a la concentración de extracto añadido en cada aceite de oliva. En la Figura 4.3a se muestra la representación bidimensional con respecto a los dos componentes principales, que explican el 58,61% de la varianza total de los datos obtenidos. Se percibe que el primer componente principal (PC1) separa el AOVE control (sin extractos) de los AOVE's con adición de extracto procedente de *S. almeriensis*. Los AOVE's control representados en toda la región negativa de PC1 (Figura 4.3a), se caracterizaron por poseer los peores índices de calidad (PV, FA, y el valor TOTOX), mientras que los AOVE's con la adición de 0,1 y 0,21 mg/ml, representados principalmente en la región positiva de PC1, se asocian con valores más altos en los parámetros de color (a^* , b^* , L^* , ΔE^*_{ab} , y YI -Tabla 4.1 y Figura 4.1), con mayor contenido en luteína y β -caroteno (Figura 4.2a y Fig. 4.2b), y una mayor estabilidad frente a la oxidación (Fig. 4.2c).

Junto con el método PCA sin supervisión, se ha aplicado un análisis discriminante lineal gradual (LDA) a los datos obtenidos, con el fin de crear un modelo discriminante. El modelo obtenido determinó siete funciones discriminantes importantes que explican el 100% de la varianza, aunque sólo se utilizaron las dos primeras, ya que explican el

89,3% de la varianza de los datos experimentales (Función 1: 52,8% y Función 2: 36,5%; Fig. 4.3b). De las 32 variables iniciales, el modelo ajustado se basó en 7 variables: b^* , L^* , YI , β -caroteno, luteína, α -tocoferol y γ -tocoferol. Una vez más, la quimiometría demuestra que la adición de extracto de antioxidantes tiene un efecto importante en el color de los AOVE's correspondiente al contenido de pigmentos, de manera que es posible clasificar correctamente todas las muestras. El modelo mostró además un rendimiento muy satisfactorio, ya que permitió clasificar correctamente todas las muestras con respecto a los AOVE's pertenecientes y a la concentración correcta de *S. almeriensis*. Se observaron los mismos resultados para el procedimiento de validación cruzada (sensibilidad y especificidad del 100%), lo que demuestra que la clasificación de los grupos originales no se sobreestimó. En la Figura 4.3b se puede observar que las funciones discriminantes separan los AOVE's de acuerdo a la concentración de los extractos de *S. almeriensis* añadidos, y entre los que tienen la misma concentración es posible separar los diferentes AOVE's estudiados. El tratamiento de dichos datos ayudó a reconocer los efectos de la adición de extracto en los AOVE's, y a observar de una manera integrada y resumida todos los datos.

4.3.8.- INCORPORACIÓN DE *S. ALMERIENSIS* Y CONSUMO DE ACEITE DE OLIVA

De la totalidad de los datos obtenidos en el estudio de los AOVE's se observa claramente que los principales cambios están relacionados con la concentración de carotenoides de los extractos, principalmente de β -caroteno y luteína, como era de esperar. Los carotenoides son componentes muy importantes en varios procesos biológicos para el organismo humano, que tienen repercusiones en la salud humana (Granado et al., 2003). La luteína y el β -caroteno presentes en los extractos de *S. almeriensis* son dos buenos ejemplos. Las cantidades de carotenoides que se encuentran en los tejidos humanos son casi exclusivamente de origen alimentario, principalmente procedentes de frutas y verduras, o de suplementos, pero su consumo es deficiente en muchos países. De acuerdo con el Informe CDC sobre el consumo de frutas y verduras (CDC 2013), en los EE.UU. el 37,7% y el 22,6% de la población adulta consumen frutas y verduras, respectivamente, menos de una vez al día. Respecto a la población adolescente, se obtiene que el 36,0% y 37,7% consumen frutas y verduras, respectivamente, menos de una vez al día. La ingesta de frutas media en EE.UU. para adultos y adolescentes es de 1,0 y 1,1 veces al día, mientras que para el consumo de verduras, los valores aumentan a 1,6 y 1,3 veces al día, (CDC 2013). De acuerdo con Kimmons et al., (2009), pocos adolescentes y adultos estadounidenses consumen las cantidades recomendadas de frutas y verduras. Aunque las cifras de Europa no son



aparentemente tan inquietantes, en varios países la ingesta de carotenoides a partir de fuentes naturales todavía es reducida (Tennant et al., 2014). Por otro lado, la producción y el consumo de aceite de oliva, está en constante aumento en todo el mundo en los últimos años (IOC 2013a; IOC 2013b). La luteína y el β -caroteno están naturalmente presentes en el aceite de oliva, pero en dosis bajas (Malheiro et al., 2013a). Con la incorporación del extracto de *S. almeriensis* el contenido en carotenoides aumenta en el aceite de oliva, principalmente el de β -caroteno (Fig. 4.2a). Por lo tanto, la incorporación de extractos de *S. almeriensis* al AOVE es una buena estrategia para fomentar el consumo de carotenoides esenciales e incorporarlos al organismo humano. Desde el punto de vista nutricional, el consumo de AOVE's enriquecidos con extractos procedentes de *S. almeriensis* sería un activo valioso para contrarrestar el consumo deficiente de frutas y verduras. Además, los carotenoides procedentes de la microalga *S. almeriensis* poseen una bioaccesibilidad para la absorción en el organismo muy superior a los de muchas frutas y verduras o suplementos (Granado et al., 2009). Aun así, se deben de realizar más ensayos antes de la comercialización de este tipo de productos, haciendo especial énfasis en la seguridad para el consumidor. Además, la preparación de extracto de *S. almeriensis*, debe ser optimizada para una mayor productividad en la industria alimentaria.

4.4.- CONCLUSIONES

La adición de extracto de *S. almeriensis* conlleva cambios significativos en el color, la calidad, la composición y la estabilidad de los AOVE's. La adición de extractos proporciona a los AOVE's un color más amarillo-naranja debido a la concentración de los pigmentos, principalmente el β -caroteno. La estabilidad oxidativa ha mejorado notablemente por adición del extracto de *S. almeriensis* y también se ha mejorado la vida útil de los aceites, protegiéndolos frente a los agentes oxidantes. La peroxidación de los AOVE's se reduce, así como la formación de productos de oxidación, por tanto, se produce una mejora en la calidad de estos AOVE's. El perfil de ácidos grasos no se ve afectado por la adición del extracto, así como el contenido de tocoferoles.

En general, la adición de extracto de antioxidantes es beneficiosa para discriminar los diferentes AOVE's de acuerdo con la cantidad de extracto añadido. De todos los resultados obtenidos se concluye que, la adición de 0,21 mg/ml no contribuye decisivamente a la calidad y composición de los AOVE's comparativamente a la de 0,1 mg/ml. Por lo tanto, la concentración de 0,1 mg/ml de extracto de *S. almeriensis* sería una concentración óptima, ya que se conservan todas las propiedades y características de los AOVE's originales, mientras que al mismo tiempo proporciona dosis importantes de compuestos bioactivos y una mayor estabilidad frente a la oxidación.

La posible introducción de este tipo de antioxidantes en el aceite de oliva aumentaría la ingesta diaria de carotenoides esenciales en la dieta, con la mejora de las propiedades para la salud de los consumidores, ya que confiere importantes activos nutricionales. Además, se han llevado a cabo en esta Tesis distintos ensayos para evaluar la estabilidad de este tipo de AOVE's durante el almacenamiento, y se ha estudiado la estabilidad en función de tres variables principales de degradación: el tiempo, la temperatura y la exposición a la luz (capítulo 5 de esta Tesis Doctoral).

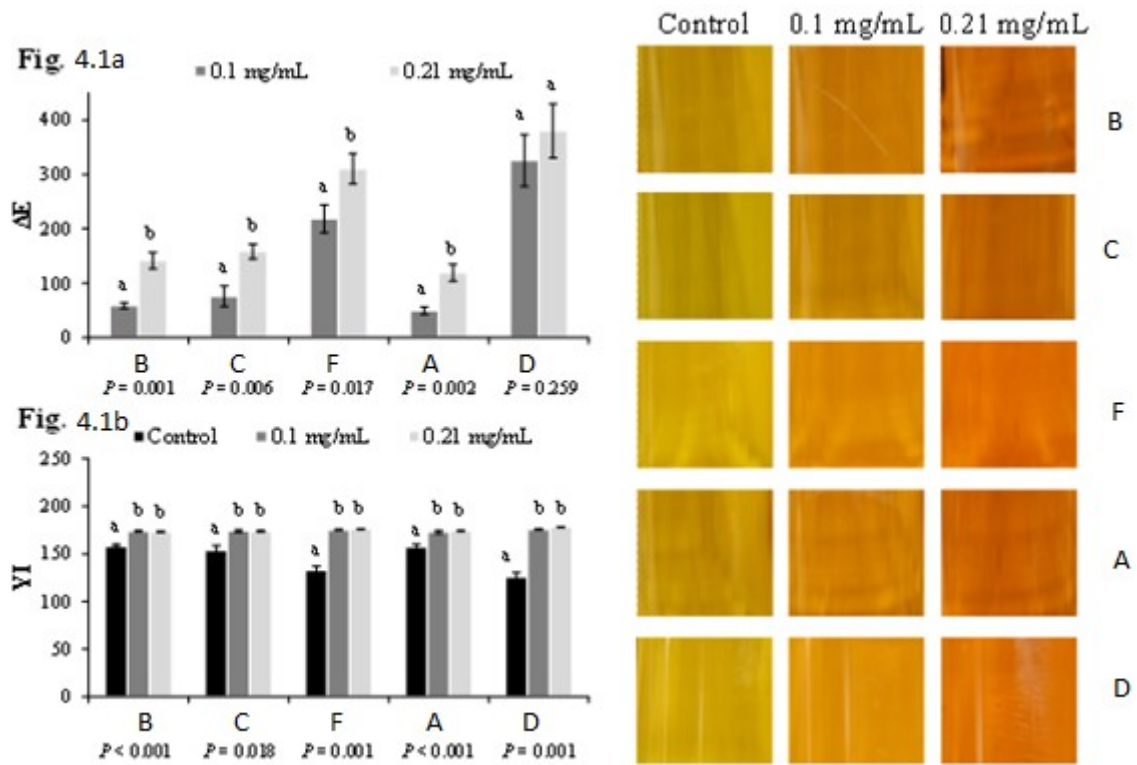


Figura 4.1

Diferencias de color (ΔE^*_{ab}) (Fig. 4.1a) y el índice de amarilleamiento (YI) (Fig. 4.1b) entre AOVE's con y sin adición de extracto de *S. almeriensis*. En cada uno de los AOVE's los valores difieren significativamente ($P < 0,05$).

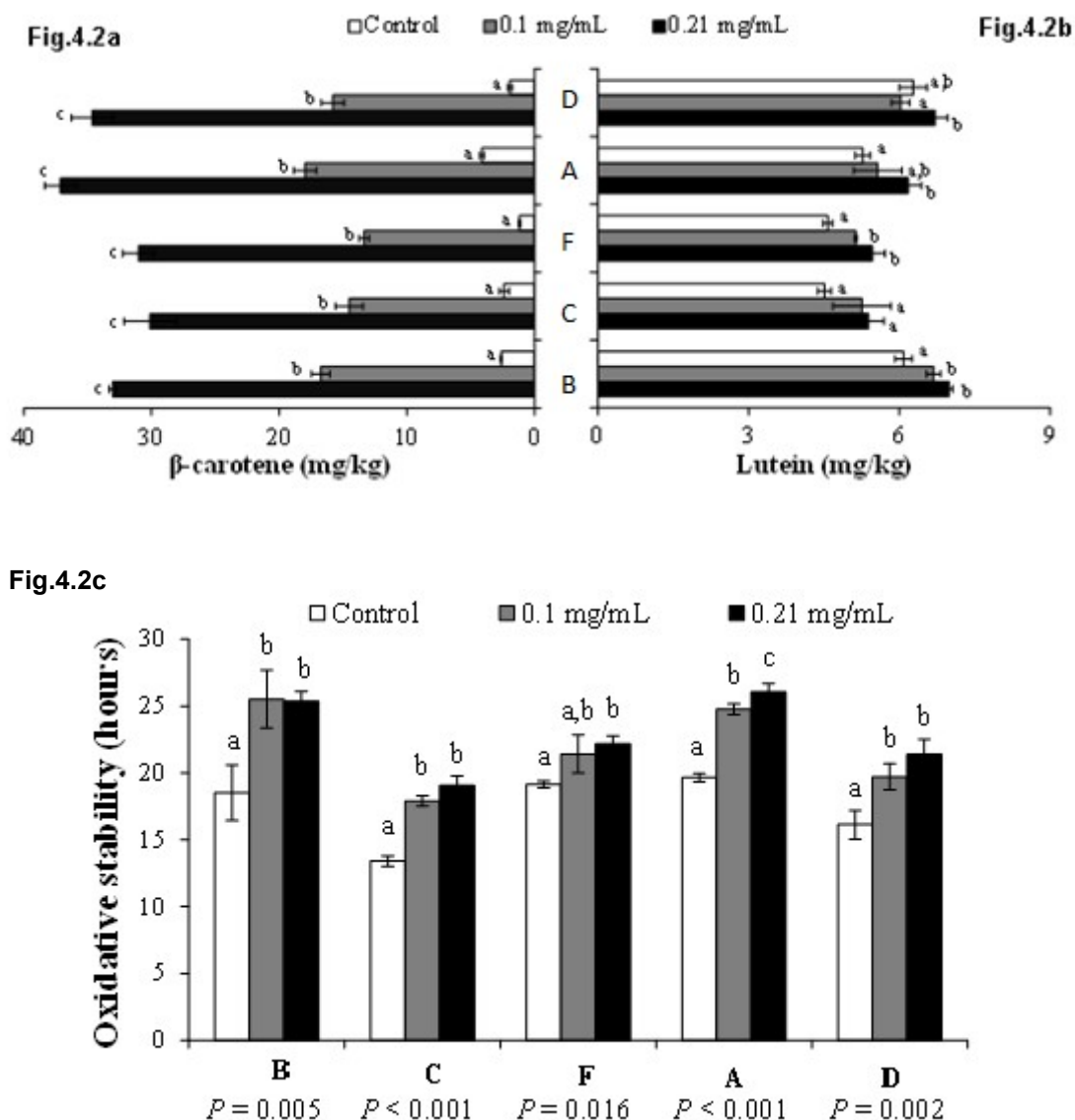


Figura 4.2

Contenido en β -caroteno (mg/kg; Fig. 4.2a), luteína (mg/kg; Fig. 4.2b) y estabilidad oxidativa (horas; Figura 4.2c) de AOVE's sin (I) y con extracto de *S. almeriensis* (II = 0,1 mg/ml; III = 0,21 mg/ml). En cada uno de los AOVE's los valores difieren significativamente ($P < 0,05$).

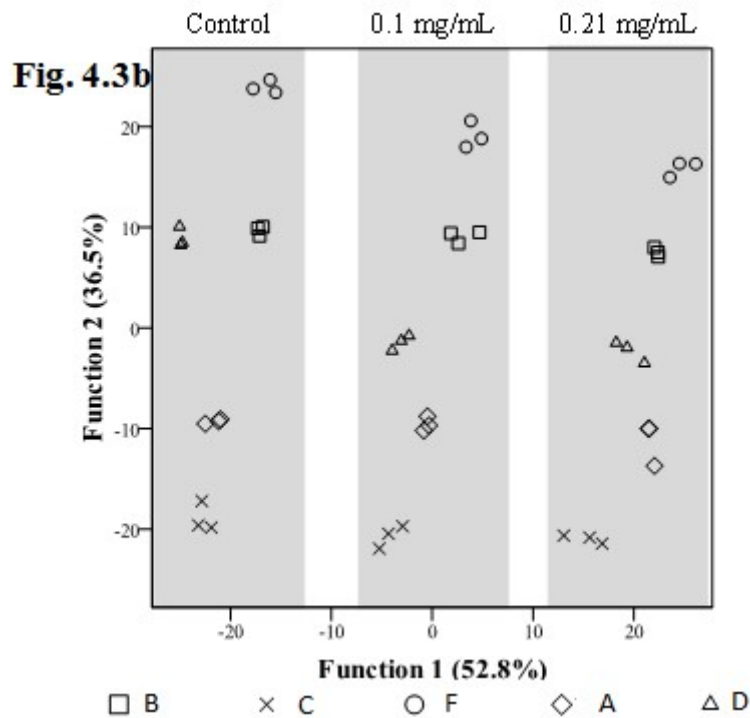
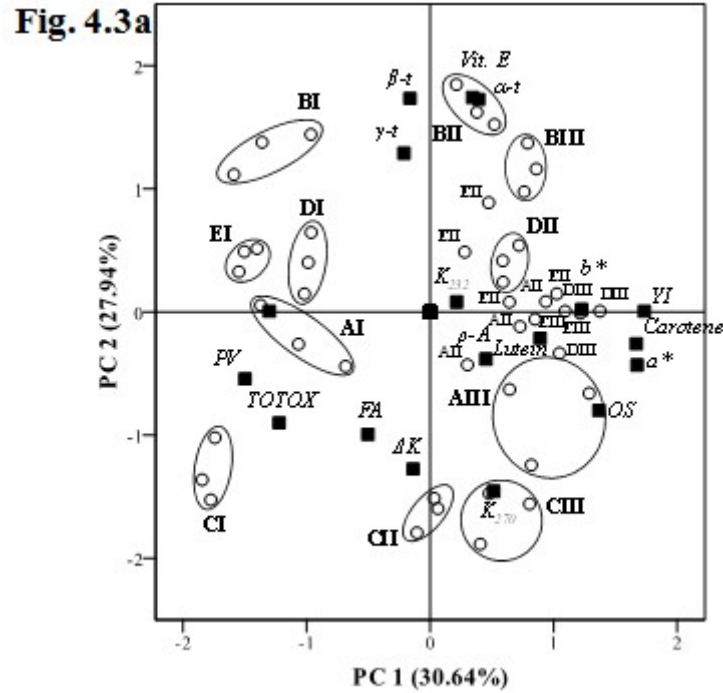


Figura 4.3

Análisis de los componentes principales (PCA -Figura 4.3a) y análisis discriminante lineal (LDA -Figura 4.3b) de los AOVE's sin (I) y con enriquecimiento de extracto de *S. almeriensis* (II = 0,1 mg/ml; III = 0,21 mg/ml) (p -AV - valor de p -anisidina; OS - estabilidad oxidativa). Los factores del PCA y las funciones discriminantes explican el 58,58% y 89,3% de la varianza total, respectivamente.

Tabla 4.1

Parámetros de calidad (FA - acidez libre; PV - índice de peróxidos), valor de *p*-anisidina (*p*-AV), índice de TOTOX, y parámetros de color (*a** *b** y *L**) de los AOVE's sin (I) y con extracto de *S. almeriensis* (II = 0,1 mg/ml; III = 0,21 mg/ml).

Olive oil	Color parameters			Quality parameters						
	<i>a</i> *	<i>b</i> *	<i>L</i> *	FA (%)	PV (mEq. O ₂ /kg)	<i>K</i> ₂₃₂	<i>K</i> ₂₇₀	ΔK	<i>p</i> -AV	TOTOX
B										
I	-11.77±0.29 a	81.95±0.81 a	73.95±0.52 c	0.3±0.04 a	9±1 b	0.86±0.15 a	0.15±0.02 a	-0.003±0.002 a	17±1 a	35±2 a
II	-2.33±0.42 b	86.01±1.32 b	70.70±0.85 b	0.3±0.05 a	6±1 a	0.83±0.09 a	0.15±0.01 a	-0.003±0.001 a	16±0 a	28±3 a
III	3.92±0.51 c	82.65±0.96 a	68.24±0.61 a	0.3±0.04 a	7±2 a	0.94±0.12 a	0.19±0.03 b	-0.001±0.002 a	16±1 a	30±4 a
C										
I	-12.77±0.27 a	81.41±1.46 a	75.60±1.01 c	0.2±0.00a	9±1 b	0.94±0.17 a	0.13±0.02 a	-0.002±0.005 a	12±0 a	30±2 b
II	-3.08±0.45 b	86.39±2.23 c	70.96±1.38 b	0.2±0.00 a	6±1 a	0.86±0.18 a	0.12±0.01 a	-0.005±0.002 a	13±1 a	24±2 a
III	3.35±0.36 c	83.89±1.49 b	69.01±0.89 a	0.2±0.00 a	6±0 a	1.17±0.55 a	0.16±0.01 b	-0.003±0.004 a	13±1 a	25±1 a
F										
I	-13.13±0.76 a	73.24±2.39 a	78.53±0.85 c	0.3±0.00 a	9±0 a	0.84±0.07 a	0.18±0.02 a	-0.001±0.003 a	13±1 a	32±0 b
II	-1.28±1.10 b	89.40±1.56 b	72.93±1.01 b	0.3±0.00 a	8±0 a	0.88±0.03 a,b	0.21±0.02 a,b	-0.007±0.008 a	14±1 a	31±0 b
III	5.42±1.09 c	88.15±0.56 c	71.58±0.34 a	0.3±0.00 a	8±1 a	0.92±0.04 b	0.24±0.03 b	-0.003±0.002 a	13±1 a	30±1 a
A										
I	-11.77±0.37 a	82.34±1.08 a	74.85±0.82 c	0.2±0.00 a	9±0 b	0.82±0.05 a	0.13±0.01 a	-0.003±0.001 a	15±1 a	33±1 b
II	-3.48±0.21 b	85.87±2.02 b	70.96±1.01 b	0.2±0.00 a	6±1 a	0.84±0.04 a	0.15±0.02 a,b	-0.004±0.002 a	16±1 a	27±2 a
III	2.36±0.46 c	85.17±1.23 c	69.87±0.76 a	0.2±0.04 a	6±1 a	0.81±0.05 a	0.16±0.01 b	-0.002±0.001 a	16±1 a	28±1 a
D										
I	-14.15±0.04 a	71.48±2.12 a	81.34±0.61 c	0.3±0.00 a	8±1 b	1.00±0.07 a	0.13±0.02 a	-0.003±0.001 a	14±1 a	29±1 a
II	-5.38±0.20 b	95.20±0.38 c	77.49±0.26 b	0.3±0.05 a	5±1 a	0.93±0.08 a	0.13±0.02 a	-0.009±0.017 a	14±1 a	24±2 b
III	0.85±0.83 c	93.58±0.81 b	75.13±0.58 a	0.3±0.00 a	5±1 a	1.01±0.03 a	0.16±0.01 b	-0.002±0.002 a	14±1 a	24±1 b



Tabla 4.2

Composición detallada de ácidos grasos expresada en (g/100 g de ácidos grasos) de los AOVE's sin (I) y con extracto de *S. almeriensis* (II = 0,1 mg/ml; III = 0,21 mg/ml).

Olive oil	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{17:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{20:0}	C _{18:3}	C _{20:1}	C _{22:0}	SFA	MUFA	PUFA	Trans
B														
I	11.76±0.45a	0.79±0.06a	0.10±0.02a	2.87±0.26a	78.09±0.84a	3.46±0.44a	0.37±0.02a	0.57±0.03a	0.24±0.01a	0.09±0.02a	15.24±0.56a	79.22±0.85a	4.02±0.41a	0.04±0.01a
II	11.35±0.44a	0.77±0.01a	0.10±0.00a	2.60±0.23a	79.32±0.61a	3.18±0.04a	0.35±0.01a	0.58±0.00a	0.22±0.00a	0.11±0.00a	14.52±0.66a	80.42±0.61a	3.76±0.05a	0.02±0.00a
III	11.07±0.37a	0.80±0.01a	0.10±0.00a	2.74±0.06a	79.21±0.36a	3.30±0.01a	0.35±0.01a	0.60±0.00a	0.22±0.00a	0.11±0.01a	14.40±0.45a	80.34±0.36a	3.9±0.01a	0.02±0.01a
C														
I	11.43±0.64a	1.33±0.03a	0.11±0.00a	2.41±0.32a	77.67±0.66a	3.58±0.12a	0.36±0.01a	0.77±0.02a	0.25±0.01a	0.12±0.02a	14.45±0.95a	79.35±0.69b	4.35±0.13a	0.04±0.01b
II	12.01±0.27a,b	1.36±0.06a	0.10±0.00a	2.29±0.17a	77.33±0.14a	3.73±0.04a	0.37±0.01a	0.81±0.01b	0.25±0.00a	0.11±0.02a	14.92±0.13a,b	79.04±0.08a,b	4.54±0.04a	0.01±0.00a,b
III	13.00±0.78b	1.34±0.03a	0.11±0.01a	2.71±0.16a	76.22±0.71a	3.73±0.08a	0.36±0.01a	0.80±0.01a,b	0.25±0.00a	0.10±0.00a	16.30±0.65b	77.91±0.69a	4.53±0.08a	0.03±0.01a
F														
I	10.85±0.56a	0.88±0.02a	0.10±0.01a	2.99±0.17a	78.77±0.58a	3.56±0.08a	0.34±0.01a	0.63±0.05a	0.22±0.02a	0.11±0.02a	14.42±0.72a	79.96±0.58a	4.19±0.10a	0.05±0.02a
II	11.22±0.34a	0.93±0.09a	0.13±0.04a	2.86±0.18a	78.69±0.25a	3.66±0.05a,b	0.38±0.04a	0.60±0.03a	0.27±0.06a	0.11±0.01a	14.73±0.53a	80.02±0.14a	4.26±0.03a,b	0.04±0.01a
III	11.35±0.11a	0.90±0.04a	0.10±0.00a	2.94±0.05a	78.73±0.09a	3.73±0.03b	0.35±0.01a	0.63±0.01a	0.23±0.00a	0.10±0.00a	14.86±0.05a	79.96±0.12a	4.36±0.04b	0.04±0.01a
A														
I	13.36±0.74a	1.17±0.02a	0.11±0.03a	2.28±0.10a	77.09±1.01a	2.94±0.05a	0.33±0.02a	0.65±0.02a	0.24±0.02a	0.10±0.01a	16.19±0.78a	78.61±1.03a	3.59±0.07a	0.05±0.03a
II	13.14±0.52a	1.16±0.01a	0.10±0.00a	2.32±0.10a	77.33±0.24a	3.07±0.11a	0.35±0.03a	0.69±0.01a,b	0.24±0.00a	0.11±0.01a	16.05±0.44a	78.84±0.24a	3.77±0.11a	0.02±0.01a
III	12.18±0.71a	1.17±0.04a	0.10±0.00a	2.27±0.13a	78.29±0.74a	3.31±0.05a	0.34±0.01a	0.74±0.03b	0.24±0.01a	0.10±0.01a	15.02±0.68a	79.82±0.77a	4.05±0.08b	0.04±0.02a
D														
I	12.17±0.64a	1.18±0.40a	0.08±0.03a	3.16±0.26a	76.94±0.76a	3.85±0.20a	0.36±0.01a	0.63±0.03a	0.22±0.03a	0.11±0.01a	15.94±0.88a	78.41±0.42a	4.48±0.23a	0.04±0.03a
II	11.92±0.87a,b	0.94±0.01a	0.09±0.00a	2.98±0.03a	77.19±0.74a	4.03±0.06a	0.37±0.01a	0.67±0.01a	0.24±0.01a	0.11±0.00a	15.52±0.86a	78.47±0.72a	4.70±0.07a	0.04±0.02a
III	13.55±0.26b	0.96±0.05a	0.09±0.01a	3.02±0.14a	76.04±0.39a	3.98±0.06a	0.35±0.02a	0.67±0.02a	0.23±0.01a	0.10±0.01a	17.15±0.42a	77.32±0.41a	4.65±0.08a	0.03±0.01a



Tabla 4.3

Composición de tocoferoles expresada en (mg/kg de aceite de oliva) de AOVE's sin (I) y con extracto de *S. almeriensis* (II = 0,1 mg/ml; III = 0,21 mg/ml).

Olive Oil	α - Tocopherol	β - Tocopherol	γ - Tocopherol	Total tocopherols
B				
I	257±6.1 a	4.9±0.1 a	50±0.9 b	312±6.8 a
II	273±1.2 b	4.7±0.2 a	50±0.1 b	328±1.8 b
III	261±4.4 a	4.5±0.1 a	46±0.4 a	311±4.6 a
C				
I	429±9.8 a	5.7±0.2 a	55±2.4 a	489±11.4 a
II	451±20.3 a	5.5±0.3 a	54±1.9 a	511±20.2 a
III	435±5.2 a	5.4±0.1 a	52±2.5 a	492±6.7 a
F				
I	119±21.4 a	4.1±0.1 a	44±3.5 a	159±24.7 a
II	121±19.9 a	4.1±0.0 a	42±2.8 a	168±22.6 a,b
III	137±20.6 a	4.2±0.1 a	42±3.3 a	183±24.0 b
A				
I	336±25.8 a	5.2±0.1 b	42±5.1 a	383±30.8 a
II	330±26.5 a	5.0±0.2a,b	40±5.0 a	376±31.5 a
III	334±31.7 a	4.7±0.2 a	39±4.3 a	378±35.6 a
D				
I	297±2.6 a	5.0±0.1 a	51±0.6 b	353±3.2 a
II	297±2.0 a	4.9±0.1 a	49±0.6a,b	351±2.6 a
III	307±11.7 a	4.8±0.1 a	49±1.4 a	360±13.2 a



5. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD DE ACEITES DE OLIVA VÍRGENES EXTRA ENRIQUECIDOS CON ANTIOXIDANTES

5.1.- INTRODUCCIÓN

Es bien conocido que los cambios de tipo químico que se producen en los aceites de oliva pueden deberse a diversos factores, entre los que cabe destacar la exposición a la luz, la temperatura y el transcurso del tiempo desde la obtención de los mismos. Estas alteraciones de los aceites con respecto a sus propiedades iniciales, se pueden monitorizar siguiendo el cambio del color de los mismos, ya que existe una estrecha relación entre los cambios químicos y la variación del color de la matriz (degradación de la misma).

En este sentido, seguir los cambios de color en los aceites es un método sencillo para evaluar la estabilidad de los mismos frente a las principales causas de su degradación. Así, en este capítulo se ha estudiado la degradación de distintos aceites frente a la exposición a luz ultravioleta (foto-estabilidad), frente al calentamiento (termo-estabilidad) y frente al transcurso del tiempo (estabilidad temporal). Además, se han realizado otros estudios específicos de estabilidad para AOVE's con distinto índice de maduración y en aceites procedentes de diferentes variedades de fruto. En las experiencias de influencia del índice de maduración del fruto sobre la estabilidad de los aceites, se usaron muestras de aceite procedentes de la misma almazara, con un mismo proceso de extracción, y lo único que varió fue la época de recolección de la aceituna (correspondiente a los meses de Octubre, Noviembre y Diciembre de 2013), siendo ésta de la variedad Picual. Para la experiencia de estudio de estabilidad en función de la variedad del fruto, de nuevo todas las muestras procedían de la misma almazara y se obtuvieron con el mismo proceso de extracción, produciéndose aceites de una misma época dentro de la campaña 2013-2014, pero con frutos de 4 variedades diferentes: Picual, Arbequina, Frantoio y Royal.

En todos estos estudios nuestro interés principal es comparar la degradación sufrida por AOVE's puros y enriquecidos con antioxidantes procedentes de la microalga *Scenedesmus almeriensis*, con el fin de saber si la adición de estos antioxidantes resulta también beneficiosa o no, desde el punto de vista de la estabilidad del producto.

5.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

Se ha utilizado el extracto de antioxidantes de concentración igual a 132 mg/ml, descrito en el capítulo 3 de esta Tesis Doctoral. Concretamente, para los estudios realizados de foto-estabilidad y termo-estabilidad se han elegido dos concentraciones de trabajo: 0,05 y 0,1 mg luteína/ml, con las que se aportarían al organismo 1,8 y 3,6 mg de luteína respectivamente, con 36 ml de ingesta de AOVE diaria. Estas cantidades de luteína, sumadas a las ingeridas con el resto de alimentos de la dieta mediterránea tradicional, permitirían alcanzar los valores recomendados para la prevención de las enfermedades asociadas a su déficit (3-6 mg/día).

Para las medidas de color se ha utilizado un espectrofotómetro Konica Minolta CM-5. En este instrumento el rango de longitud de onda es de 360-740 nm con pasos de 10 nm. La fuente de luz es una lámpara de xenón pulsada. La geometría de medida es d/8 (reflectancia) y d/0 (transmitancia). El diámetro de la esfera integradora es: 152 mm. El rango de temperatura de operación es de 13-33 °C y menos del 80% de humedad relativa, mientras que el rango de valores de temperatura/humedad para el correcto almacenamiento del instrumento es de 0-40 °C y menos del 80% de humedad relativa. El software utilizado ha sido SpectraMagic NX PRO USB, suministrado por el mismo fabricante del instrumento. En todas las medidas de color hemos supuesto iluminante CIE D65 y observador patrón CIE 1964.

En primer lugar, fue necesario calibrar el instrumento y, como las medidas se realizaron por transmitancia, siguiendo las normas del fabricante, se utilizó una placa negra y opaca (suministrada por el fabricante) para calibrar el cero, y agua destilada en el interior de una cubeta transparente de cuarzo con unas dimensiones de 4,2 x 3,2 x 1,0 cm (altura x anchura x paso de luz), para calibrar el blanco de referencia ($L^* = 100$). A continuación, se puede proceder ya a la medida de los parámetros de color de las muestras, proporcionando el equipo de forma inmediata los parámetros L^* , a^* y b^* , correspondientes a la muestra, además de la diferencia de color de dicha muestra con respecto al estándar empleado (ΔL^* , Δa^* , Δb^* , y ΔE^*_{ab}).

En cuanto a las medidas de estabilidad de los AOVE's enriquecidos con extracto de antioxidantes, éstas se han llevado a cabo utilizando las variaciones del color de dichos aceites comparados con los mismos sin aditivar, como control de partida. Para las medidas de foto-estabilidad se han sometido las muestras a exposición continua bajo la luz ultravioleta de una cabina de control y comparación de color CAC 60 Verivide



(Imagen 5.1). La distribución espectral de esta fuente de luz UV se muestra en la Figura 5.1, pudiendo observarse principalmente que tiene un pico en la longitud de onda 367,0 nm con un ancho de banda a mitad de pico de 16,9 nm. En el plano donde se sitúan las muestras la iluminancia es 4,01 lx, la irradiancia 0,311 W/m², y las coordenadas de cromaticidad (observador patrón CIE 1964) $x= 0,1907$, $y= 0,1608$. Las medidas de control se hicieron a intervalos temporales de entre 1 y 7 días, distribuidos a lo largo de un periodo de unos dos meses, y se realizaron siempre a temperatura ambiente (20 °C).



Imagen 5.1

Muestras de aceites irradiadas en la cabina de control de iluminación CAC 60 Verivide (izquierda) y detalle de la fuente de luz ultravioleta de dicha cabina (derecha).

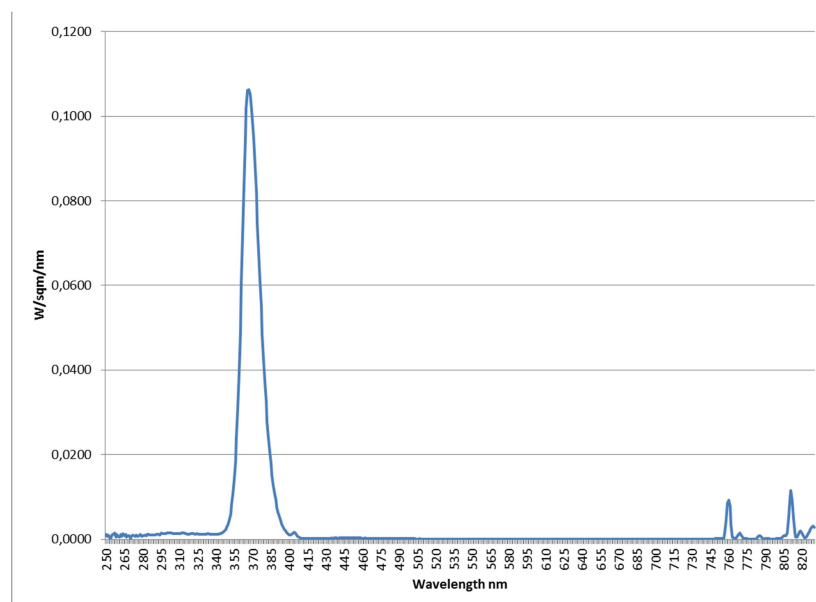


Figura 5.1

Distribución espectral de potencia de la fuente de luz ultravioleta de la cabina Verivide CAC 60.

En los estudios de foto-estabilidad, para alcanzar las concentraciones anteriormente mencionadas de 0,05 y 0,1 mg luteína/ml, se han pipeteado 311 y 636 µl de extracto y llevado a cubetas de 14 ml para las determinaciones de color en el espectrofotómetro (ver ecuaciones 3.1 y 3.2 de la sección 3.2.4, página 91).

Para el caso de las medidas de termo-estabilidad, las muestras se sumergieron en un termostato de precisión Julabo, dotado de líquido Thermal H5S para poder trabajar a temperaturas superiores a 100 °C (Imagen 5.2). Las medidas de color de las muestras se hicieron a intervalos de tiempo de entre 2 y 12 horas, aproximadamente, durante un periodo total de tiempo de 74 horas, estando las muestras sometidas a una temperatura constante de 120 °C.



Imagen 5.2

Muestras de AOVE's sometidas a 120 °C en un baño termostático (izquierda) y detalle del termostato (derecha).

En este caso, los tubos que albergan las muestras son de 17 ml de capacidad, por lo que ha sido necesario pipetear 0,377 y 0,772 ml de extracto para alcanzar las concentraciones de 0,05 y 0,1 mg de luteína/ml aceite, respectivamente.

$$\frac{x \text{ ml} \cdot 2,3 \frac{\text{mg luteína}}{\text{ml aceite}}}{(17+x) \text{ ml aceite}} = 0,05 \frac{\text{mg luteína}}{\text{ml aceite}}; \quad x = 0,377 \text{ ml} = 377 \mu\text{l extracto} \quad \text{Ecuación 5.1}$$

$$\frac{x \text{ ml} \cdot 2,3 \frac{\text{mg luteína}}{\text{ml aceite}}}{(17+x) \text{ ml aceite}} = 0,1 \frac{\text{mg luteína}}{\text{ml aceite}}; \quad x = 0,772 \text{ ml} = 772 \mu\text{l extracto} \quad \text{Ecuación 5.2}$$

Por último, las medidas de estabilidad temporal de los aceites se realizaron a lo largo de un periodo de 16 meses, durante el cual las muestras de aceite se mantuvieron en la oscuridad, en un lugar seco y a una temperatura de 20 °C.

5.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados que se muestran en este apartado corresponden al global de los experimentos realizados con todos los aceites y han sido elegidos a título de ejemplo. Además, para su mejor entendimiento, en el Anexo I (página 212) se muestran tanto las tablas como las gráficas de todos los aceites ensayados comparando entre ellos de forma individualizada y colectivamente.

5.3.1.- ESTABILIDAD EN FUNCIÓN DE LA RADIACIÓN INCIDENTE: FOTO-ESTABILIDAD

Es importante evaluar en los AOVE's el efecto producido por la exposición a la radiación electromagnética, puesto que conlleva cierta degradación de los mismos. Se han utilizado cinco AOVE's diferentes: cuatro de la variedad Picual, "B" (Santuario de Mágina), "C" (Oro Bailén), "D" (Oro de Génave) y "L" (Castillo de Canena Picual); y un quinto de la variedad Arbequina "M" (Castillo de Canena Arbequina) (Tabla 3.1, página 86). Se han ensayado dos concentraciones de luteína diferentes: 0,05 y 0,1 mg/ml. En todos los casos las medidas se realizaron a temperatura ambiente y las muestras estuvieron sometidas a exposición controlada continua a luz ultravioleta en la cabina de iluminación CAC 60 Verivide. El utilizar luz ultravioleta supone determinar la fotoestabilidad en las condiciones menos favorables, ya que del conjunto de radiaciones que inciden en los aceites procedentes del sol, ésta es la zona más energética y por tanto la más agresiva para las muestras.

En las Figuras 5.2, 5.3 y 5.4 se representa la diferencia de color CIELAB (ΔE^*_{ab}) respecto al color inicial (muestras no irradiadas), frente al tiempo de exposición a la luz ultravioleta, considerando AOVE's sin antioxidantes y enriquecidos con las dos concentraciones de extracto de antioxidantes antes indicadas.

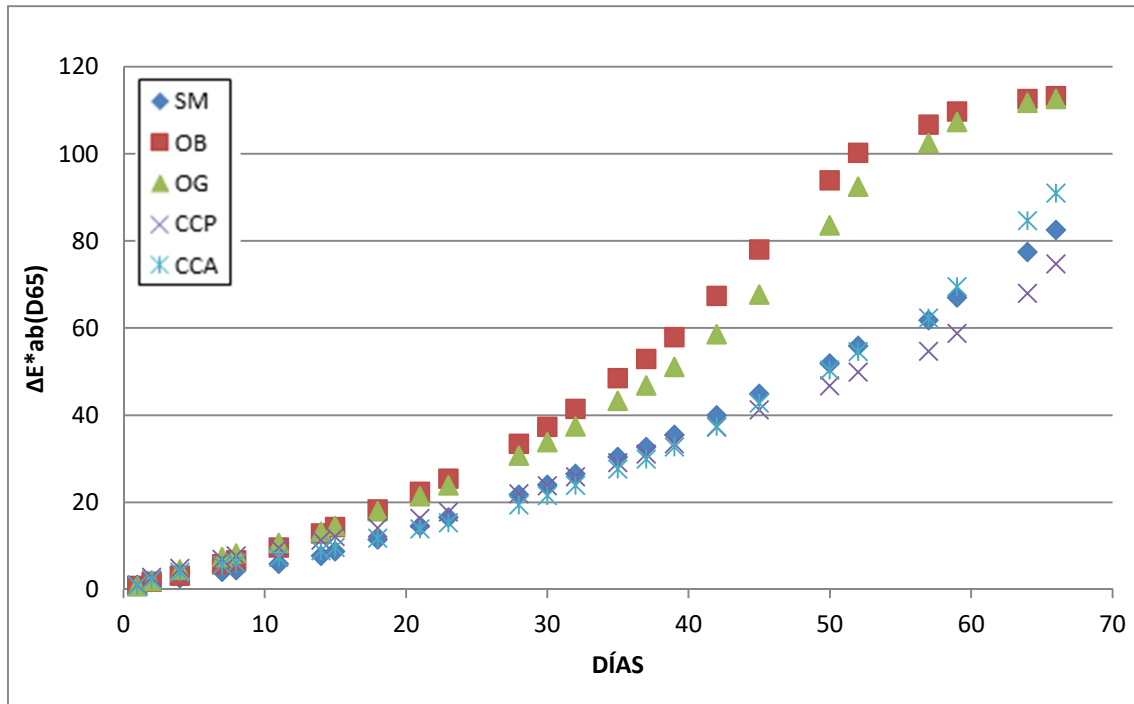


Figura 5.2

Diferencias de color CIELAB producidas en AOVE's sin enriquecer, como consecuencia de exposición continua a luz ultravioleta.

La Figura 5.2 muestra la evolución en la degradación de los diferentes AOVE's sin enriquecer con extracto de antioxidantes. Puede apreciarse que la muestra que más se degrada por exposición a la luz ultravioleta es la correspondiente al aceite "C" (Oro Bailén), mientras que las que menos degradación sufren son las muestras correspondientes a los aceites "L" y "M" (Castillo de Canena variedad Picual y Castillo de Canena variedad Arbequina). Por tomar un valor de referencia, observamos en la Figura 5.2 que, transcurridos dos meses, los aceites "C" (Oro Bailén) y "D" (Oro de Génave), que son los que más se degradan, experimentan una variación respecto al color inicial cercana a 100 unidades CIELAB, habiendo pasado a ser prácticamente incoloros. Para ese mismo periodo, los otros 3 aceites experimentan un cambio de color en torno a 60 unidades CIELAB, que es también un valor muy elevado.

Las Figuras 5.3 y 5.4 muestran la variación del color con la irradiación UV para los AOVE's anteriores enriquecidos con extracto de antioxidantes de concentraciones 0,05 y 0,1 mg luteína/ml, respectivamente. Puede apreciarse como inicialmente (primer mes) los aceites aguantan muy bien la exposición a luz ultravioleta, y que es a partir del segundo mes cuando comienzan a degradarse fuertemente los aceites con la menor concentración de antioxidante (0,05 mg luteína/ml). Se observa que al enriquecer con 0,1 mg luteína/ml (Figura 5.4), las muestras de los 3 aceites ("B", "C" y "D") son muy estables e incluso

transcurridos casi dos meses de continua irradiación la degradación sufrida no llega a superar las 20 unidades CIELAB.

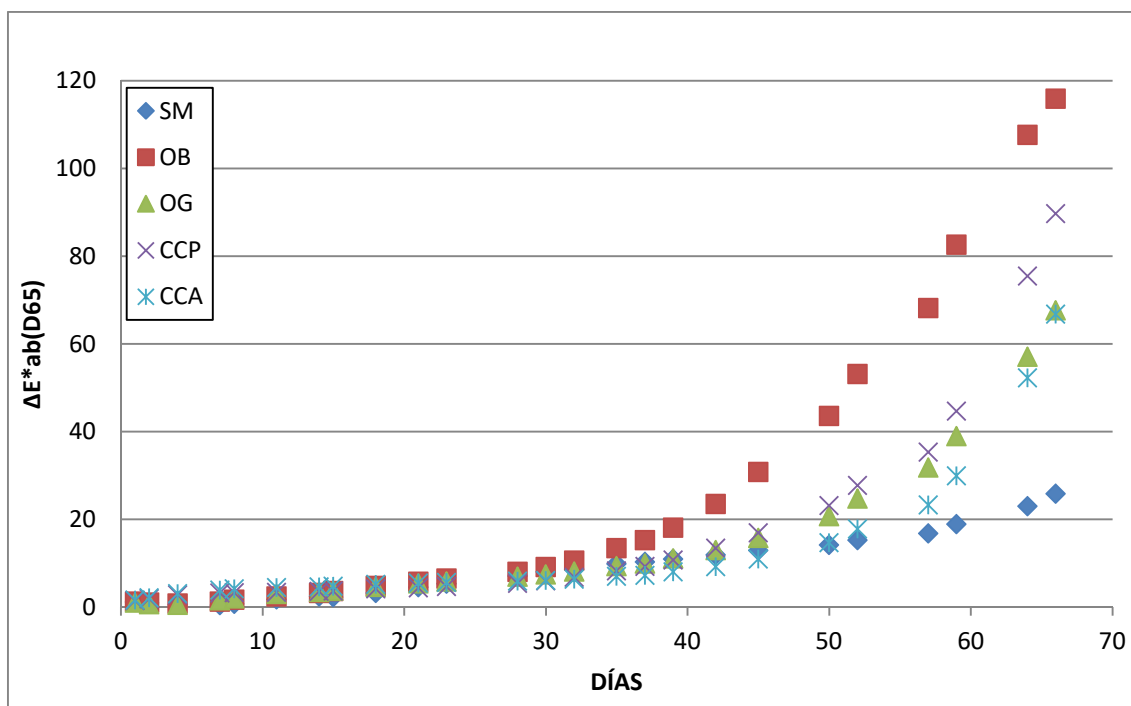


Figura 5.3

Diferencias de color CIELAB producidas en AOVE's enriquecidos con extracto de antioxidantes de concentración 0,05 mg luteína/ml, como consecuencia de exposición continua a luz ultravioleta.

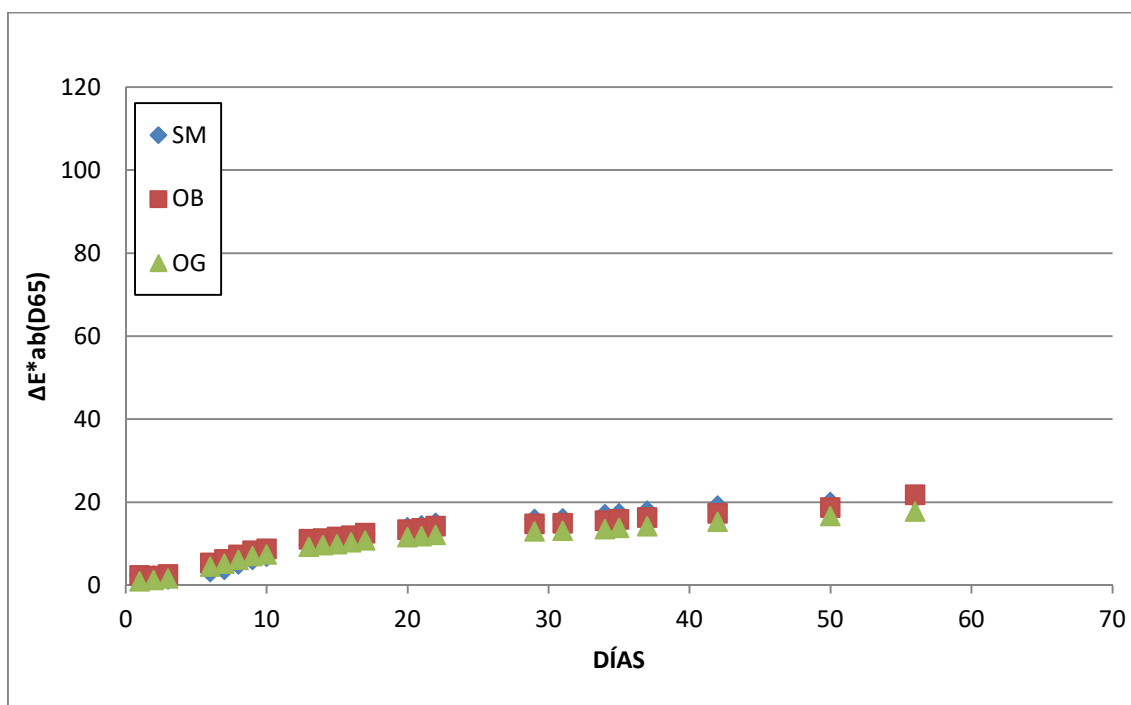


Figura 5.4

Diferencias de color CIELAB producidas en AOVE's enriquecidos con extracto de antioxidantes de concentración 0,1 mg luteína/ml, como consecuencia de exposición continua a luz ultravioleta.

Para facilitar la comparación, las Figuras 5.5 y 5.6 muestran la foto-estabilidad de los aceites "B" y "C" enriquecidos con antioxidante de concentración 0,05 mg luteína/ml. Se puede apreciar claramente como el aceite "B", aguanta mejor (tanto en la muestra control como en la muestra enriquecida) la exposición a luz ultravioleta. Pero especialmente hay que destacar que la adición del extracto de antioxidantes mejora mucho la foto-estabilidad de los aceites durante el primer mes de irradiación con luz ultravioleta.

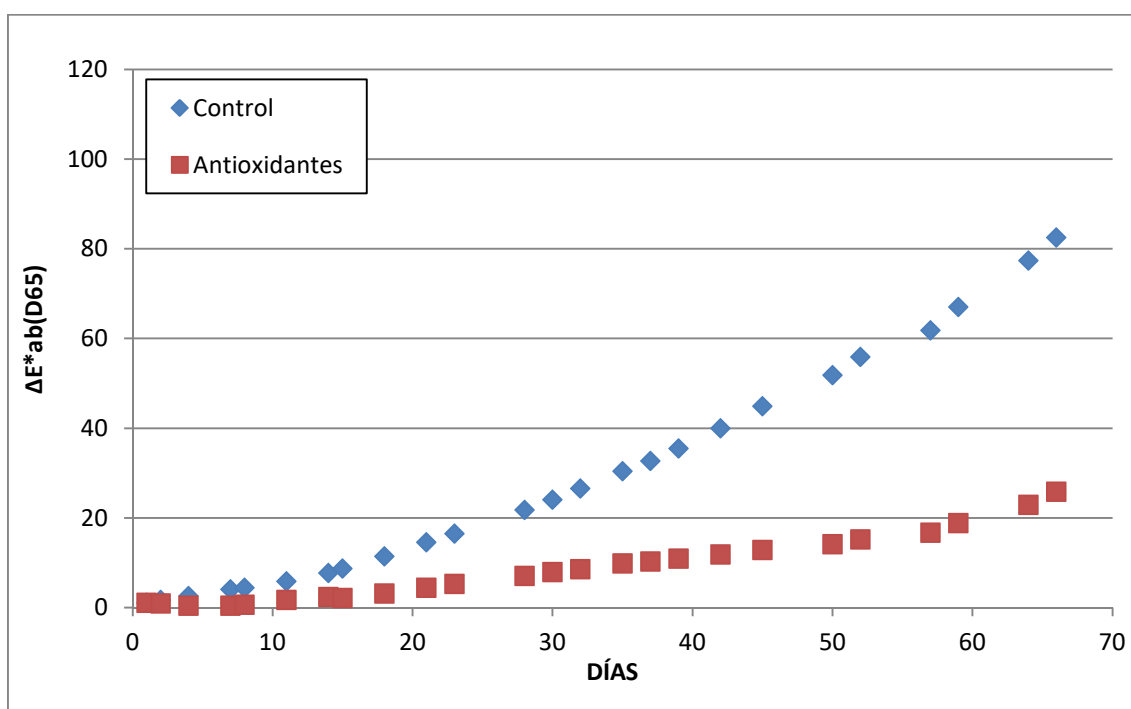


Figura 5.5

Foto-estabilidad del AOVE "B" (Santuario de Mágina) bajo condiciones de iluminación controlada con lámpara ultravioleta. Consideramos el AOVE puro o sin enriquecer (control) y el enriquecido con extracto de antioxidantes de concentración 0,05 mg/ml.

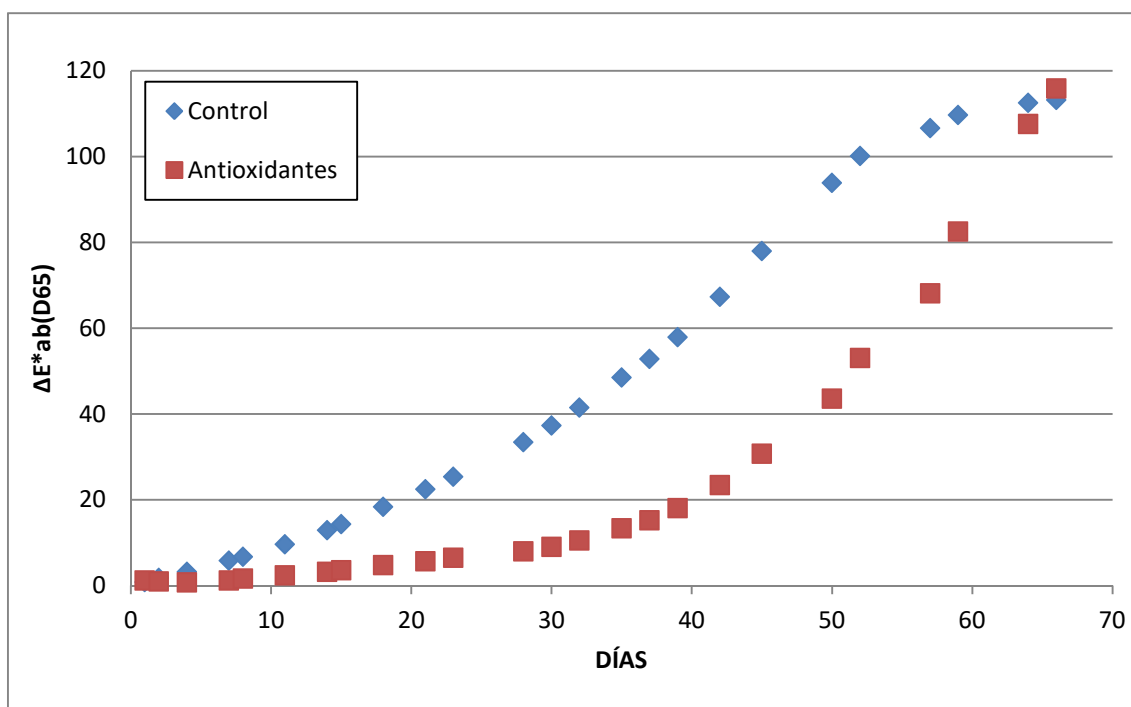


Figura 5.6

Foto-estabilidad del AOVE "C" (Oro Bailén) bajo condiciones de iluminación controlada con lámpara ultravioleta. Consideramos el AOVE puro o sin enriquecer (control) y el enriquecido con extracto de antioxidantes de concentración 0,05 mg/ml.

En todos los casos ensayados, los AOVE's enriquecidos son más estables y aguantan mejor la degradación producida por exposición a la radiación ultravioleta. El AOVE puro que más se degrada es "C" (Oro Bailén), llegando a experimentar un cambio de color superior a las 100 unidades CIELAB tras dos meses de exposición continua a luz ultravioleta. Sin embargo, en todos los casos, los AOVE's enriquecidos en luteína hasta una concentración de 0,1 mg/ml, muestran variaciones de color que apenas superaron las 20 unidades CIELAB. En definitiva, podemos concluir que los AOVE's enriquecidos se encuentran más protegidos que los controles (AOVE's sin aditivar) y aguantan mejor la degradación causada por exposición a luz ultravioleta.

El resto de resultados y gráficas correspondientes a los demás aceites ensayados se muestran en el Anexo I (apartado 9.1.1, páginas 212-223).

5.3.2.- ESTABILIDAD EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA: TERMO-ESTABILIDAD

Otra propiedad importante de los AOVE's, que merece ser estudiada, es el comportamiento de los mismos frente a la temperatura. Es bien conocido que la temperatura produce degradación en los AOVE's y por ello se ha procedido a estudiar este hecho y cómo influye en el mismo la adición de nuestro antioxidante. Así, se han sometido los AOVE's a una temperatura constante de 120 °C y se ha ido midiendo su color periódicamente durante un intervalo de tiempo de 74 horas. Se han utilizado los mismos AOVE's que en el apartado anterior de foto-estabilidad y también se han ensayado las dos mismas concentraciones de antioxidantes antes indicadas (0,05 y 0,1 mg de luteína por ml de aceite).

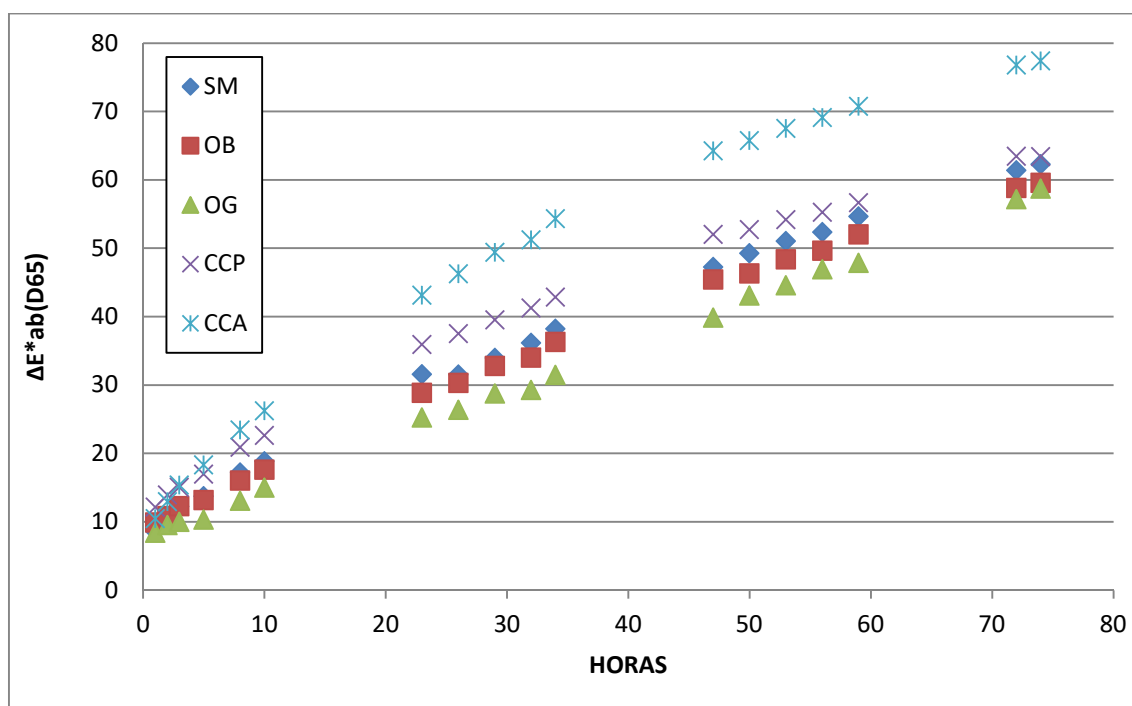


Figura 5.7
Diferencias de color CIELAB de los AOVE's sin enriquecer en función del tiempo de calentamiento a 120 °C.

La Figura 5.7 muestra la variación de color de los diferentes AOVE's sin enriquecer, y en ella puede observarse como el más estable es el aceite "D" (Oro de Génave), mientras que el que más se degrada es el aceite "M" (Castillo de Canena variedad Arbequina). Análogamente, las Figuras 5.8 y 5.9 muestran la evolución del color para las muestras enriquecidas con 0,05 y 0,1 mg luteína/ml, respectivamente.

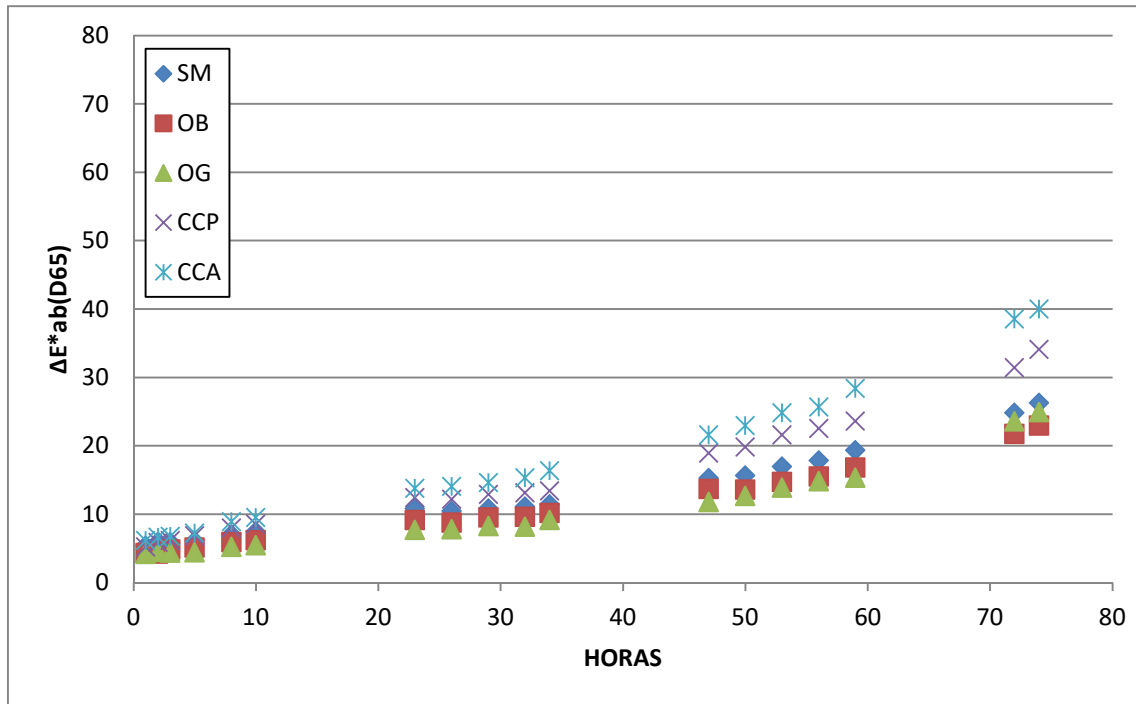


Figura 5.8

Diferencias de color CIELAB de los 5 AOVE's enriquecidos con extracto de antioxidantes (0,05 mg luteína/ml), en función del tiempo de calentamiento a 120 °C.

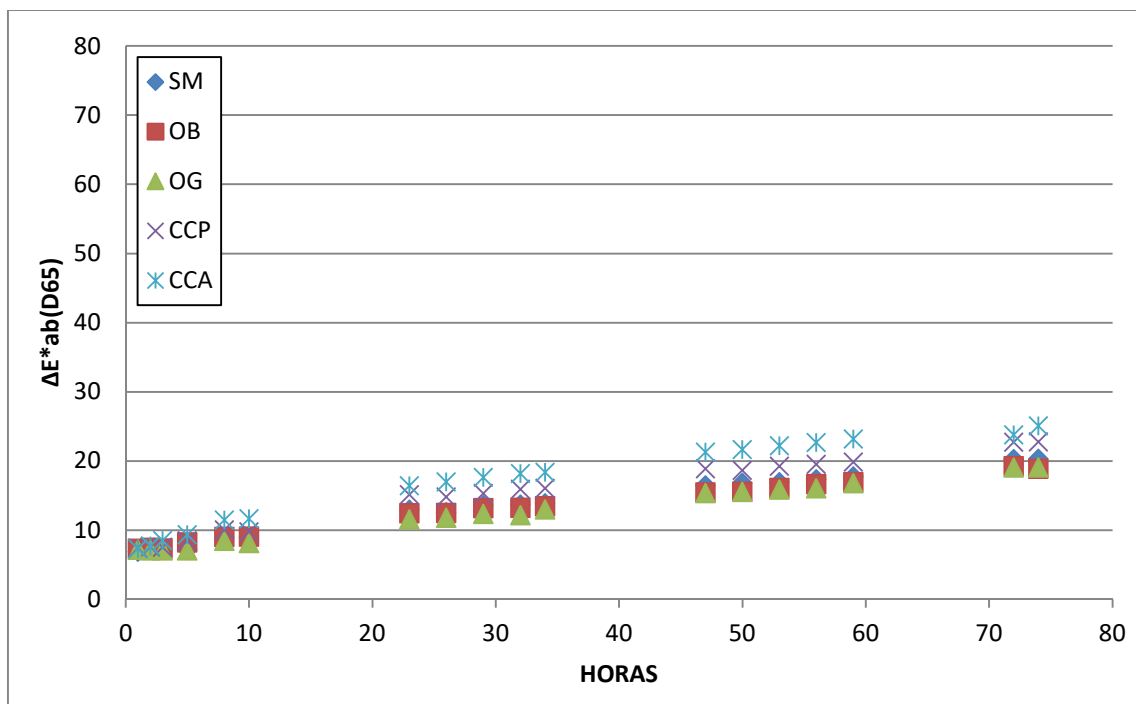


Figura 5.9

Diferencias de color CIELAB de los 5 AOVE's enriquecidos con extracto de antioxidantes (0,1 mg luteína/ml), en función del tiempo de calentamiento a 120 °C.

Observando, por ejemplo, el aceite "L" (Castillo de Canena variedad Picual), la Figura 5.10 muestra el efecto de las dos concentraciones ensayadas para dicho aceite. Aunque 0,1 mg luteína/ml de aceite es una concentración que "protege" algo más, el valor de cambio de color después de 60 horas de calentamiento a 120 °C no es muy diferente (18 frente a 23 unidades CIELAB), pero sí que hay una diferencia de color muy grande respecto al valor de más de 55 unidades CIELAB obtenido para el aceite sin enriquecer.

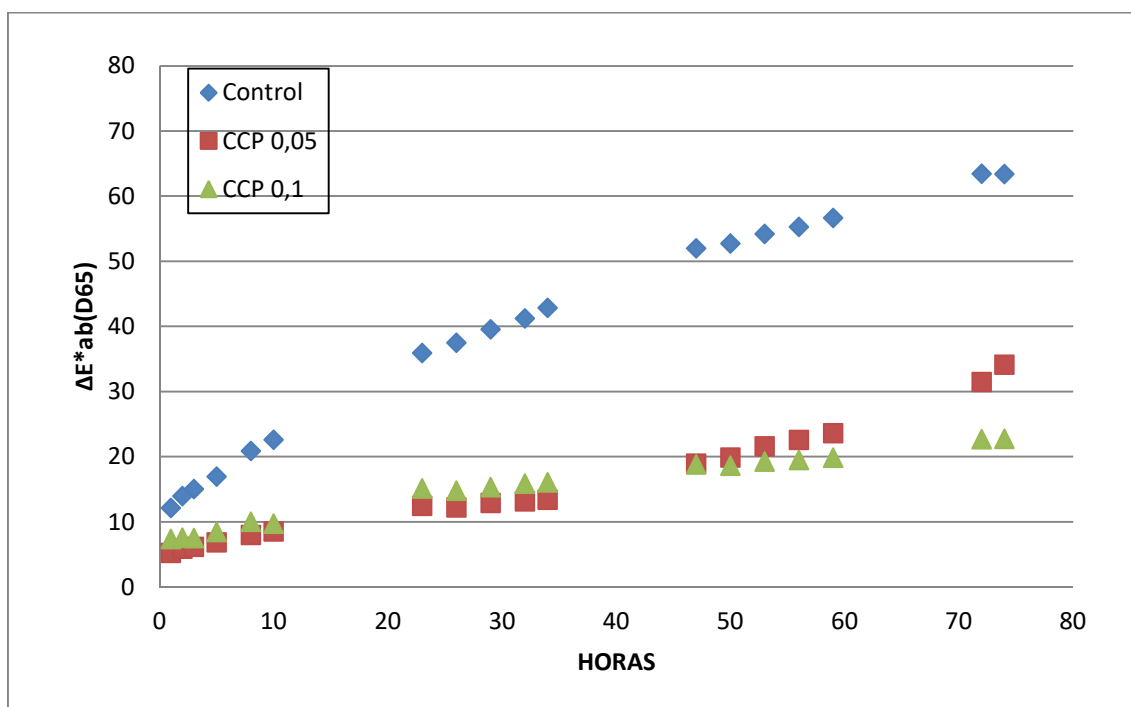


Figura 5.10

Diferencias de color CIELAB en el AOVE "L" sin enriquecer (control) y enriquecido con extracto de antioxidantes de concentraciones 0,05 mg luteína/ml y 0,1 mg luteína/ml, en función del tiempo de calentamiento a 120 °C.

Los resultados muestran cómo el aceite no enriquecido con antioxidantes se degrada térmicamente mucho más rápido que el mismo aceite enriquecido. Así, los aceites control, tras sometimiento a 120 °C durante 74 horas, sufren unas diferencias de color en el rango de 55-75 unidades CIELAB, mientras que en los aceites enriquecidos bajo las mismas condiciones de ensayo las diferencias de color están entre 18-40 unidades CIELAB para 0,05 mg/ml y entre 14-22 unidades CIELAB para 0,1 mg/ml. Estos resultados vuelven a demostrar el efecto protector, en este caso frente a la exposición a temperaturas elevadas, que tiene la presencia de extracto de antioxidantes añadido al aceite.

El resto de resultados y gráficas correspondientes a los demás aceites ensayados se muestran en el Anexo I (apartado 9.1.2, páginas 224-237).

5.3.3.- ESTABILIDAD EN FUNCIÓN DEL TIEMPO: CONSUMO PREFERENTE

Otra propiedad muy deseable en los AOVE's es el mantenimiento de sus propiedades físico-químicas el mayor tiempo posible. Es conocido que, para los aceites cosechados en una determinada campaña, se recomienda que se consuman en el año posterior a su cosechado, ya que si se supera este periodo de tiempo, las propiedades esenciales de los aceites podrían verse alteradas. En este sentido, se ha estudiado la estabilidad de cinco AOVE's diferentes, sin enriquecer y enriquecidos con extracto de antioxidantes (0,05 mg luteína/ml aceite), analizando la influencia del paso del tiempo sobre su color. Concretamente, se han realizado medidas de color a temperatura ambiente (20 °C), manteniendo los AOVE's almacenados en la oscuridad y en ambiente seco, durante un periodo de 16 meses. A modo de ejemplo, las Figuras 5.11 y 5.12 muestran los resultados obtenidos para los 5 AOVE's ensayados (Tabla 3.1, página 86).

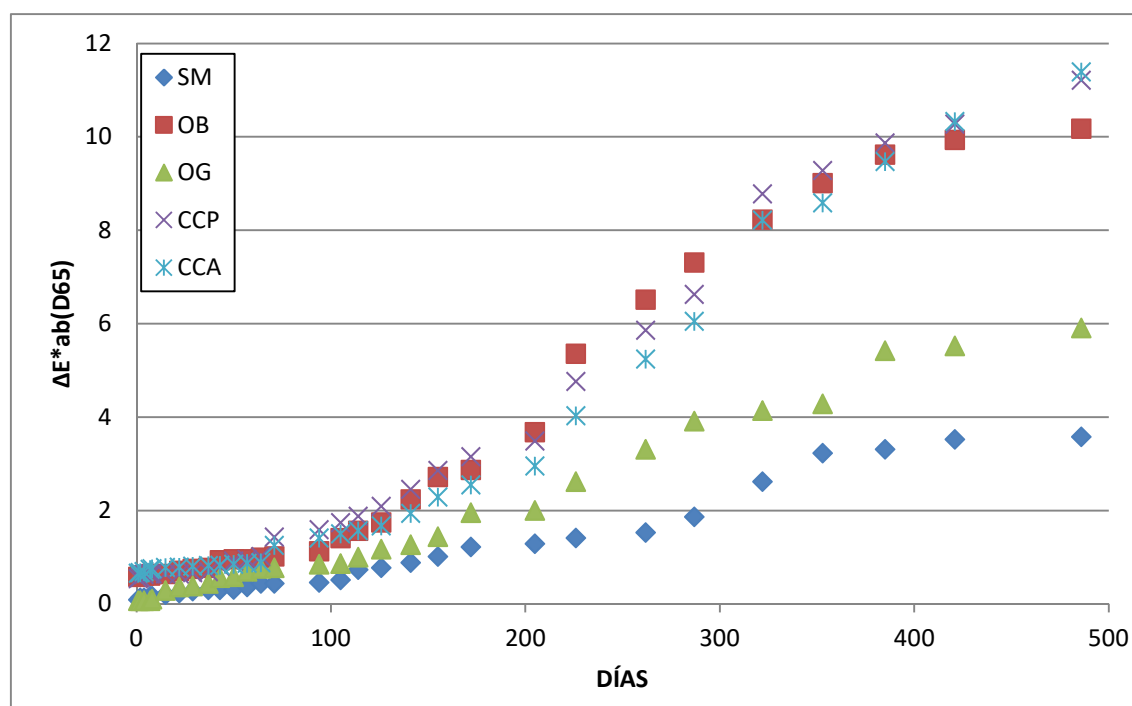


Figura 5.11

Estabilidad temporal de 5 AOVE's bajo condiciones de almacenamiento seco, en oscuridad y a temperatura ambiente (20 °C). Estos datos corresponden a los aceites sin enriquecer.

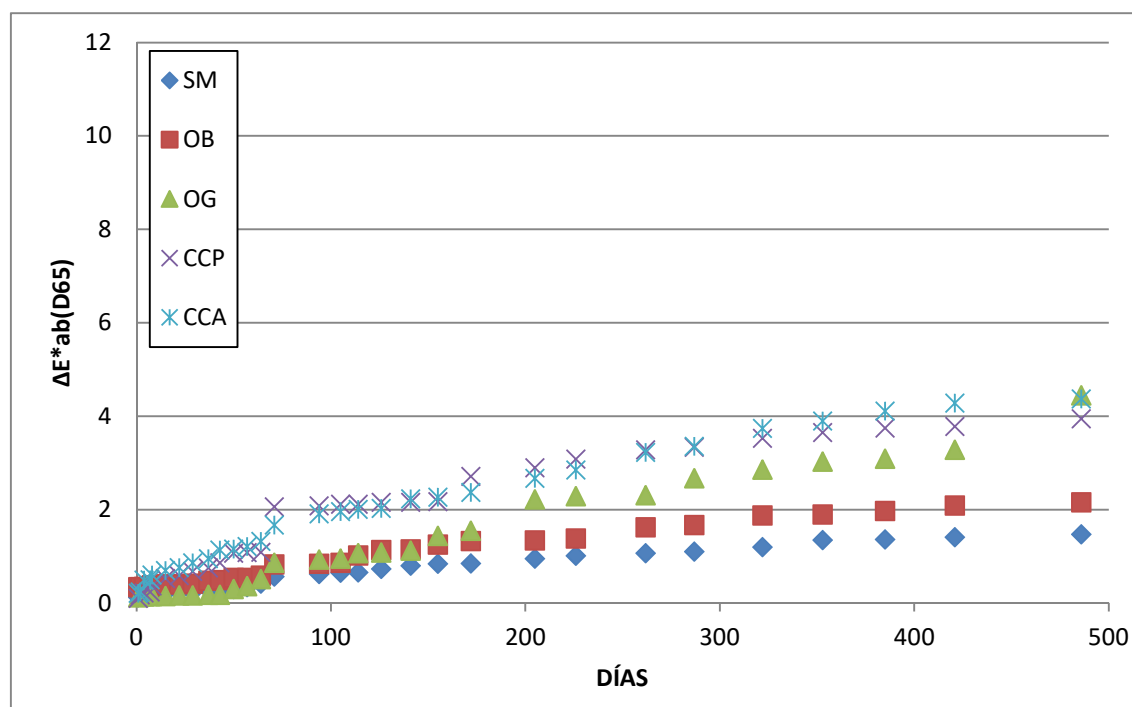


Figura 5.12

Estabilidad temporal de 5 AOVE's bajo condiciones de almacenamiento seco, en oscuridad y a temperatura ambiente (20 °C). Estos datos corresponden a los aceites enriquecidos con 0,05 mg luteína/ml aceite.

Las Figuras 5.11 y 5.12 muestran que, aunque para ambas muestras, control y enriquecida, las variaciones de color son relativamente pequeñas, los valores obtenidos para los aceites enriquecidos son siempre menores que los obtenidos para los aceites sin enriquecer, lo cual vuelve a mostrar el efecto protector frente a la degradación, en este caso temporal, de las muestras enriquecidas mediante nuestro extracto de antioxidantes.

El resto de resultados y gráficas correspondientes a los demás aceites ensayados se muestran en el Anexo I (apartado 9.1.3, páginas 238-244).

5.3.4.- ESTUDIOS ESPECÍFICOS DE ESTABILIDAD

En este apartado, se ha prestado atención a la posible influencia que puede tener sobre la estabilidad (foto-estabilidad y termo-estabilidad) de los aceites el enriquecimiento realizado con el extracto de antioxidantes, considerando: 1) aceites que proceden de una misma variedad de fruto pero con distinto grado de madurez (secciones 5.3.4.1 y 5.3.4.3); y 2) aceites procedentes de frutos de distintas variedades (secciones 5.3.4.2 y 5.3.4.4).

5.3.4.1.- Foto-estabilidad en función del índice de maduración del fruto

En esta experiencia, se han usado aceites que proceden del mismo tipo de aceituna (Picual) y en los que el proceso de elaboración ha sido exactamente el mismo, con la única diferencia de que se han utilizados aceitunas con diferente índice de madurez, es decir recogidas en 3 meses distintos (Octubre, Noviembre y Diciembre del año 2013). La Figuras 5.13 y 5.14 muestran la foto-estabilidad de las tres muestras de aceite tipo "L" (Castillo de Canena Picual) obtenidas a partir de frutos con diferente mes de recolección, sometidas a la exposición de luz ultravioleta en cabina de control de iluminación, considerando aceites sin enriquecer y enriquecidos con concentración de 0,05 mg luteína/ml aceite, respectivamente.

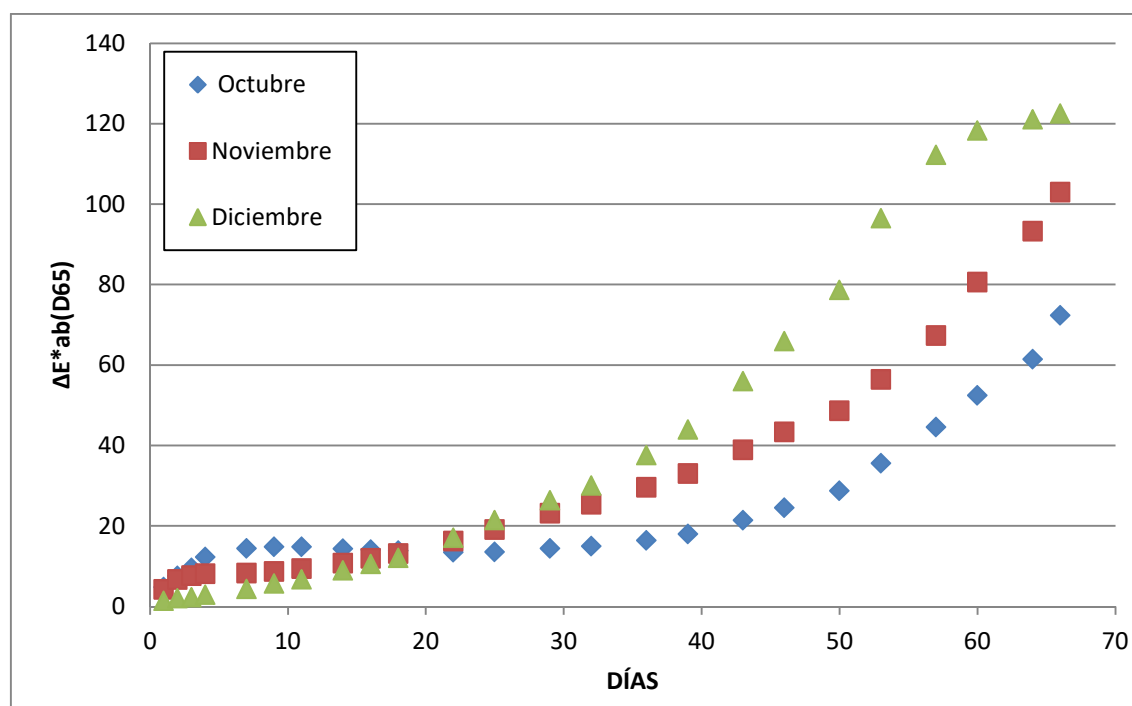


Figura 5.13

Foto-estabilidad de los AOVE's Castillo de Canena variedad Picual, procedentes de frutos con 3 grados distintos de maduración. Estos resultados corresponden a los aceites sin enriquecer.

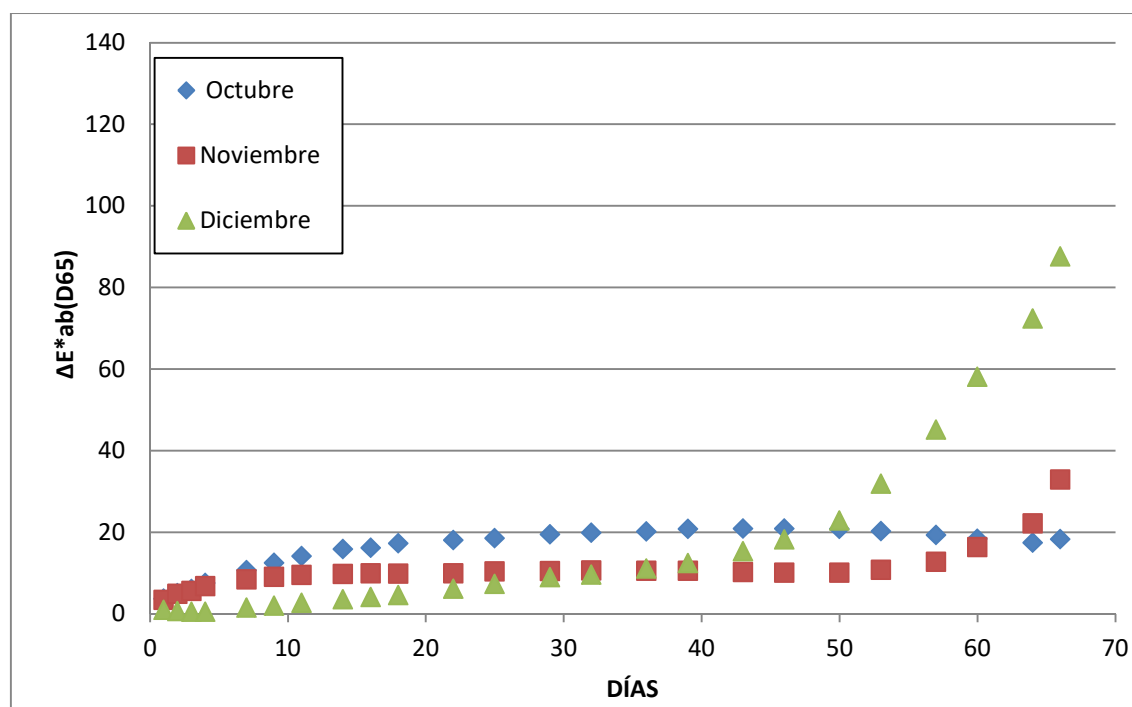


Figura 5.14

Foto-estabilidad de los AOVE's Castillo de Canena variedad Picual, procedentes de frutos con 3 grados distintos de maduración, y enriquecidos con extracto de antioxidantes (0,05 mg luteína/ml aceite).

Los resultados obtenidos muestran que, para el aceite sin enriquecer (Figura 5.13), inicialmente es más estable el correspondiente al mes de Diciembre que el correspondiente al de Octubre, pero a partir de unos 20 días de irradiación la tendencia es la contraria. Para los aceites enriquecidos en luteína (Figura 5.14), puede verse claramente que son muchos más estables que los aceites sin enriquecer, como ya se indicó en la sección 5.3.1, y además se observa de nuevo que inicialmente son un poco más estables los aceites de Diciembre que los de Octubre, revirtiendo esta tendencia sólo tras unos 50 días de irradiación.

Estos resultados mostrados utilizando diferentes gráficas comparando los diferentes meses se muestran en el Anexo I (apartado 9.2.1, páginas 245-248).

5.3.4.2.- Foto-estabilidad en función de la variedad del fruto

Análogamente, se ha procedido a estudiar la influencia que puede tener el enriquecimiento en extracto de antioxidantes, para el caso de aceites que proceden de diferentes tipos de aceituna, y en los que el resto de variables de procesado se han mantenido exactamente iguales. Concretamente, se han utilizado aceites procedentes de cuatro variedades de fruto: Picual, Arbequina, Frantoio y Royal.

La Figuras 5.15 y 5.16 muestran la foto-estabilidad de las cuatro variedades de aceite sin enriquecer y enriquecidos con concentración 0,05 mg luteína/ml aceite, respectivamente.

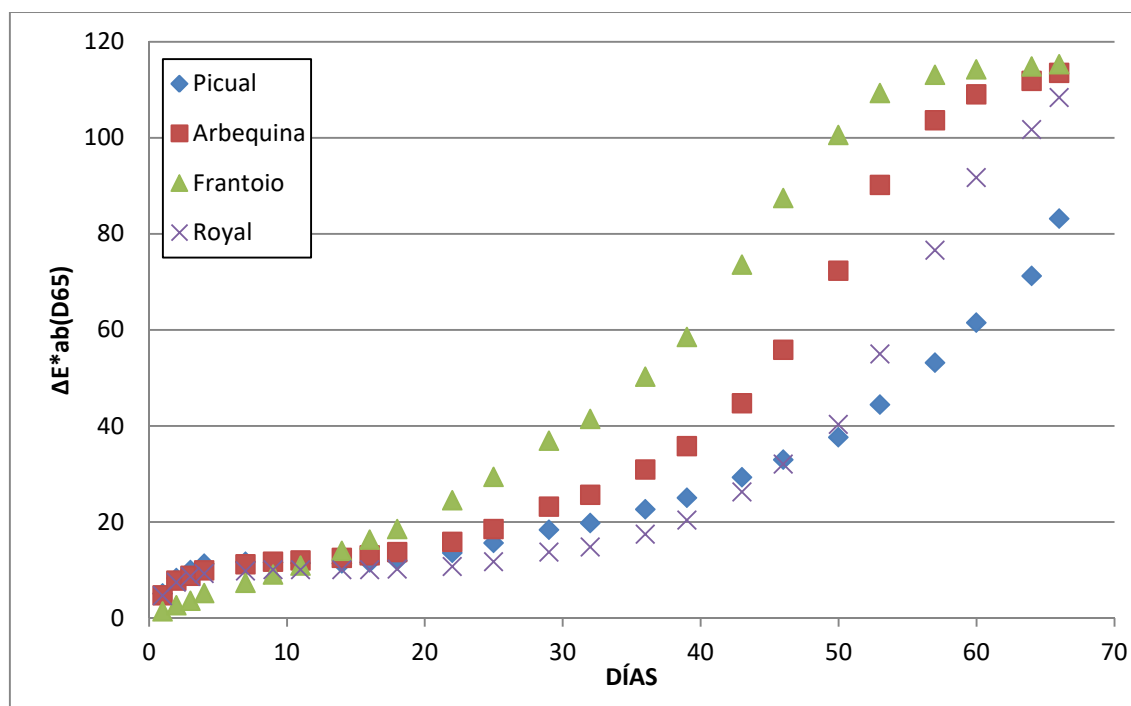


Figura 5.15

Foto-estabilidad de los AOVE's procedentes de frutos de 4 variedades diferentes. Estos resultados corresponden a los aceites sin enriquecer.

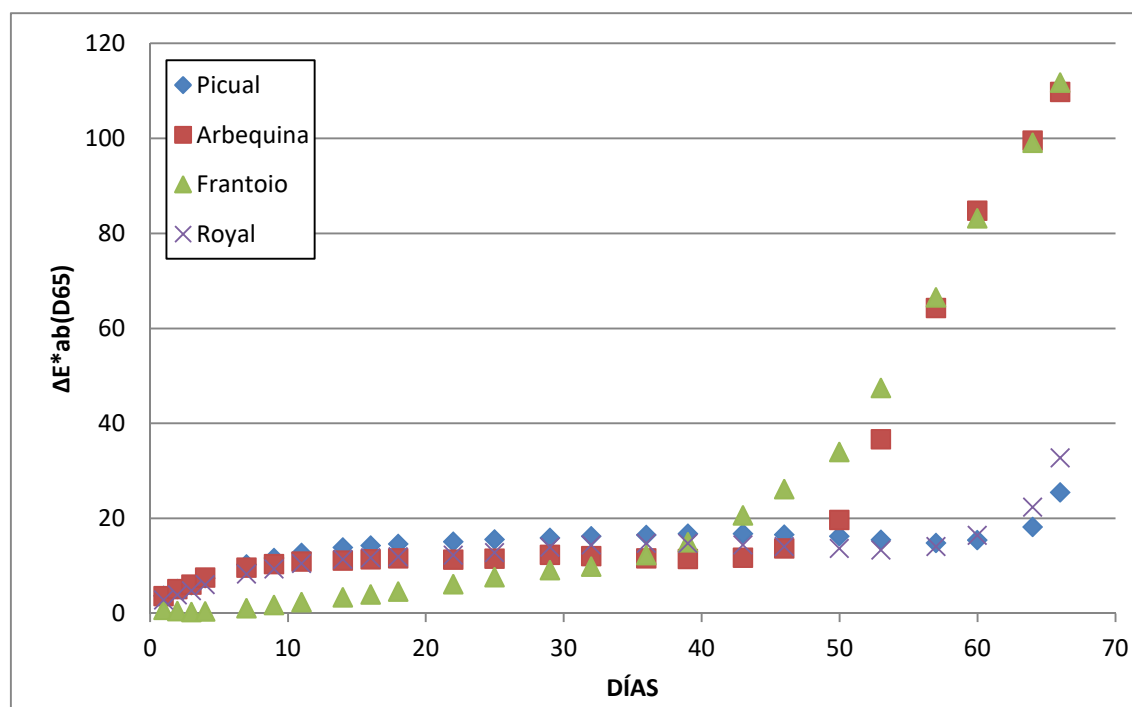


Figura 5.16

Foto-estabilidad de los AOVE's procedentes de frutos de 4 variedades diferentes, enriquecidos con extracto de antioxidantes (0,05 mg luteína/ml aceite).

Las gráficas de estabilidad de los aceites sin enriquecer (Figura 5.15) muestran que a partir de unos 20 días de irradiación la variedad Frantoio es la menos estable, seguida por las variedades Arbequina, Royal y Picual (en ese orden). Durante los primeros 20 días de irradiación la estabilidad de las variedades Royal, Arbequina y Picual es muy similar, observándose para la variedad Frantoio una óptima estabilidad durante los 10 días iniciales de irradiación, aproximadamente.

Por su parte, la Figura 5.16 muestra el comportamiento de los AOVE's enriquecidos con extracto de antioxidantes hasta alcanzar una concentración de 0,05 mg luteína/ml aceite, observándose un incremento en la estabilidad muy apreciable respecto de los mismos aceites sin enriquecer, como ya se indicó en la sección 5.3.1. Además, se observa que durante los primeros 40 días de irradiación hay una notable estabilidad (valores inferiores a 20 unidades CIELAB) para todas las variedades, especialmente para la Frantoio, si bien esta tendencia cambia notablemente para dos de las variedades (Arbequina y Frantoio) para irradiaciones más duraderas.

Estos resultados mostrados utilizando diferentes gráficas comparando las diferentes variedades de fruto se muestran en el Anexo I (apartado 9.2.2, páginas 249-254).

5.3.4.3.- Termo-estabilidad en función del índice de maduración del fruto

Para realizar este estudio se ha elegido un AOVE de la variedad Picual y denominación de origen Castillo de Canena. Se usaron tres remesas de muestras de aceite procedentes de los meses de Octubre, Noviembre y Diciembre del año 2013, en las que el proceso de elaboración ha sido el mismo y por tanto la única variable que hace diferentes a los AOVE's es el índice de madurez de la aceituna utilizada.

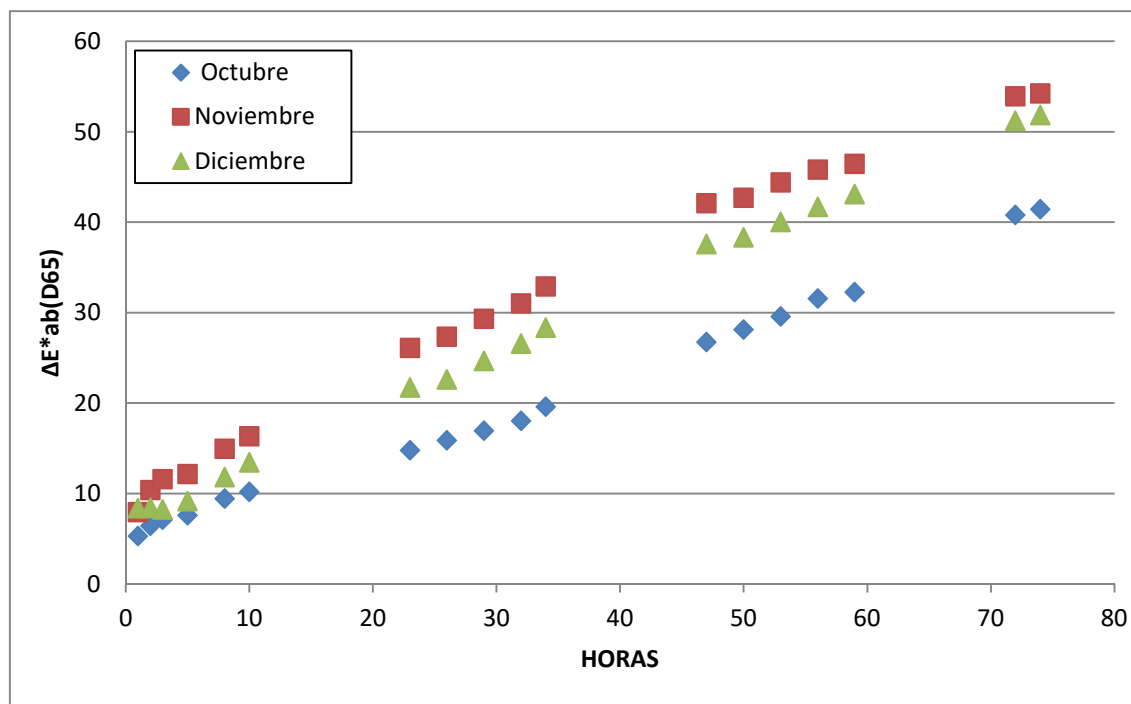


Figura 5.17

Termo-estabilidad de los AOVE's Castillo de Canena variedad Picual, procedentes de frutos con 3 grados distintos de maduración. Estos resultados corresponden a los aceites sin enriquecer.

En la Figura 5.17 se muestra la evolución de la estabilidad en función del tiempo transcurrido para los aceites sin enriquecer sometidos a 120 °C en baño termostático. Puede apreciarse que, las muestras más estables corresponden a los aceites procedentes de aceituna cosechada en Octubre y por tanto con índice de madurez inferior. Llama la atención que los resultados de Noviembre no se encuentren entre los de Octubre y Diciembre. Transcurridos 3 días de exposición a la temperatura de 120 °C, este aceite del mes de Octubre sufre una variación de color de 40 unidades CIELAB frente a las 53 y 55 unidades CIELAB de los aceites de Diciembre y Noviembre respectivamente.

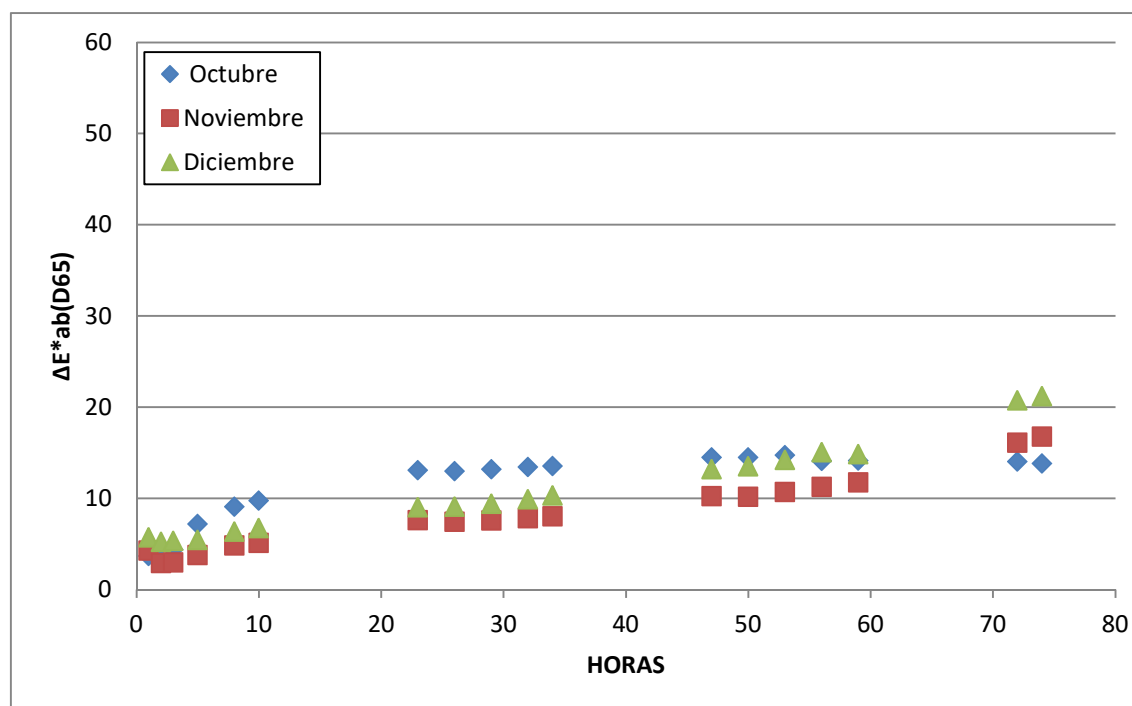


Figura 5.18

Termo-estabilidad de los AOVE's Castillo de Canena variedad Picual, procedentes de frutos con 3 grados distintos de maduración, y enriquecidos con extracto de antioxidantes (0,05 mg luteína/ml aceite).

La Figura 5.18 muestra la estabilidad de los mismos AOVE's enriquecidos con extracto de antioxidantes con 0,05 mg luteína/ml aceite. Puede apreciarse que transcurridas 72 horas de exposición térmica, las diferencias de color respecto del color inicial se encuentran entre 10 y 22 unidades CIELAB, valores muy inferiores a los de los aceites sin enriquecer. Se puede apreciar en la Figura 5.18 que la estabilidad es bastante similar e independiente del mes de recolección de la aceituna siendo diferente el índice de madurez de la misma, cosa que no sucede tanto en la Figura 5.17. Curiosamente se observa también en la Figura 5.18 que las muestras de Octubre suelen ser las de menor termo-estabilidad, al contrario de lo que sucede en la Figura 5.17.

Estos resultados mostrados utilizando diferentes gráficas comparando los diferentes meses se muestran en el Anexo I (apartado 9.2.3, páginas 255-258).

5.3.4.4.- Termo-estabilidad en función de la variedad del fruto

Se ha utilizado una temperatura en el baño termostático de 120 °C y los aceites se han ido midiendo a distintos tiempos transcurridos desde su preparación e inmersión en el baño. En este caso, los AOVE's utilizados han sido todos de la misma denominación, elaborados siguiendo el mismo proceso. La diferencia entre ellos es el tipo de fruto utilizado para la elaboración del aceite: Picual (aceite "L"), Arbequina (aceite "M"), Frantoio (aceite "N") y Royal (aceite "P") (Tabla 3.1, página 86).

Las Figuras 5.19 y 5.20 muestran los datos de estabilidad en función del tiempo transcurrido, para los aceites sin enriquecer y los enriquecidos con extractos de antioxidantes con 0,05 mg luteína/ml aceite. Observando la Figura 5.19 se puede apreciar que el aceite menos estable es el de la variedad Frantoio, mientras que las otras tres variedades tienen una estabilidad bastante similar. Lo mismo se observa en la Figura 5.20, si bien las diferencias de color son considerablemente menores que las de la Figura 5.19 (aceites sin enriquecer), como ya se había indicado previamente en la sección 5.3.2.

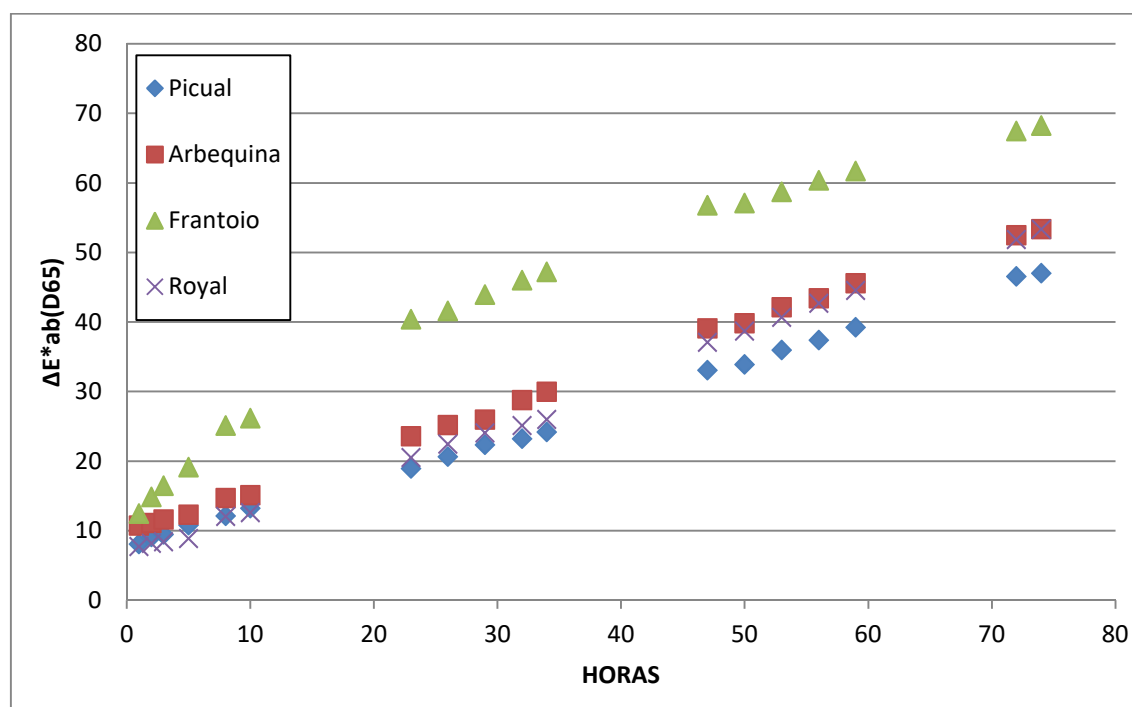


Figura 5.19

Termo-estabilidad de los AOVE's procedentes de frutos de 4 variedades diferentes. Estos resultados corresponden a los aceites sin enriquecer.

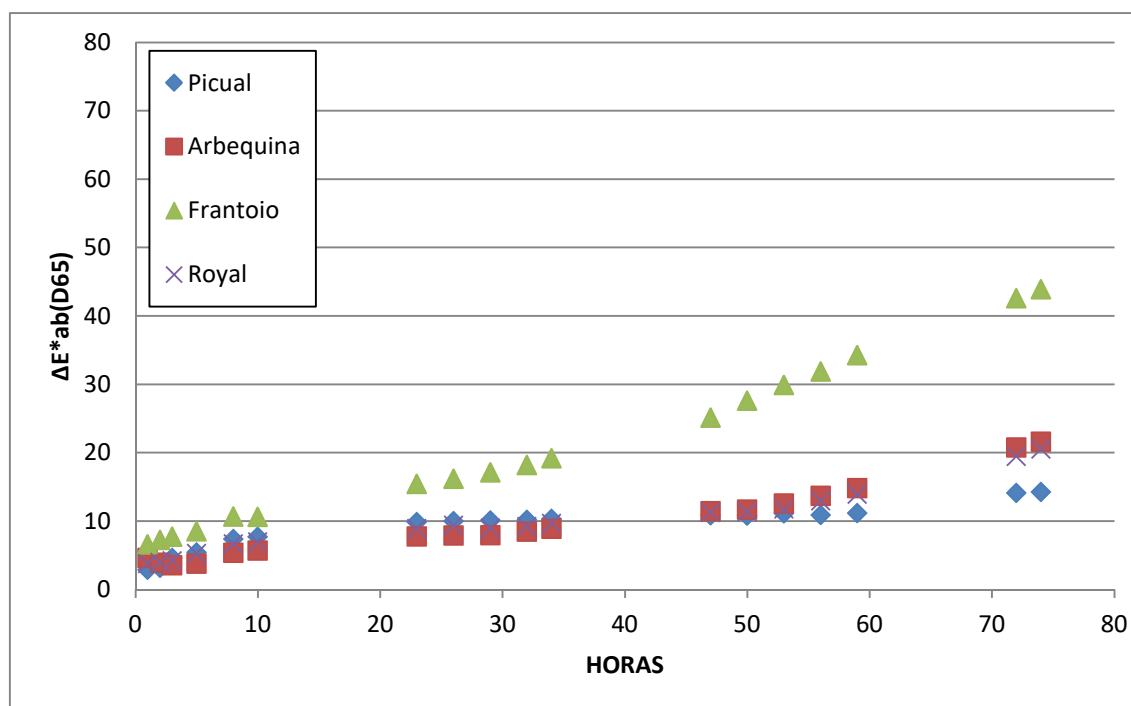


Figura 5.20

Termo-estabilidad de los AOVE's procedentes de frutos de 4 variedades diferentes, enriquecidos con extracto de antioxidantes (0,05 mg luteína/ml aceite).

Es importante resaltar que las variedades Picual, Arbequina y Royal son suficientemente estables en comparación con los aceites sin enriquecer, produciéndose diferencias de color CIELAB que al final del proceso de calentamiento son aproximadamente unas cuatro veces inferiores. Se puede decir, por tanto, que el enriquecimiento con extracto de antioxidantes produce un aumento de estabilidad muy notable, independientemente de la variedad del fruto empleado en la elaboración del aceite.

Estos resultados mostrados utilizando diferentes gráficas comparando las diferentes variedades de fruto se muestran en el Anexo I (apartado 9.2.4, páginas 259-263).

5.4.- CONCLUSIONES

Tras el análisis de tres de los puntos fundamentales que se relacionan con la degradación físico-química de un AOVE (estabilidad frente a la radiación ultravioleta, estabilidad frente a la temperatura y estabilidad frente al tiempo), así como de la estabilidad de AOVE's obtenidos con aceitunas de distinto índice de maduración y variedades de fruto, se llega a la conclusión de que la adición del extracto de antioxidantes procedente del alga *Scenedesmus almeriensis* a las matrices oleosas produce una mejora importante en su estabilidad. Es decir, la estabilidad de los AOVE's enriquecidos con extracto de antioxidantes es mejor que la de la matriz original sin aditivar.

Una vez analizada la estabilidad de los AOVE's enriquecidos con extracto de antioxidantes frente a la temperatura, se obtienen resultados que podrían ser muy beneficiosos, multiplicando la vida útil de los AOVE's en algunos casos. Además, una de las matrices más adecuadas para adicionar este extracto es el AOVE de la variedad "Picual", mientras que el de la variedad "Frantoio" ha mostrado una mayor degradación. A pesar de que aumenta la vida útil del aceite control frente a la temperatura, su degradación sigue siendo superior en relación a otros AOVE's.

Los resultados obtenidos son muy positivos, ya que la adición del extracto de antioxidantes a los AOVE's aumentaría la vida útil de los mismos, además de incorporar a nuestra dieta una gran cantidad de antioxidantes beneficiosos para nuestra salud (lo que permite la prevención de la DMAE, entre otras cosas) sin tener que alterar nuestros hábitos de consumo, ya que estarían incorporados en el propio AOVE, tanto para consumo en crudo (prolongando el tiempo de conservación de un AOVE para que no se degrade), como para su uso en cocina.



**6. EMOCIONES Y PREFERENCIAS DE
COLOR EN AOVE´s ENRIQUECIDOS
CON ANTIOXIDANTES. ESTUDIOS DE
APRECIACIÓN VISUAL DE
POBLACIONES ACOSTUMBRADAS O
NO AL CONSUMO DE ACEITE DE OLIVA**

6.1.- INTRODUCCIÓN

En este capítulo se ha realizado un estudio de las emociones suscitadas por el color de los AOVE's, tanto sin enriquecer como enriquecidos con 2 cantidades diferentes de extracto de antioxidantes, con el objetivo principal de explorar hasta qué punto los aceites enriquecidos con antioxidante pueden tener una aceptación diferente por parte de posibles consumidores.

A falta de poder realizar ensayos organolépticos de cata gustativa de nuestros aceites enriquecidos, debido a que primero deben de abordarse cuestiones de seguridad alimentaria empleando animales de experimentación, por el momento simplemente se aportan resultados derivados de la percepción visual del color de estos aceites. Estos resultados pueden ser interesantes, al mostrarnos aspectos positivos y negativos de los AOVE's enriquecidos respecto a los no enriquecidos, a juicio de distintos tipos de observadores tales como, por ejemplo, personas del ámbito de nuestra cultura mediterránea o personas de otras procedencias geográficas. Actualmente estamos llevando a cabo en el Instituto de Tecnología de Kyoto (Prof. Tetsuya Sato, KIT, Japón) un experimento muy similar al descrito en este capítulo, pero con observadores japoneses. Este capítulo de la Tesis Doctoral tiene como objetivo hacer una primera evaluación de las emociones y preferencias de color suscitadas por un producto alimenticio tan característico de la dieta mediterránea como es el aceite de oliva, en miembros de diferentes culturas.

La metodología inicial para llevar a cabo estos estudios ha consistido en encuestar a un grupo de personas procedentes de "países con tradición en el uso de aceites de oliva" que podemos suponer muy acostumbrados a su consumición. Como se verá más adelante, a partir de las entrevistas realizadas se han elegido los términos que pensamos que mejor describen las características de los AOVE's, según personas con experiencia previa en el análisis sensorial y cata de AOVE's. Aunque algunos investigadores han hecho una distinción explícita entre "emociones de color" y "preferencias de color", al ser dos aspectos que están estrechamente relacionados en esta Tesis hemos preferido considerar la preferencia como una emoción más (gusta-no gusta), aunque no cabe duda de que es una emoción a la que conviene prestar una atención muy especial, por su evidente relación con la decisión de compra por parte del consumidor.



6.2.- MATERIALES Y MÉTODOS

En nuestro experimento han participado 28 observadores a los que se les pidió que describieran 18 muestras (6 AOVE's puros y también enriquecidos con 2 cantidades de extracto de antioxidantes diferentes), conforme a un conjunto de 9 descriptores consistentes en dos términos opuestos. En primer lugar, fue necesario buscar los mejores descriptores posibles de las emociones relacionadas con los AOVE's. Para ello se realizaron entrevistas individuales a quince miembros del panel de cata de aceite de oliva del Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla), expertos en el análisis sensorial del aceite de oliva. Concretamente, se pidió a cada uno de ellos que describiesen libremente el aceite de oliva virgen extra intentando dar respuesta a cada una de las cuatro preguntas siguientes:

¿Cómo describiría un aceite de oliva virgen extra?

¿Cómo distingue dos aceites de oliva?

Imagine que está ante una persona de otro país, que no ha probado el aceite de oliva, ¿cómo le explicaría qué es?

¿Cómo describiría la apariencia de un aceite?

Es destacable que en ningún momento se les explicó a los entrevistados que el objetivo de la entrevista era hacer un estudio sobre el color del aceite de oliva, pues se buscaban los principales descriptores generales, que, en principio, no tienen por qué estar asociados de forma directa con el color del aceite (el estudio de dicha asociación es precisamente el objetivo específico del experimento que se describe en este capítulo). A partir de la grabación de estas entrevistas individuales, se contó el número de veces que se citaron adjetivos calificativos de los aceites, y se eligieron los 9 términos más mencionados y sus correspondientes opuestos, de manera que pudiéramos trabajar con un número no muy alto de emociones, y que además su significado fuese fácilmente comprensible para cualquier observador. Concretamente, los pares de términos (o emociones) que resultaron elegidas para la descripción de los AOVE's mediante este procedimiento fueron los siguientes:



“Aromático – Inodoro”
“Amargo – Dulce”
“Fresco – Rancio”
“Saludable – No saludable”
“Gusta – No gusta”
“Natural – Artificial”
“Picante – No picante”
“Sabroso – Insípido”
“Áspero – Suave”

Aunque en algunos casos los 9 descriptores o emociones mencionadas pueden inducir a alguna duda (por ejemplo, el mejor opuesto de “inodoro” podría ser “oloroso” y no “aromático”), como criterio general hemos preferido usar exactamente los términos obtenidos en las entrevistas individuales realizadas a los expertos del Instituto de la Grasa.

Para realizar los experimentos, se han considerado 6 AOVE's originales o sin enriquecer (designados con la letra A) y, además, para cada uno de ellos, dos adiciones de extracto de antioxidantes para obtener concentraciones de luteína de 0,05 mg/ml (designados con la letra B) y de 0,1 mg/ml (designados con la letra C), de modo que hemos evaluado un total de 18 muestras de aceite, que cubren una gama de colores relativamente amplia o representativa (Imagen 9.3.1 del Anexo II, página 265), a fin de poder estudiar las tendencias de las emociones y preferencias suscitadas por el color en potenciales consumidores de AOVE's.

En nuestro experimento han participado 28 observadores: 20 personas de Andalucía, con tradición en el uso y consumo de AOVE's y 8 personas de países diversos, sin tradición en consumo de AOVE's. En realidad la procedencia de estos últimos 8 observadores es bastante diversa y, tratándose de un número escaso de observadores, pensamos que los resultados de este grupo de personas son solamente una primera tentativa que requiere confirmación mediante nuevos experimentos (por ejemplo, el que actualmente se está desarrollando en KIT, Japón). Estos dos grupos de observadores, como se reflejará más adelante, han generado resultados diferentes, indicando que los hábitos alimenticios seguidos por los individuos están conectados con sus emociones y preferencias, como cabría esperar. Durante el experimento, a cada sujeto se le fue mostrando de forma aleatoria cada una de las 18 muestras pidiéndole

elegir entre las emociones opuestas citadas anteriormente. Además debían darle a la emoción elegida una puntuación del 1 al 3, donde 1 significa “un poco”, 2 “moderadamente” y 3 “mucho”. Por ejemplo, si al ver una muestra de AOVE se piensa que ese aceite sería muy amargo, la respuesta sería “amargo 3”; si, por el contrario, se piensa que ese aceite sería un poco dulce la respuesta sería “dulce 1”. (Tabla 9.3.1 del Anexo II, página 264). Cada persona repitió tres veces no consecutivas el juicio de cada una de las 18 muestras en días diferentes presentadas siempre en orden aleatorio.

Para realizar los juicios visuales correspondientes a emociones suscitadas por el color, las muestras de AOVE's se presentaron en botellas de la misma forma y tamaño (Imagen 6.1), situadas en el centro de una cabina de observación de color portátil Verivide (fuente de luz D65), situada en una habitación oscura. En realidad, para nuestras experiencias visuales modificamos todas las paredes originales de la cabina Verivide portátil mediante un papel blanco no fluorescente para obtener una mayor luminosidad de las muestras. También se indicó a los observadores que fijasen su observación aproximadamente en la región central y homogénea marcada en la Imagen 6.1, realizando sobre ellas sus juicios correspondientes.



Imagen 6.1

Detalle de una de las botellas utilizadas para el experimento de emociones suscitadas por el color de los AOVE's. El área que debe mirar el observador es la marcada con el círculo.

Las respuestas de los sujetos fueron analizadas de acuerdo a la ley del juicio categórico de Torgerson. Con esta ley, para cada una de las 9 emociones estudiadas, se obtienen valores z , que dan idea de la intensidad de cada estímulo. Con la información recogida se obtiene una escala para cada emoción y cada grupo de observadores, con

los valores de contorno o de frontera, es decir, los puntos de la escala que, en promedio, establecen las transiciones entre “un poco”, “moderadamente” y “mucho”, lo que permite conseguir una aproximación a la valoración de los potenciales consumidores de los diferentes AOVE's mostrados.

En el Anexo II se muestran todos los datos que tienen que ver con las encuestas realizadas y los test de apreciación visual, así como los 18 aceites mostrados a los grupos de observadores (apartado 9.3, páginas 264-293).

6.3.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1.- MUESTRAS USADAS EN EL EXPERIMENTO DE EMOCIONES DE COLOR

Se ha procedido a calcular las coordenadas CIELAB de las muestras usadas en el experimento de emociones suscitadas por el color de AOVE's, en el que se consideran seis AOVE's originales (A) y, para cada uno de ellos, dos adiciones de extracto de antioxidantes que permiten obtener muestras con concentraciones en luteína de 0,05 mg/ml (B) y 0,1 mg/ml (C), respectivamente. Se hicieron tres medidas espectrorradiométricas en la zona indicada en el círculo de la Imagen 6.1 para cada una de las 18 muestras, de modo que el papel blanco de las paredes de la cabina actúa como fondo (background), siendo los resultados promedio los de la Tabla 6.1.

Los resultados de la Tabla 6.1 son la media de tres medidas espectrorradiométricas con muestras iluminadas por una fuente simuladora de D65 ante un fondo blanco de coordenadas CIELAB: $L^* = 95,2$; $a^* = -0,5$; $b^* = -0,6$. Es importante hacer notar que el espectrorradiómetro se situó en la misma posición que ocupa la cabeza de los observadores durante los experimentos visuales, a fin de poder medir con precisión lo mismo que los observadores ven y juzgan. También es importante mencionar que estas medidas instrumentales de color se realizaron aproximadamente cuando el experimento visual estaba en su punto medio, de modo que se puedan dejar aparte los posibles cambios de color de los AOVE's con el paso del tiempo.

Según los resultados de la Tabla 6.1, tal y como se esperaba, se observa que en general los aceites ensayados tienen valores de claridad (L^*) media-alta, muy alto croma (C^*_{ab}), y tonalidades amarillentas o amarillo-verdosas (h_{ab}). Concretamente, los valores L^* de oscilan entre 74,2 y 44,7, los de C^*_{ab} entre 104,8 y 60,5, y los del ángulo de tono h_{ab} entre 104,3° y 75,7°.



Tabla 6.1

Coordenadas de color CIELAB (fuente D65, observador patrón CIE 1964) correspondientes a los seis AOVE's originales (A) y sus dos adiciones de extracto de antioxidantes para obtener concentraciones de 0,05 mg/ml (B) y 0,1 mg/ml (C).

Marca del Aceite Original	Modo	L*	a*	b*	C* _{ab}	h _{ab} (°)
Fuenroble	A	74,2	-3,5	104,7	104,8	91,9
Fuenroble	B	65,8	15,3	99,1	100,3	81,2
Fuenroble	C	61,3	23,8	93,1	96,1	75,7
Santuario Mágina	A	65,1	-0,1	94,9	94,9	90,1
Santuario Mágina	B	60,3	13,2	91,4	92,3	81,8
Santuario Mágina	C	56,4	20,2	84,2	86,6	76,5
Oro Bailén	A	70,4	-2,2	101,1	101,2	91,2
Oro Bailén	B	63,8	14,2	96,3	97,4	81,6
Oro Bailén	C	59,7	21,4	90,3	92,8	76,7
Castillo Canena (cosecha 2012)	A	72,6	-4,9	103,8	103,9	92,7
Castillo Canena (cosecha 2012)	B	65,4	13,2	97,8	98,7	82,3
Castillo Canena (cosecha 2012)	C	60,7	22,9	92,3	95,1	76,1
Castillo Canena (Noviembre 2013)	A	68,1	-12,7	97,3	98,1	97,4
Castillo Canena (Noviembre 2013)	B	60,9	5,2	89,7	89,9	86,7
Castillo Canena (Noviembre 2013)	C	56,0	15,3	82,8	84,2	79,5
Melgarejo	A	52,2	-18,7	73,3	75,6	104,3
Melgarejo	B	46,5	-3,9	66,0	66,1	93,4
Melgarejo	C	44,7	0,3	60,5	60,5	89,7

La variabilidad de las tres medidas espectrorradiométricas realizadas es muy baja, tal como muestra la Tabla 6.2, en cuyas dos últimas filas se muestran, para cada coordenada de color CIELAB, los valores medios y los valores máximos de las desviaciones típicas correspondientes, respectivamente. A efectos de nuestro experimento visual sobre emociones suscitadas por el color, estas desviaciones típicas (o variabilidad de la medida instrumental del color de las muestras) pueden considerarse totalmente despreciables y no se considerarán en las figuras siguientes.

Tabla 6.2

Desviaciones típicas de las coordenadas CIELAB correspondientes a las tres medidas espectrorradiométricas de color realizadas para cada muestra, cuyos resultados promedio aparecen en la Tabla 6.1.

Marca Aceite	Modo	L^*	a^*	b^*	C^*_{ab}	h_{ab} (°)
Fuenroble	A	0,11	0,05	0,34	0,33	0,04
Fuenroble	B	0,02	0,09	0,05	0,06	0,05
Fuenroble	C	0,27	0,05	0,47	0,46	0,06
Santuario Mágina	A	0,31	0,05	0,81	0,81	0,03
Santuario Mágina	B	0,12	0,03	0,09	0,08	0,02
Santuario Mágina	C	0,23	0,08	1,07	1,06	0,11
Oro Bailén	A	0,32	0,07	0,31	0,31	0,03
Oro Bailén	B	0,19	0,02	0,41	0,40	0,05
Oro Bailén	C	0,17	0,10	0,30	0,32	0,02
Castillo Canena (cosecha 2012)	A	0,10	0,08	0,30	0,29	0,05
Castillo Canena (cosecha 2012)	B	0,37	0,03	0,62	0,61	0,07
Castillo Canena (cosecha 2012)	C	0,35	0,09	0,70	0,70	0,05
Castillo Canena (Noviembre 2013)	A	0,17	0,22	0,73	0,71	0,17
Castillo Canena (Noviembre 2013)	B	0,63	0,18	1,24	1,23	0,16
Castillo Canena (Noviembre 2013)	C	0,51	0,02	0,80	0,78	0,11
Melgarejo	A	0,72	0,22	1,63	1,63	0,15
Melgarejo	B	0,06	0,02	0,12	0,12	0,03
Melgarejo	C	0,03	0,07	0,28	0,28	0,06
Valores Medios	-	0,26	0,08	0,57	0,57	0,07
Valores Máximos	-	0,72	0,22	1,63	1,63	0,69

La Figura 6.1 muestra la evolución del color con la adición de extracto de antioxidantes para cada una de las 6 muestras de aceite, considerando el plano a^* , b^* de CIELAB, conforme a los datos de la Tabla 6.2. Los números que aparecen junto a cada punto son los valores de L^* (redondeados al entero más próximo), y los colores de las muestras originales o sin adición de extracto (A), que son los que tienen máxima L^* y mínima a^* , se han señalado mediante una flecha roja. Según muestra la Figura 6.1, la adición de extracto produce un leve descenso de la coordenada L^* (menor claridad), un descenso de la coordenada b^* , y un aumento de la coordenada a^* . Estos cambios en las coordenadas a^* y b^* hacen que la adición de extracto produzca un leve decrecimiento del croma (C^*_{ab}) junto con un considerable descenso del ángulo de tono h_{ab} (véase también Tabla 6.1). En particular, este descenso del ángulo de tono, que es el efecto más relevante, se manifiesta en el hecho visualmente bien constatable de que las muestras

con extracto de antioxidantes son más rojizas que las originales, tal y como se esperaba. Un detalle también observable en la Figura 6.1 es que el cambio de color entre las muestras A-B es mayor que el cambio de color entre las muestras B-C, como indican las distintas longitudes de los segmentos correspondientes. Por tanto, se puede decir que la relación entre cambio de color y cantidad de extracto adicionado no es lineal, sino que al principio (adición de una pequeña cantidad de extracto al aceite puro) el cambio es mayor que al final. Es decir, con la adición del extracto de antioxidantes hay una tendencia de saturación o aproximación a un color final, que se puede suponer cercano al color del extracto puro.

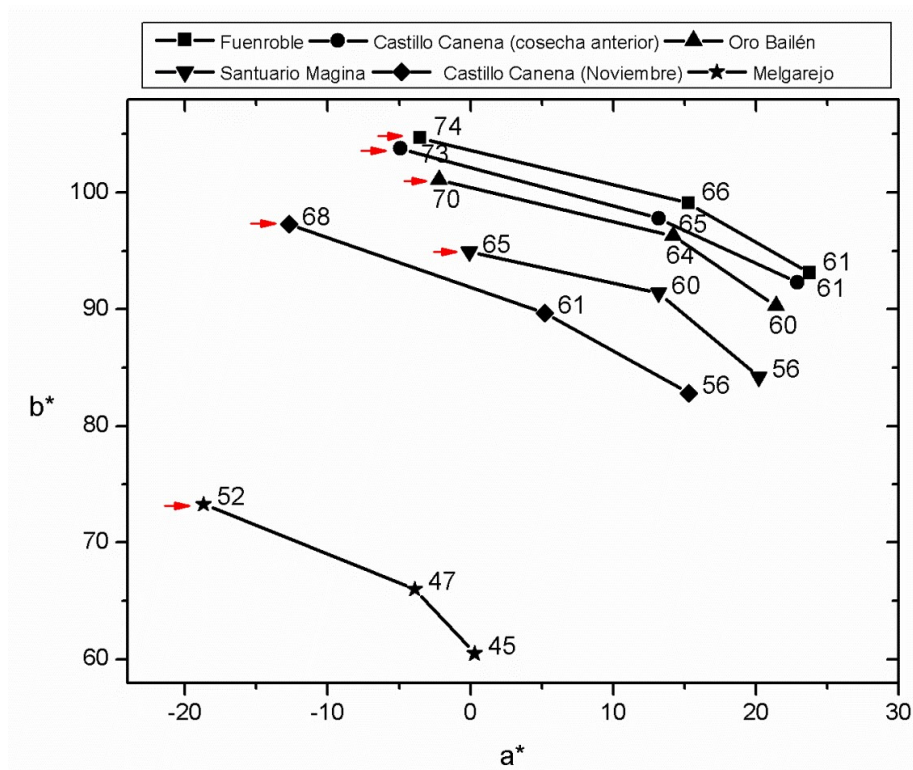


Figura 6.1

Evolución del color con las dos adiciones de extracto de antioxidantes, para cada una de las 6 muestras de aceite (ver Tabla 6.1). Las flechas rojas indican el color del aceite puro (sin antioxidantes procedente de microalgas). Los números junto a cada punto son los valores de la tercera coordenada de color CIELAB, L^* (claridad).

Los cambios de cada uno de los 3 principales atributos perceptivos del color en coordenadas CIELAB como consecuencia de las dos adiciones de extracto de antioxidantes se reflejan en la Figura 6.1a (claridad L^*), 6.2b (croma C^*_{ab}) y 6.2c (tono h_{ab}), siendo los aceites: aceites puros originales (A), con adición de 0,05 mg/ml de luteína (B) y con adición de 0,1 mg/ml de luteína (C).

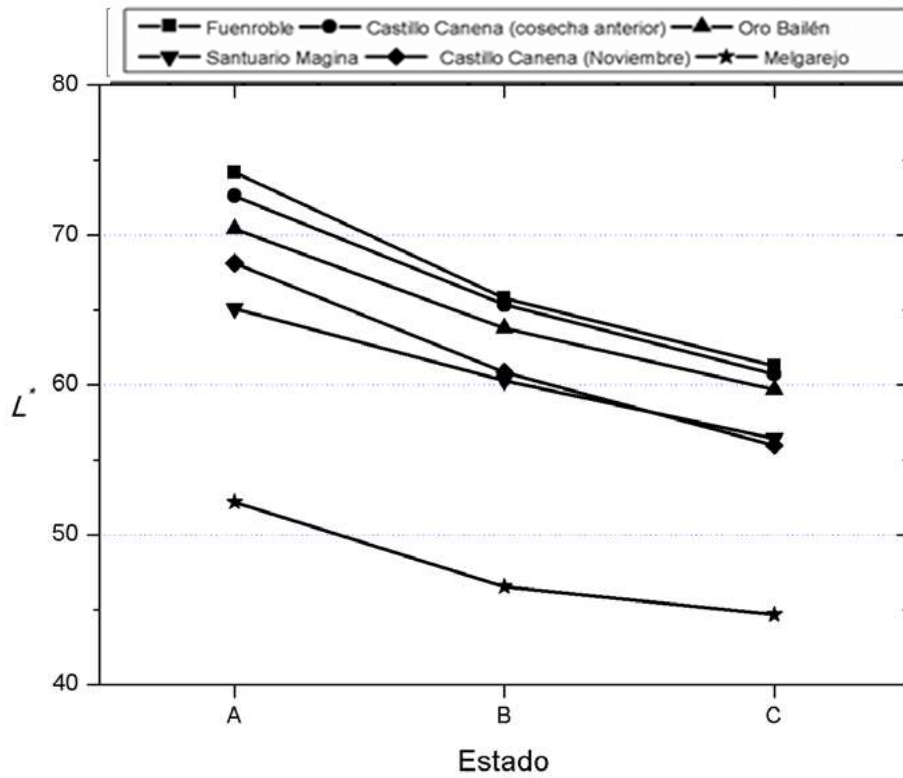


Figura 6.2a
Cambios de claridad descritos mediante la coordenada CIELAB L^* .

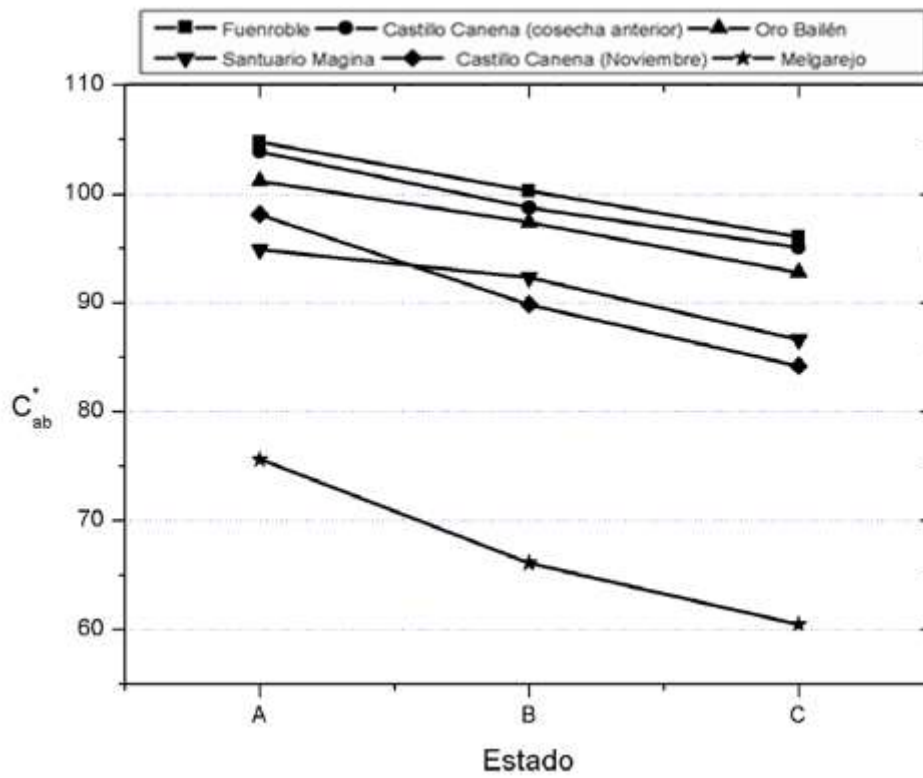


Figura 6.2b
Cambios de croma descritos mediante la coordenada CIELAB C^*_{ab} .

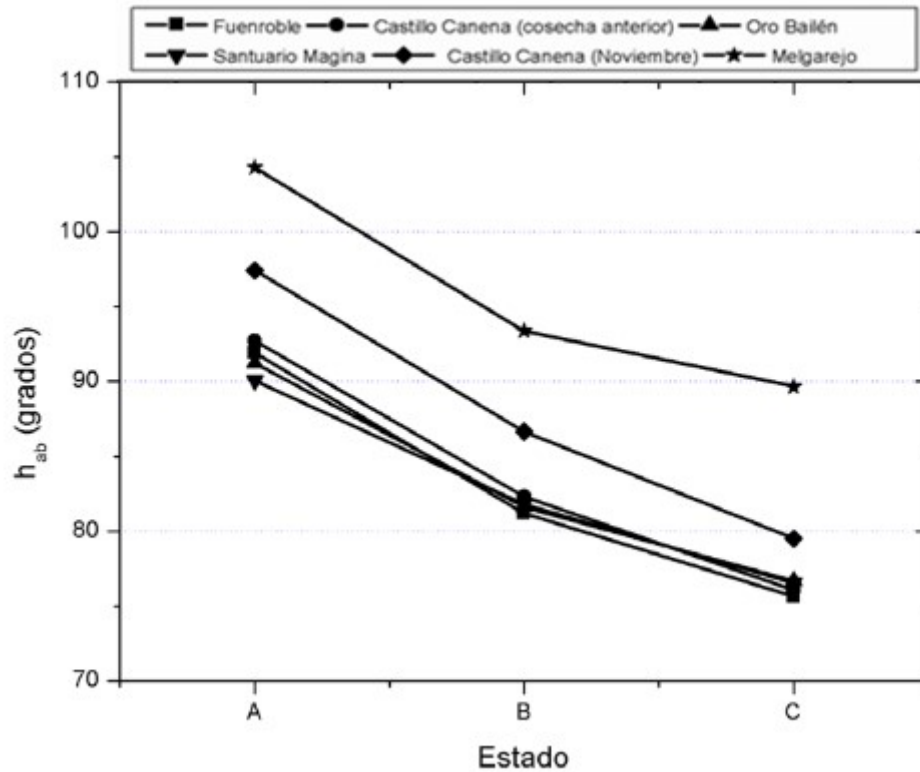


Figura 6.2c

Cambios de tono descritos mediante la coordenada CIELAB ángulo de tono, h_{ab}

La magnitud y naturaleza de los cambios de color que sufren los aceites con las dos adiciones de extracto de antioxidantes (llamados cambio A-B y A-C, respectivamente) vienen también reflejadas en los resultados de la Tabla 6.2.

En la Tabla 6.3 se muestran las diferencias de color entre los aceites A-B y A-C en unidades CIEDE2000 (ΔE_{00}), porque esta es la fórmula de diferencia de color actualmente recomendada por ISO y CIE. Seguidamente, se muestran también esas mismas diferencias de color en unidades CIELAB (ΔE_{ab}^*), por ser ésta la fórmula de diferencia de color con la que actualmente están más familiarizados la mayoría de los usuarios.

Tabla 6.3

Cambios de color entre aceites puros (A), y con adiciones de extracto para lograr concentraciones de luteína de 0,05 mg/ml (B) y 0,1 mg/ml (C), en unidades CIEDE2000 (ΔE_{00}) y CIELAB (ΔE^*_{ab}). Las 3 últimas columnas dan el porcentaje de cambio en claridad ($\% \Delta L^*$), croma ($\% \Delta C^*_{ab}$) y tono (ΔH^*_{ab}) CIELAB, y la última fila muestran los promedios de los 6 aceites.

Aceite	Cambio	ΔE_{00}	ΔE^*_{ab}	$\% \Delta L^*$	$\% \Delta C^*_{ab}$	$\% \Delta H^*_{ab}$
Fuenroble	A-B	11,9	21,4	15,4	4,4	80,2
	A-C	18,3	32,3	15,9	7,2	76,9
Santuario Mágina	A-B	8,4	14,6	10,9	3,3	85,8
	A-C	14,2	24,5	12,6	11,6	75,9
Oro Bailén	A-B	10,3	18,3	13,0	4,3	82,7
	A-C	16,0	28,1	14,6	9,0	76,4
Castillo Canena (cosecha 2012)	A-B	11,2	20,4	12,6	6,5	80,9
	A-C	18,2	32,4	13,5	7,5	79,0
Castillo Canena (Noviembre 2013)	A-B	11,2	20,8	12,2	16,0	71,9
	A-C	18,8	33,8	12,9	17,0	70,1
Melgarejo	A-B	9,8	17,5	10,4	29,7	59,8
	A-C	13,1	24,2	9,7	39,3	51,0
Valores Medios	A-B	10,5	18,8	12,4	10,7	76,9
	A-C	16,4	29,2	13,2	15,3	71,6

Se han realizado 3 medidas, y se han calculado las desviaciones típicas de las diferencias de color de esas 3 medidas que, en promedio para los 6 AOVE's, son de 0.5 unidades CIELAB y de 0.2 unidades CIEDE2000 (tanto en el proceso A-B como en el A-C), estos valores pueden considerarse despreciables teniendo en cuenta las magnitudes de las diferencias de color que se manejan. Las diferencias de color en unidades CIELAB se pueden además descomponer en diferencias de claridad, croma y tono, de modo que los porcentajes de esas 3 diferencias están dados en las 3 últimas columnas de la Tabla 6.3.

Como puede observarse en la Tabla 6.3, las diferencias de color A-C son mayores que las A-B (tanto en unidades CIEDE2000 como en unidades CIELAB), pero no el doble, como podría quizá pensarse que podría suceder al pasar de una concentración de extracto de antioxidantes de 0,05 mg/ml (B) a una de 0,1 mg/ml (C). En efecto, como ya se ha indicado anteriormente, la adición de extracto no produce un cambio lineal del color, sino que es un proceso con tendencia hacia un color (aproximadamente, el del extracto enriquecido puro). En todo caso, se observa que las diferencias de color promedio en unidades CIELAB son de 18.8 para A-B, y de 29.2 para A-C; es decir,

valores muy elevados y claramente perceptibles para el ojo humano (el umbral de discriminación del ojo humano está en torno a 1.0 unidades CIELAB). Por otra parte, en las diferencias de color totales el componente principal es un cambio de tono (ΔH^*_{ab}), que en promedio supone un 76,9 % y un 71,6% en los procesos A-B y A-C, respectivamente (ver Tabla 6.3). Como ya se ha indicado anteriormente, este cambio de tono es en todos los casos un enrojecimiento provocado por la adición del extracto (menor ángulo de tono h_{ab}), como muestran los resultados de la Tabla 6.1 y la Figura 6.2c. Además, la adición de extracto de antioxidantes produce descensos de claridad y de croma que, en promedio son de magnitudes similares, en torno al 10%-15% de la diferencia total (véase Tabla 6.3), cada una de ellas.

Para mejor visualización, los resultados de la Tabla 6.3 se han representado a continuación de forma gráfica en las Figuras 6.3 a, b y c:

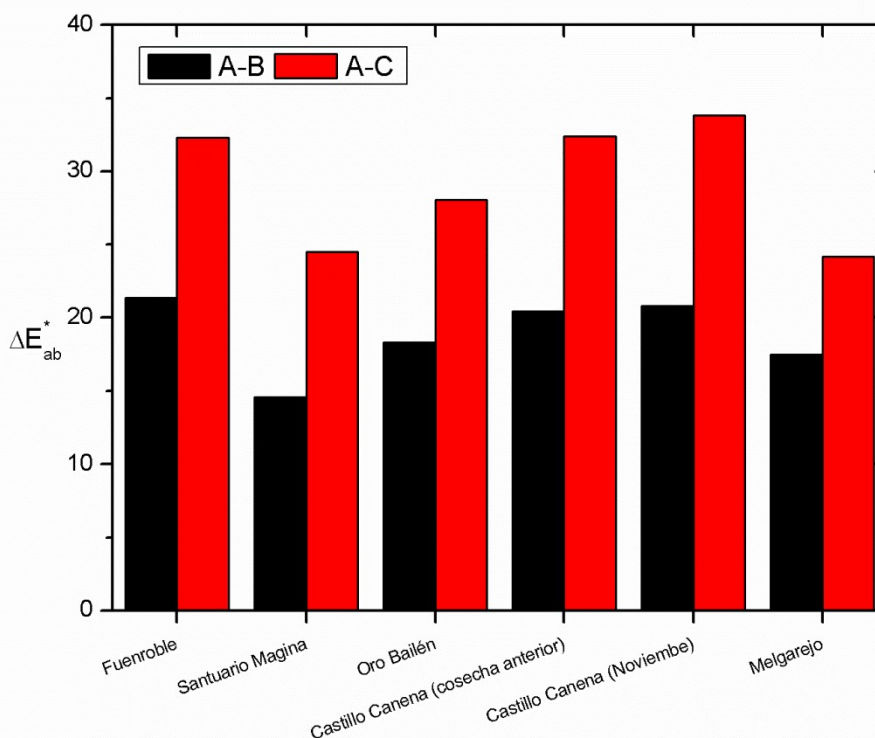


Figura 6.3a

Diferencias de color para cada uno de los 6 aceites en los procesos A-B y A-C, en unidades CIELAB (ΔE^*_{ab}).

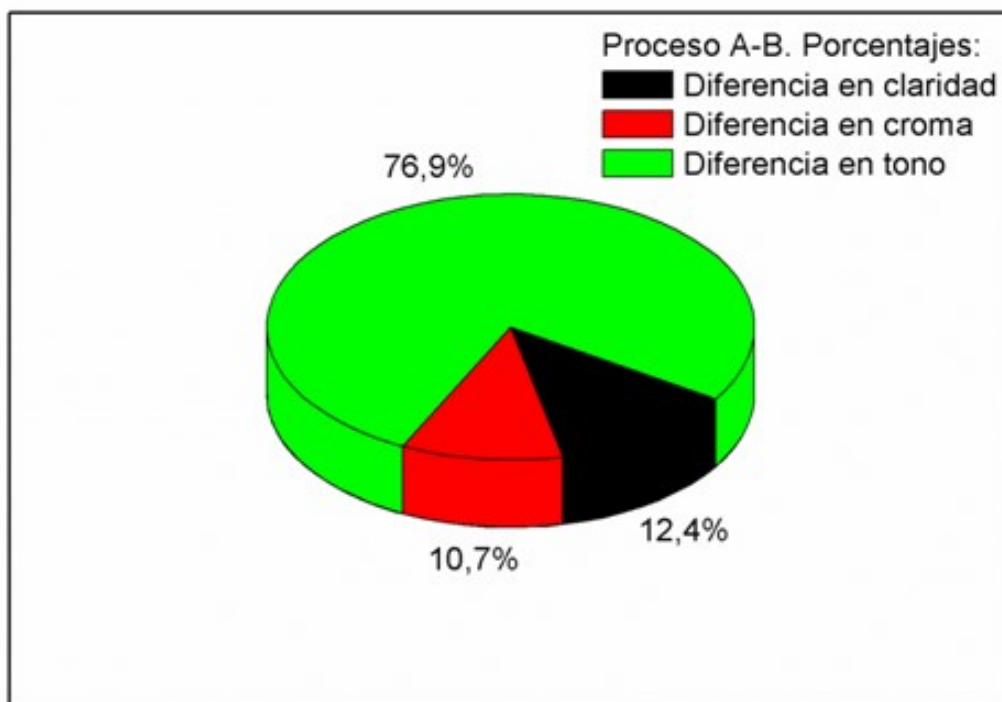


Figura 6.3b

% promedios de cambio en claridad ($\% \Delta L^*$), cromatismo ($\% \Delta C^*_{ab}$) y tono ($\% \Delta H^*_{ab}$) CIELAB de los AOVE's con una primera adición de extracto (proceso A-B).

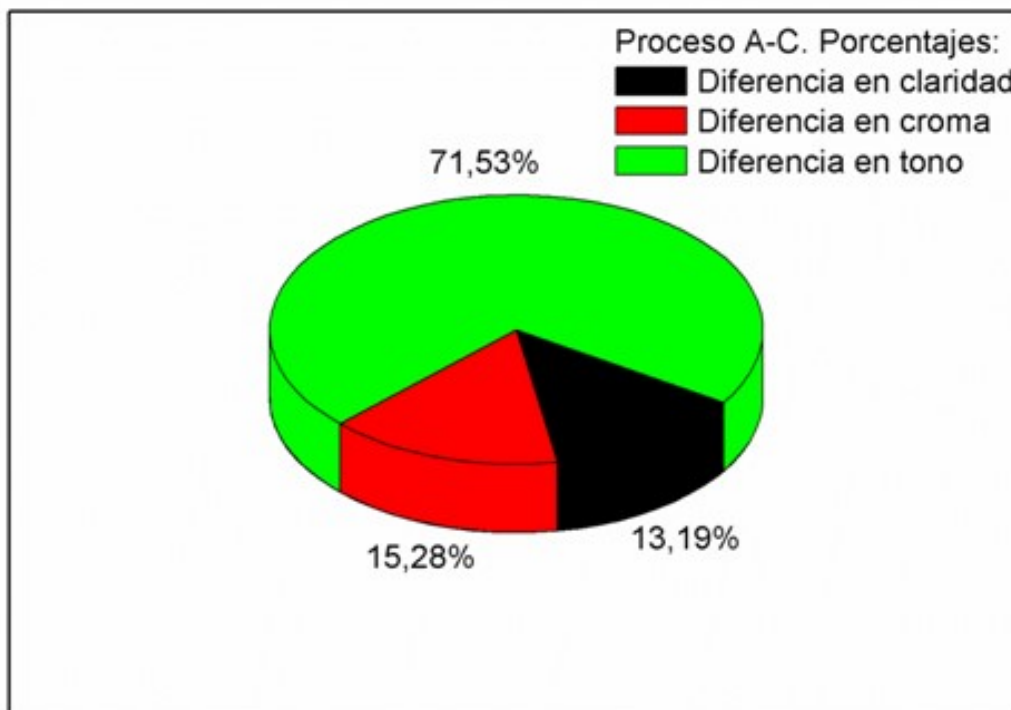


Figura 6.3c

% promedios de cambio en claridad ($\% \Delta L^*$), cromatismo ($\% \Delta C^*_{ab}$) y tono ($\% \Delta H^*_{ab}$) CIELAB de los AOVE's con una segunda adición de extracto (proceso A-C).

6.3.2.- VARIABILIDAD INTER-OBSERVADOR E INTRA-OBSERVADOR

En esta sección se van a describir los resultados del experimento visual sobre emociones de color que hemos realizado. Se comienza mostrando en la Tabla 6.4 los resultados de variabilidad inter-observador e intra-observador para cada una de las 9 emociones y para los dos grupos de observadores participantes en este experimento, que llamaremos observadores acostumbrados y no acostumbrados al consumo de aceite de oliva. Mientras que la variabilidad intra-observador hace referencia a las variaciones entre las 3 medidas realizadas por cada observador para cada muestra; la variabilidad inter-observador se refiere a la variabilidad entre el valor promedio de las 3 medidas de cada observador y la media del total de los observadores. Estas variabilidades se han calculado aquí mediante el error cuadrático medio (RMSE). Como era de esperar, se puede observar que en todos los casos la variabilidad inter-observador es superior a la variabilidad intra-observador, es decir, los observadores suelen ser más consistentes con ellos mismos que con el promedio del grupo. Se observa que la máxima variabilidad intra-observador es 1,13, mientras que la máxima variabilidad inter-observador asciende a 1,51 (téngase en cuenta que estos valores tienen relación directa con nuestra escala experimental que va de -3 a +3; o sea, un rango de 6 unidades). Ciertamente estos valores de variabilidad son altos, pero usuales en este tipo de experimentos. También puede observarse que tanto la variabilidad inter-observador como la intra-observador son, en general, mayores para el segundo grupo (observadores no acostumbrados), lo que podría deberse a que la falta de costumbre en el uso de aceite de oliva puede originar que las respuestas sean más aleatorias, o también a que estos 8 observadores son de procedencia bastante más heterogénea que los 20 observadores del grupo de sujetos acostumbrados al uso y consumo del aceite de oliva.



Tabla 6.4

Resultados de variabilidad inter-observador e intra-observador para las 9 emociones consideradas y los dos grupos de observadores participantes en nuestro experimento.

	Acostumbrados		No acostumbrados	
	Intra-observador (RMSE)	Inter-observador (RMSE)	Intra-observador (RMSE)	Inter-observador (RMSE)
Artificial/Natural	0,69	1,09	0,95	1,48
Dulce/Amargo	1,01	1,40	1,00	1,42
Inodoro/Aromático	0,92	1,12	1,06	1,51
Insípido/Sabroso	0,96	1,10	0,90	1,43
No/Gusta	0,67	1,05	0,86	1,40
No/Picante	1,10	1,37	0,87	1,50
No/Saludable	0,68	1,09	1,13	1,24
Rancio/Fresco	0,64	1,09	0,87	1,33
Suave/Áspero	1,10	1,29	0,89	1,35

6.3.2.1.- Escalas emocionales

Los valores de frontera (Bi), resultantes de la aplicación de la ley de Torgerson, dan información útil de cómo es cada escala emocional en cada uno de los dos grupos de observadores. Por ejemplo, para un grupo, cierto estímulo de color puede ser “un poco picante” y para otro grupo el mismo estímulo puede ser “muy picante”; por tanto, cada grupo tendría una escala emocional diferente. El primer grupo tendría un valor de frontera muy alto para “poco picante” y el segundo grupo un valor de frontera bajo para “muy picante”. Cuanto más cercanos estén estos valores de frontera, más improbable es que los sujetos de cada grupo usen el término comprendido entre esos valores. Todos los límites han sido centrados en 0, valor que nos indica el paso de una emoción a su opuesta. Los valores más cercanos a 0 indican el paso de “un poco” a “moderadamente”, y los más alejados de 0 indican el paso de “moderadamente” a “mucho”.

En la Tabla 6.5 (y su correspondiente Figura 6.4) se pueden observar los resultados de los valores de frontera para las 9 escalas emocionales en cada uno de los dos grupos de observadores. Esta representación es útil para saber qué significa la puntuación z de cada estímulo. Por ejemplo, si para el grupo de observadores

acostumbrados, un estímulo tiene un valor $z = -1,3$ en el par de emociones "artificial-natural" significa que está por debajo de la categoría "muy artificial" y por encima de la categoría "un poco artificial".

Se puede observar que hay pares de emociones cuyo escalado es asimétrico, es decir, el escalamiento se hace de forma muy parecida para uno de los términos en los dos grupos, pero no para la emoción opuesta. Como ejemplo, en el par "áspero-suave" ambos grupos consideran en general los aceites igual de suaves, pero, si los aceites son considerados ásperos, los sujetos del grupo de acostumbrados asocian el color de los aceites a emociones más suaves que los sujetos del grupo de no acostumbrados. Es más probable que este último grupo describa un aceite como muy áspero.

Tabla 6.5

Valores (Bi) para cada emoción en sujetos con tradición en el uso de AOVE's y sin ella.

Acostumbrados	[-3,-2]	[-2,-1]	[-1,1]	[1,2]	[2,3]
Artificial/Natural	-1,52	-0,72	0	0,87	1,96
Dulce/Amargo	-1,61	-0,55	0	0,69	1,95
Inodoro/Aromático	-1,63	-0,66	0	0,82	2,16
Insípido/Sabroso	-1,91	-0,72	0	0,81	1,96
No/Gusta	-1,56	-0,86	0	1,01	2,00
No/Picante	-1,36	-0,48	0	0,93	2,01
No/Saludable	-1,43	-0,74	0	1,02	2,04
Rancio/Fresco	-1,76	-0,82	0	0,86	1,94
Suave/Áspero	-1,95	-0,53	0	0,61	2,12
No acostumbrados					
Artificial/Natural	-1,11	-0,53	0	0,57	1,42
Dulce/Amargo	-1,59	-0,71	0	0,45	1,19
Inodoro/Aromático	-1,59	-0,43	0	0,50	1,51
Insípido/Sabroso	-1,28	-0,50	0	0,62	1,66
No/Gusta	-1,06	-0,40	0	0,75	1,58
No/Picante	-0,95	-0,42	0	0,70	1,63
No/Saludable	-1,46	-0,50	0	0,77	1,57
Rancio/Fresco	-1,12	-0,47	0	0,74	1,90
Suave/Áspero	-1,97	-0,88	0	0,36	1,15

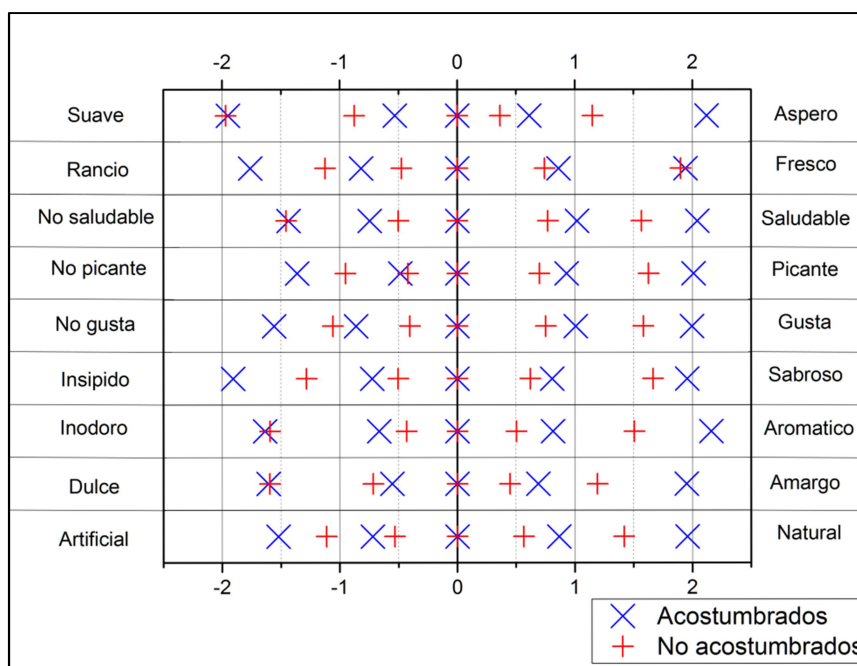


Figura 6.4

Representación de los valores de frontera calculados para las 9 escalas emocionales y los 2 grupos de observadores (acostumbrados y no acostumbrados).

6.3.2.2.- Correlación entre diferentes emociones

Es posible dar a cada uno de los estímulos un valor z dentro de las escalas elaboradas anteriormente, lo que nos da idea de qué intensidad tiene cada estímulo en esas escalas. Este valor z se puede interpretar como un valor directamente relacionado con el valor medio de todas las respuestas de los sujetos pero re-escalado, es decir, se interpreta como la intensidad emocional del estímulo.

El proceso de análisis de entrevistas individuales, con el que se seleccionaron las 9 emociones sobre las que se ha realizado nuestro experimento, no nos garantiza en absoluto que dichas emociones sean independientes entre sí. Dicho de otro modo, es probable que varias emociones estén correlacionadas entre sí, siendo realmente como facetas de un mismo hecho. En la Tabla 6.6 se dan los coeficientes de correlación de Pearson (r) obtenidos entre los valores z para cada emoción y grupo de sujetos. Cuanto más cercano a 0 sea el valor de dicho coeficiente menor será la correlación entre las parejas de emociones y cuanto más cercano a ± 1 mayor será la correlación entre emociones. Se ha tomado como umbral de una buena correlación un valor superior a 0,9 de modo que las correspondientes celdas de la Tabla 6.6 se han coloreado en tono amarillo.

Tabla 6.6

Coefficientes de correlación de Pearson (r) obtenidos mediante los valores z para cada emoción y grupo de sujetos

	Acostumbrados							
	Inodoro/ Aromático							
Dulce/ Amargo	0,16	Dulce/ Amargo						
Rancio/ Fresco	0,82	-0,25	Rancio/ Fresco					
No/ Saludable	0,85	-0,23	0,99	No/ Saludable				
No/ Gusta	0,84	-0,19	0,98	0,99	No/ Gusta			
Artificial/ Natural	0,85	-0,18	0,99	0,99	0,99	Artificial/ Natural		
No/ Picante	0,00	0,81	-0,44	-0,44	-0,40	-0,40	No/ Picante	
Insípido/ Sabroso	0,93	-0,05	0,91	0,94	0,93	0,93	-0,23	Insípido/ Sabroso
Suave/ Áspero	-0,23	0,65	-0,65	-0,64	-0,62	-0,63	0,88	-0,43

	No Acostumbrados							
	Inodoro/ Aromático							
Dulce/ Amargo	0,21	Dulce/ Amargo						
Rancio/ Fresco	-0,38	-0,84	Rancio/ Fresco					
No/ Saludable	0,32	0,89	-0,87	No/ Saludable				
No/ Gusta	-0,42	-0,74	0,88	-0,79	No/ Gusta			
Artificial/ Natural	-0,68	-0,54	0,75	-0,67	0,90	Artificial/ Natural		
No/ Picante	-0,44	-0,69	0,90	-0,79	0,97	0,90	No/ Picante	
Insípido/ Sabroso	-0,31	-0,91	0,93	-0,88	0,89	0,73	0,87	Insípido/ Sabroso
Suave/ Áspero	0,27	0,93	-0,89	0,91	-0,83	-0,65	-0,81	-0,94

Se puede observar en la Tabla 6.6 que las correlaciones son bastantes distintas en ambos grupos. Por ejemplo, en el grupo de observadores acostumbrados al consumo de AOVE's hay una alta correlación entre las emociones "fresco-rancio", "saludable-no saludable", "gusta-no gusta", "sabroso-insípido", "aromático-inodoro" y "natural-artificial". Es decir, un aceite que gusta se percibe también como fresco, sabroso, saludable y aromático. En cambio, para el grupo de observadores no acostumbrados al consumo de AOVE's, se observa, por ejemplo, que hay una correlación alta entre "gusta-no gusta", "natural-artificial" y "picante-no picante".

Es también destacable que en este último grupo de observadores hay además correlación inversa (r negativo) entre “sabroso-insípido” con “amargo-dulce” y “áspero-suave”, es decir, un aceite percibido como sabroso se relaciona con aceites suaves y dulces. Estas diferencias se podrían atribuir a que los sujetos del primer grupo, al estar acostumbrados al consumo del aceite de oliva tienen más claro lo que para ellos es un “buen” aceite, pues todas las emociones que correlacionan están relacionadas con parámetros de calidad del aceite. En el caso del segundo grupo, la situación es algo más complicada por varias razones. En primer lugar, el número de observadores es bajo y las correlaciones son más bajas que para el primer grupo. En segundo lugar, es posible que para estos sujetos sin tradición en el uso de los AOVE's las respuestas sean más aleatorias, pues son sujetos de distintas culturas y, como se ha mencionado anteriormente, éste es un factor muy importante en las emociones de color.

6.3.2.3.- Dependencia entre valores z y cantidad de extracto de antioxidantes

Por el momento, en esta sección 6.3.2 hemos analizado solamente la respuesta emocional de los observadores a los AOVE's puros u originales, sin considerar el efecto sobre la misma de las adiciones de extracto de antioxidantes. Como ya se ha dicho, la adición de extracto de antioxidantes hace que el color de los AOVE's ensayados cambie, y además este cambio de color es claramente perceptible, ya que principalmente es un cambio de tono, de manera que las muestras tienden a enrojecerse. Estudiamos ahora los cambios en las distintas emociones cuando consideramos AOVE's con 2 concentraciones de antioxidantes, respecto a las emociones suscitadas por los AOVE's puros. En todas las gráficas siguientes se ha mantenido la misma escala (valores entre -2 y +2, aproximadamente) para poder comparar mejor el cambio en las emociones. Los valores negativos corresponden a la primera emoción de la leyenda del eje y, mientras que los positivos corresponden a la segunda emoción mencionada en la leyenda del eje y. Además para cada emoción presentamos en gráficas distintas los resultados de los 2 grupos de observadores (en la parte superior los sujetos acostumbrados y en la inferior los no acostumbrados).

Inodoro - Aromático

En la Figura 6.5 se observa como todos los aceites son percibidos por debajo de la categoría "muy aromático" (valor +2); es decir, se consideran solamente como "moderadamente aromáticos" o "un poco aromáticos", tanto para el grupo de observadores acostumbrados como el de no acostumbrados. No hay una variación importante en cómo de aromático se espera que sea un aceite al cambiar su color añadiendo el extracto de antioxidantes en las dos concentraciones utilizadas.

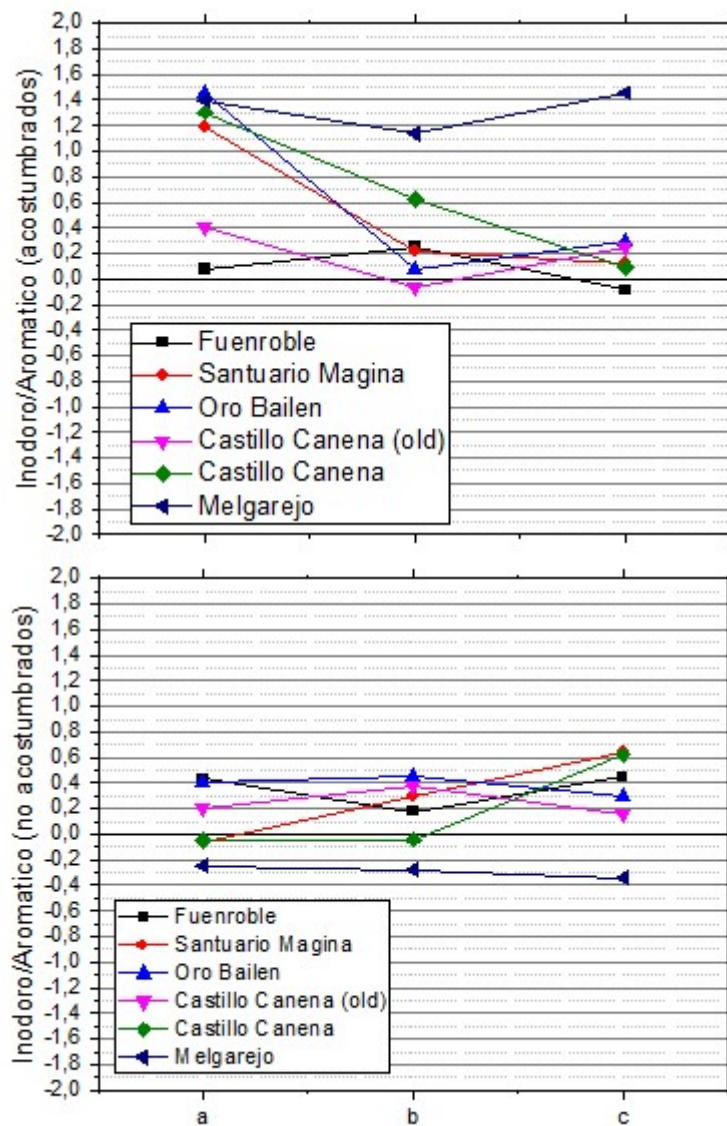
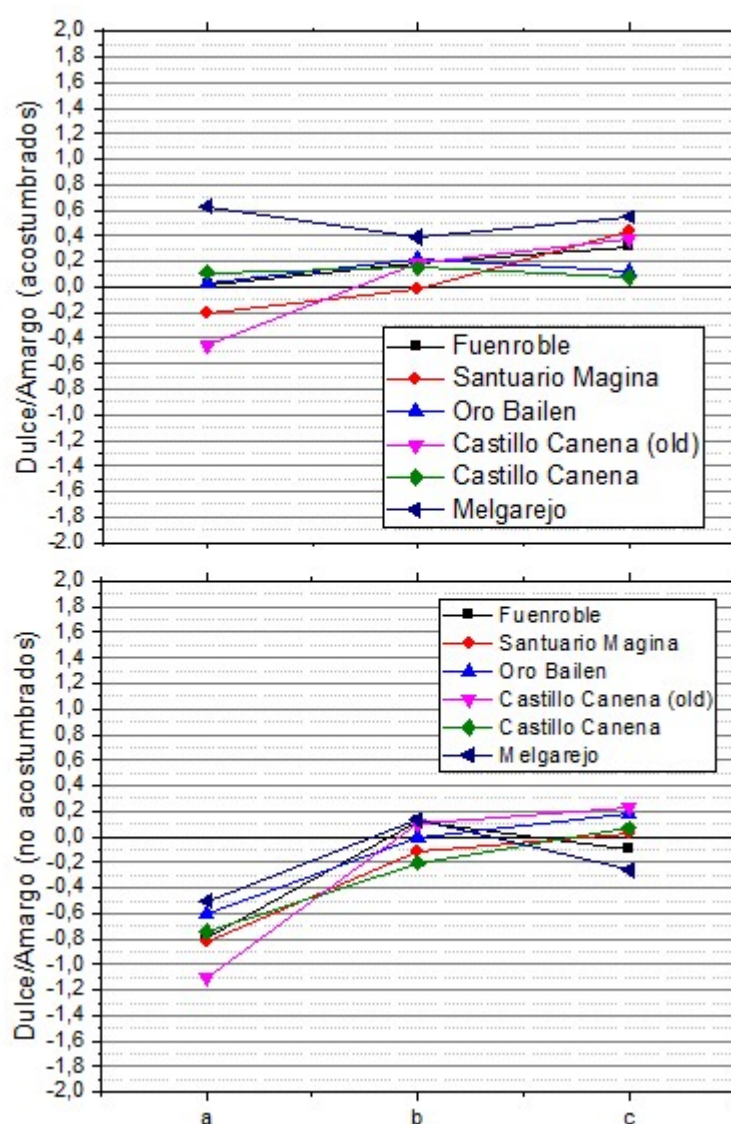


Figura 6.5

Resultados promedio (valores z) para la emoción "Inodoro/Aromático" en los sujetos acostumbrados (superior) y no acostumbrados (inferior) al consumo de AOVE's (a: AOVE's puros; b: AOVE's con concentración de luteína de 0,05 mg/ml; c: AOVE's con concentración de luteína de 0,1 mg/ml).

Dulce - Amargo

En el caso del par de emociones “dulce-amargo”, se puede comprobar en la Figura 6.6 que los sujetos con tradición en el uso de aceite de oliva no perciben casi ninguna variación en esta emoción al añadir el antioxidante, mientras que los sujetos sin tradición en aceite de oliva esperan que el aceite sea ligeramente más amargo cuando se añaden los antioxidantes. Además, se observa que este grupo de observadores, percibe todos los AOVE's que no han sido enriquecidos con extracto de antioxidantes, como “un poco dulces” o “moderadamente dulces”.

**Figura 6.6**

Resultados promedio (valores z) para la emoción “Dulce/Amargo” en los sujetos acostumbrados (superior) y no acostumbrados (inferior) al consumo de AOVE's (a: AOVE's puros; b: AOVE's con concentración de luteína de 0,05 mg/ml; c: AOVE's con concentración de luteína de 0,1 mg/ml).

Rancio - Fresco

En la Figura 6.7 se observa que cuanto más extracto de antioxidantes tiene el aceite se considera como menos fresco, especialmente en el caso de los sujetos acostumbrados al consumo de los AOVE's. En el caso de los observadores acostumbrados, es también destacable el caso del aceite "Melgarejo" en el cual la tendencia es distinta a la de los demás aceites, pues pasa a percibirse como más fresco al añadirle antioxidante. Este comportamiento se puede deber a que el aceite "Melgarejo" es el único cuyo tono no se hace excesivamente rojizo al añadir extracto de antioxidantes (véase Figuras 6.1 y 6.2c), ya que al añadirle el extracto de antioxidantes su ángulo de tono CIELAB tiende a los 90° aproximadamente, por encima de los valores obtenidos para los otros AOVE's. En efecto, para el resto de aceites, al añadirle extracto tienden a disminuir su ángulo de tono CIELAB por debajo de los 90°, pasando de un amarillento a un anaranjado que hace que se perciba como "menos fresco". Este comportamiento diferencial del aceite "Melgarejo" no lo percibe el grupo de sujetos no acostumbrados, para el que la emoción "fresco" no llega a dejar de suscitarse para ninguno de los aceites, incluso con adición de extracto de antioxidantes.



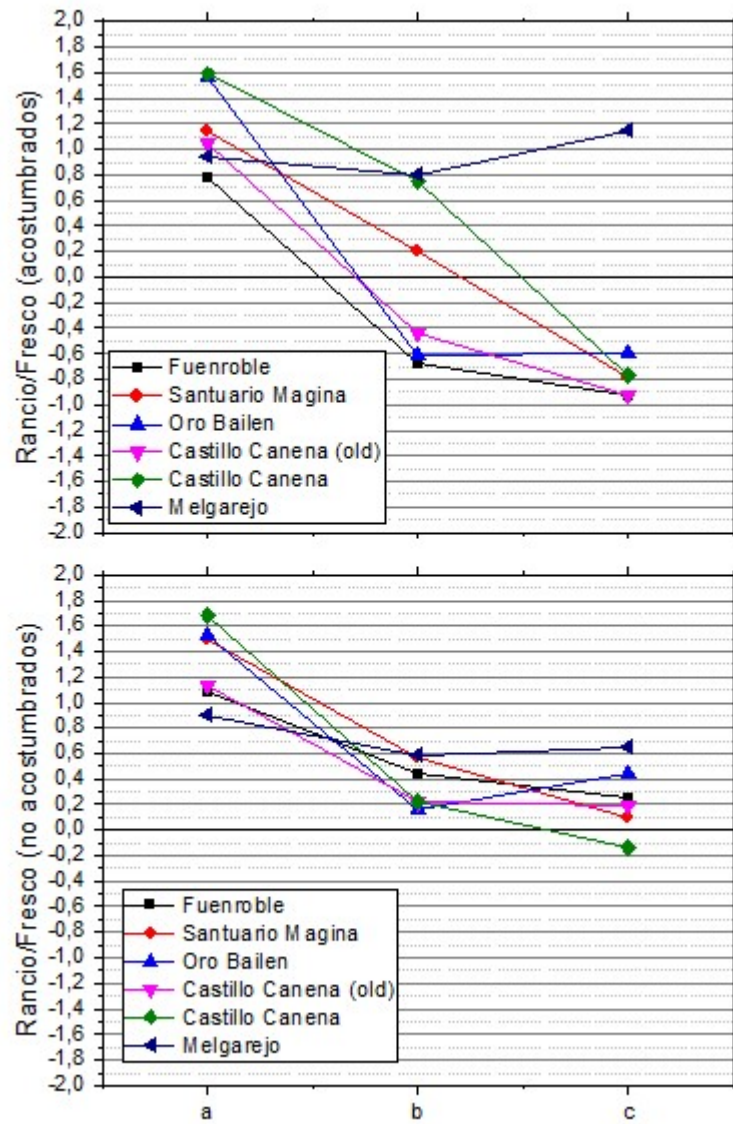
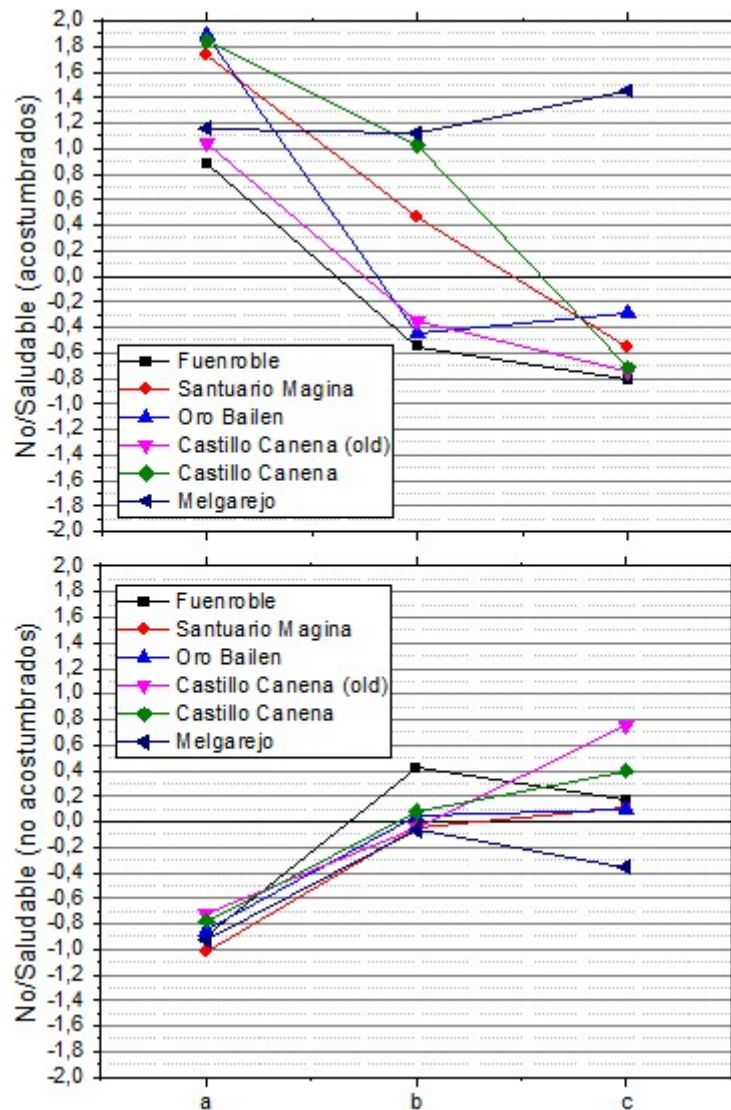


Figura 6.7

Resultados promedio (valores z) para la emoción "Rancio/Fresco" en los sujetos acostumbrados (superior) y no acostumbrados (inferior) al consumo de AOVE's (a: AOVE's puros; b: AOVE's con concentración de luteína de 0,05 mg/ml; c: AOVE's con concentración de luteína de 0,1 mg/ml).

No saludable - Saludable

En este par de emociones se puede comprobar cómo para el grupo de los observadores acostumbrados al consumo de AOVE's la situación es bastante similar a la de la emoción con "rancio-fresco", incluida la singularidad del aceite "Melgarejo". En efecto, se aprecia que con la adición de antioxidante los AOVE's muestran una tendencia decreciente en la emoción "saludable". Sin embargo, es importante destacar que para el grupo de observadores no acostumbrados al uso de AOVE's la tendencia se invierte, de modo que estos sujetos tienen una percepción inicial de que los colores de los AOVE's sin extracto no son saludables, mientras que al añadir el extracto de antioxidantes y enrojecerse, los aceites pasan a percibirse como "un poco más saludables".

**Figura 6.8**

Resultados promedio (valores z) para la emoción "No saludable/Saludable" en los sujetos acostumbrados (superior) y no acostumbrados (inferior) al consumo de AOVE's (a: AOVE's puros; b: AOVE's con concentración de luteína de 0,05 mg/ml; c: AOVE's con concentración de luteína de 0,1 mg/ml).

No gusta - Gusta

La Figura 6.9 en el grupo de observadores acostumbrados al uso de AOVE's es muy similar a las Figuras 6.8 y 6.7 anteriores (es decir, hay una alta correlación entre los resultados de estos 3 pares de emociones). En efecto, con la excepción del aceite "Melgarejo", los aceites puros o con menos adición de extracto de antioxidantes son los que más gustan. Este resultado es importante, pues la emoción "gusta" puede estar particularmente relacionada con la decisión de compra del consumidor. Así, es interesante saber que un AOVE "Melgarejo" con adición de antioxidante gusta un poco más que el aceite de oliva virgen extra original, en el caso de un consumidor acostumbrado al uso o consumo de AOVE's. Es importante destacar también que para el grupo de observadores no acostumbrados al consumo de AOVE's la tendencia en esta emoción es similar a la de los observadores acostumbrados, aunque no tan fuerte (salvo para el caso del aceite "Melgarejo"). Por otro lado, es curioso observar que en este segundo grupo la tendencia de "gusta-no gusta" (Figura 6.9) es inversa a la de "saludable-no saludable" (Figura 6.8), de modo que la mayoría de los AOVE's enriquecidos con extracto de antioxidantes gustan menos que los originales, a la vez que se consideran más saludables, lo cual a primera vista resulta algo contradictorio, pues lo más lógico sería que gustase más lo que se considera más saludable. El escaso número y diversa procedencia de observadores de este segundo grupo puede ser la causa de este resultado "anómalo" que requiere una futura revisión.

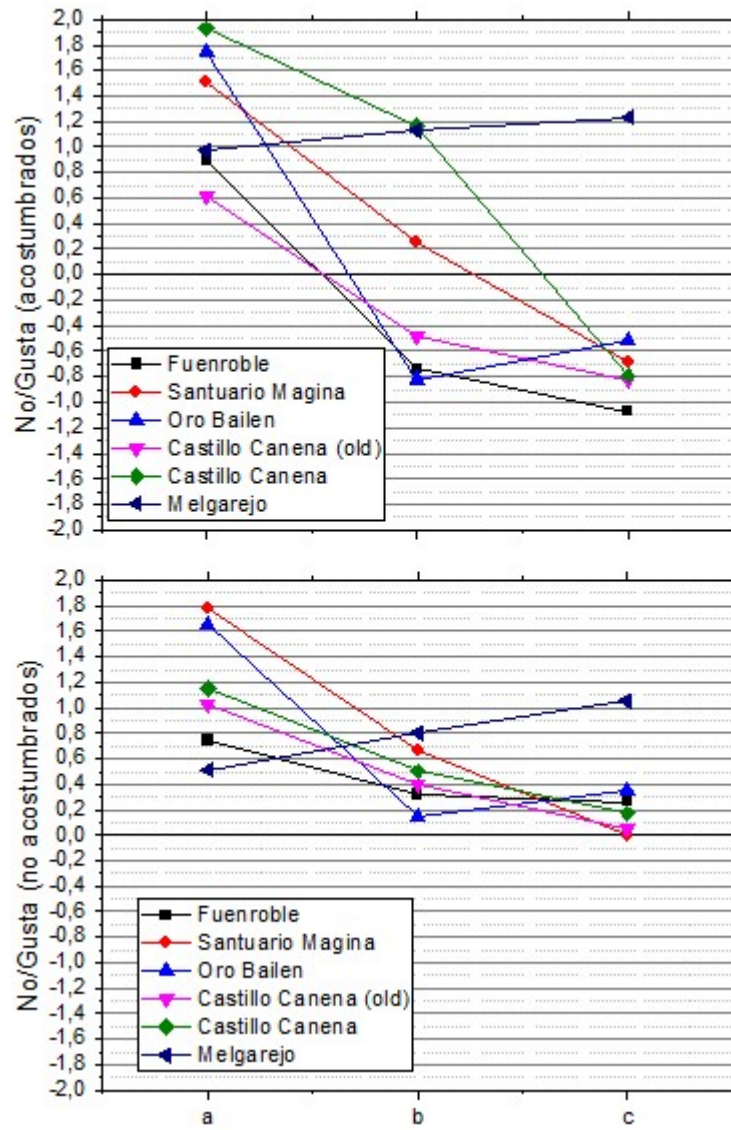
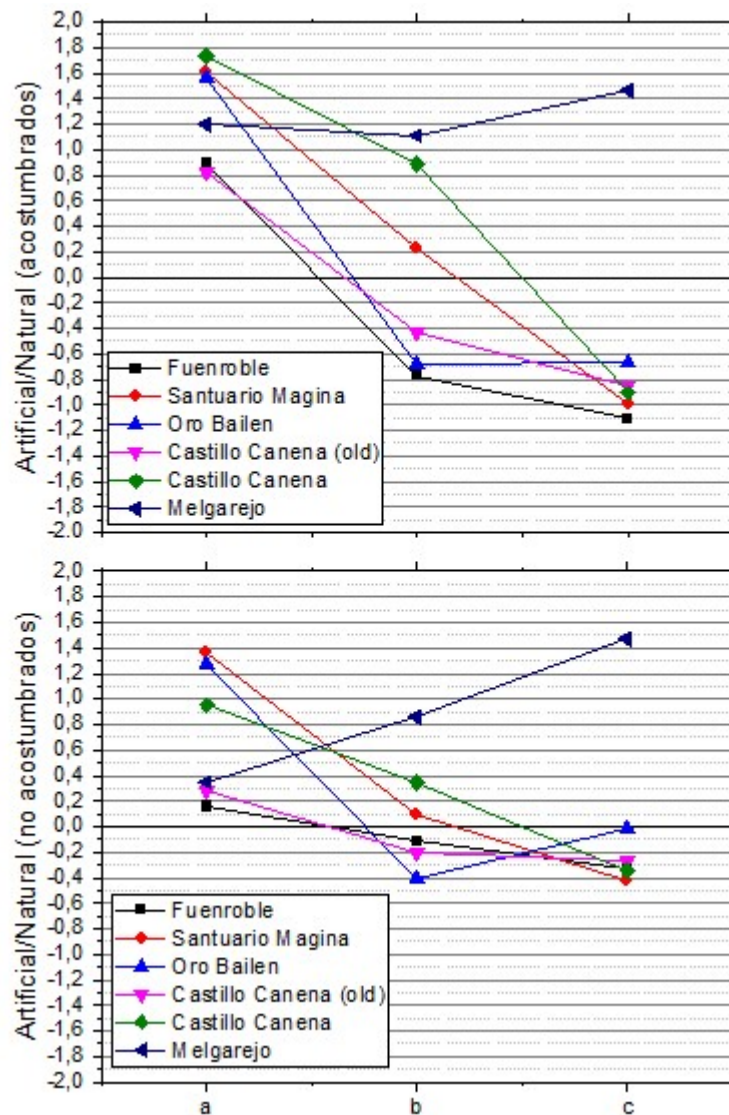


Figura 6.9

Resultados promedio (valores z) para la emoción "No gusta/Gusta" en los sujetos acostumbrados (superior) y no acostumbrados (inferior) al consumo de AOVE's (a: AOVE's puros; b: AOVE's con concentración de luteína de 0,05 mg/ml; c: AOVE's con concentración de luteína de 0,1 mg/ml).

Artificial - Natural

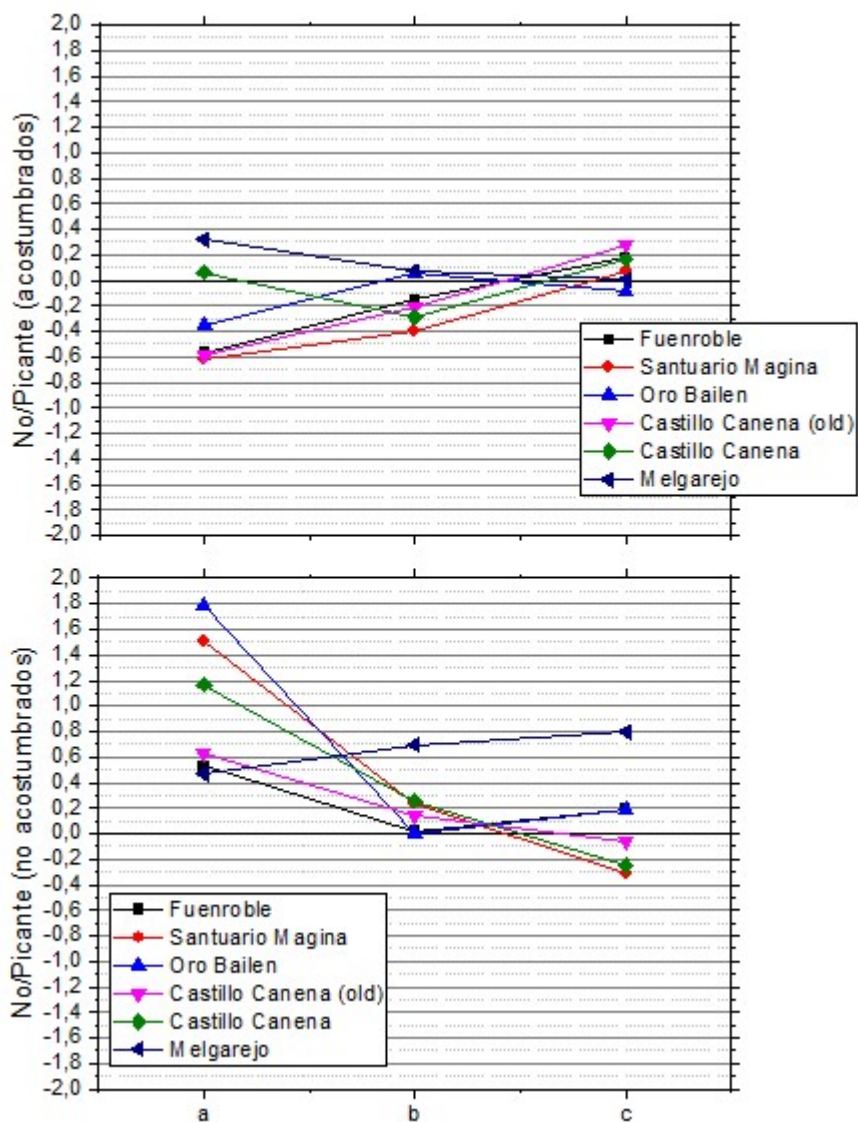
Como se ha comentado en la sección 6.3.2.2 referida a correlaciones entre emociones, los resultados de este par de emociones se correlacionan bien en ambos grupos de observadores con los de las emociones “gusta-no gusta”, y esto también es válido cuando consideramos el cambio de AOVE's puros a AOVE's con antioxidantes (véase Figura 6.10). En general, la gente asocia lo natural con algo beneficioso y por tanto, gusta. Puede ser interesante recomendar la adición de extracto de antioxidantes a los fabricantes del AOVE “Melgarejo”.

**Figura 6.10**

Resultados promedio (valores z) para la emoción “Artificial/Natural” en los sujetos acostumbrados (superior) y no acostumbrados (inferior) al consumo de AOVE's (a: AOVE's puros; b: AOVE's con concentración de luteína de 0,05 mg/ml; c: AOVE's con concentración de luteína de 0,1 mg/ml).

No picante - Picante

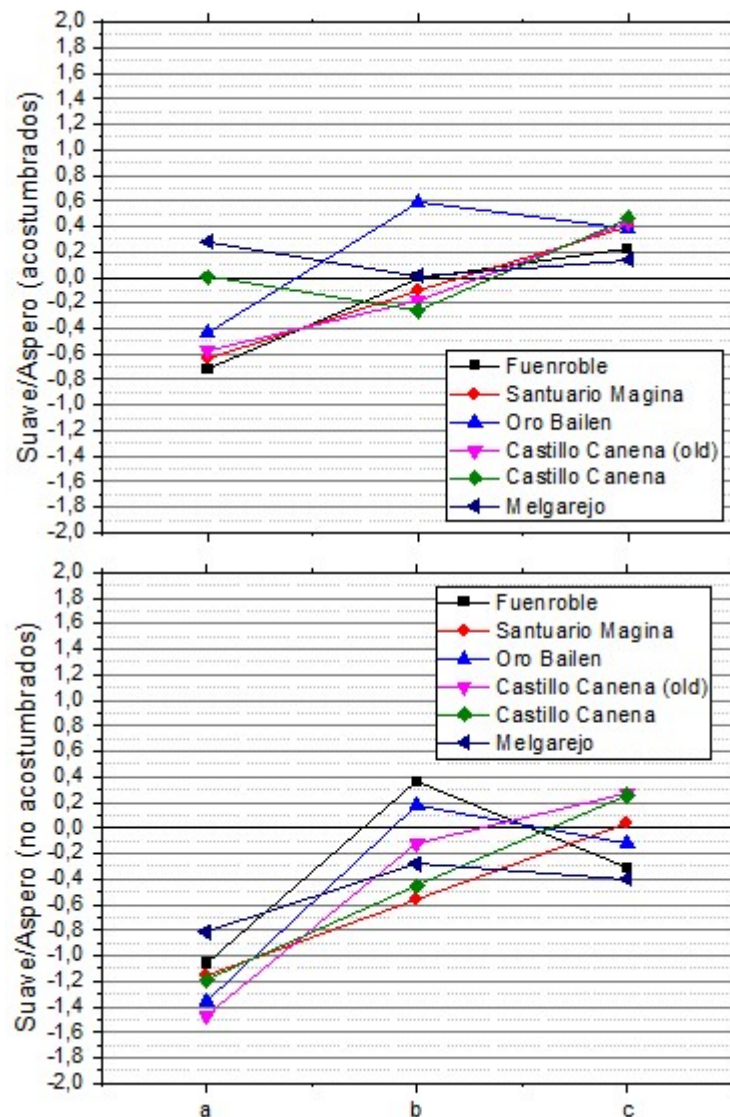
En el grupo de sujetos acostumbrados al uso de AOVE's no se observa una gran variación de esta emoción con la adición de extracto de antioxidantes (Figura 6.11). En cambio, en el caso de los sujetos no acostumbrado la tendencia es decreciente, de modo que los aceites con antioxidantes se valoran como menos picantes que los AOVE's originales (con la excepción del "Melgarejo").

**Figura 6.11**

Resultados promedio (valores z) para la emoción "No picante/Picante" en los sujetos acostumbrados (superior) y no acostumbrados (inferior) al consumo de AOVE's (a: AOVE's puros; b: AOVE's con concentración de luteína de 0,05 mg/ml; c: AOVE's con concentración de luteína de 0,1 mg/ml).

Suave - Áspero

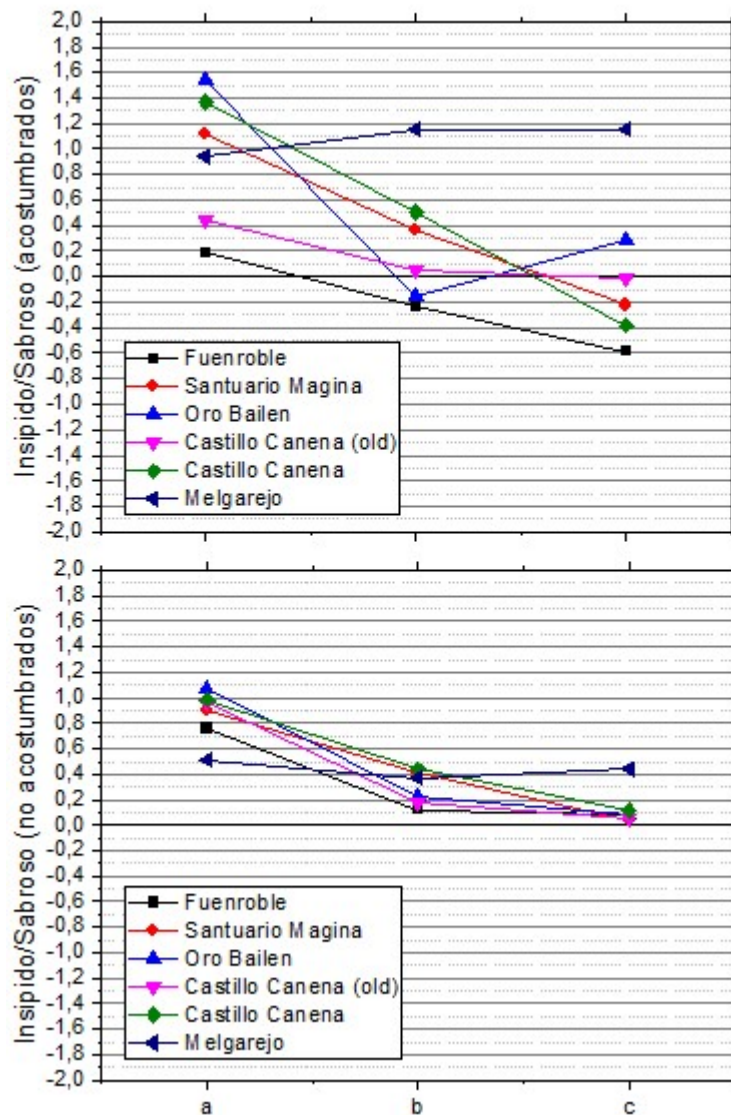
La Figura 6.12 indica que el par de emociones “suave-áspero” en el grupo de sujetos acostumbrados muestra una tendencia creciente con la concentración de extracto de antioxidantes (aunque no se llega a percibir ningún aceite cerca de “muy áspero”), salvo para el aceite “Melgarejo”. Esta tendencia (aceites más ásperos al añadir antioxidante) también se observa, incluso con más intensidad, en los resultados del grupo de observadores “no acostumbrados”. Para el grupo de sujetos no acostumbrados la tendencia es muy similar a la de “dulce-amargo” (Figura 6.6).

**Figura 6.12**

Resultados promedio (valores z) para la emoción “Suave/Áspero” en los sujetos acostumbrados (superior) y no acostumbrados (inferior) al consumo de AOVE's (a: AOVE's puros; b: AOVE's con concentración de luteína de 0,05 mg/ml; c: AOVE's con concentración de luteína de 0,1 mg/ml).

Insípido-Sabroso

En el caso de este par de emociones la tendencia en los dos grupos estudiados es similar (Figura 6.13). Al añadir antioxidantes los aceites se perciben como más insípidos, aunque siempre dentro de una valoración media de alimentos moderadamente sabrosos. Al aumentar la concentración de extracto de antioxidantes la percepción es que el aceite va a ser algo menos sabroso, llegando a considerarse un poco insípido en algunos casos para el grupo de observadores acostumbrados al consumo de AOVE's. En este caso las tendencias son bastante parecidas ya que hay que tener en cuenta que los valores de escalado de ambos grupos en estas dos emociones son distintos (véase Tabla 6.5), en el grupo de acostumbrados los límites extremos oscilan entre $\pm 1,9$ aproximadamente y en el grupo de no acostumbrados estos intervalos son menores.

**Figura 6.13**

Resultados promedio (valores z) para la emoción "Insípido/Sabroso" en los sujetos acostumbrados (superior) y no acostumbrados (inferior) al consumo de AOVE's (a: AOVE's puros; b: AOVE's con concentración de luteína de 0,05 mg/ml; c: AOVE's con concentración de luteína de 0,1 mg/ml).

6.4.- CONCLUSIONES

En primer lugar teniendo en cuenta todos los pares de emociones estudiados existen importantes diferencias entre los grupos de sujetos encuestados. Así, el grupo de "acostumbrados" ha generado mayores correlaciones que el de "no acostumbrados".

Con respecto al par de emociones "aromático-inodoro" e "insípido-sabroso", no hay una variación importante de acuerdo a las opiniones de ambos grupos al añadir el extracto de antioxidantes, es decir, la tendencia en los dos grupos estudiados es similar.

Es importante destacar también, que los pares de "rancio-fresco", "saludable/no saludable" y "gusta/no gusta" tienen tendencias, con respecto al grupo de observadores acostumbrados, semejantes entre ellos. En este sentido resulta bastante curioso el dato de que a los observadores les guste más lo que consideran menos saludable.

Por otro lado, el par "artificial-natural" también está relacionado con el par "gusta-no gusta". De aquí sí se puede asociar algo natural con algo beneficioso, y que por tanto, guste a la población en mayor o menor medida.

Por último, resaltar el caso del aceite "Melgarejo", en el que para la mayoría de los pares de emociones, la tendencia es diferente al del resto de aceites. Así, al añadirle el extracto de antioxidantes, pasa a percibirse por el grupo de población acostumbrada como más fresco, saludable, natural y que gusta.



7. CONCLUSIONES GENERALES

7.- CONCLUSIONES GENERALES

En la presente Tesis Doctoral se ha desarrollado una metodología original para la obtención de un extracto de antioxidantes que contiene luteína procedente de la microalga *Scenedesmus almeriensis* y se ha estudiado su adición al aceite de oliva como medio de incorporación idóneo, para ingerir las cantidades necesarias y prevenir la aparición de ciertas enfermedades degenerativas humanas, que tienen que ver con el déficit en nuestro organismo de este antioxidante.

Como se aprecia en los distintos capítulos, la adición del extracto de antioxidantes procedente de la microalga *Scenedesmus almeriensis* produce cambios significativos en el color, la calidad, la composición y la estabilidad de los AOVE's.

Así, se han podido solubilizar cantidades adecuadas de extracto de antioxidantes en los diferentes AOVE's ensayados y se han estudiado los parámetros físico-químicos de los mismos, prestando especial atención a los cambios de color producidos por la adición del antioxidante como variable de monitorización y estudio. Se ha procedido a adicionar extracto de antioxidantes a diferentes AOVE's, estudiando cómo varían los parámetros colorimétricos a medida que va aumentando la concentración de luteína. En este sentido, se ha utilizado un extracto de luteína de concentración igual a 2,3 mg/ml, y se han realizado sucesivas adiciones de 100 μ l hasta llegar a concentraciones en los aceites de 0,16 mg/ml (174,3 mg luteína/kg aceite), es decir se han alcanzado concentraciones de luteína entre 22 y 87 veces superiores a las que presentan los aceites de oliva no enriquecidos en luteína (2-8 mg luteína/kg aceite).

La adición de extracto de antioxidantes proporciona a los AOVE's un color más amarillento-naranja, debido a la concentración de los pigmentos, principalmente al β -caroteno.

Los resultados obtenidos muestran que enriqueciendo los aceites hasta una concentración de 0,1 mg luteína/ml, se obtienen aceites con propiedades físico-químicas y colorimétricas muy aceptables, que además permiten incorporar al organismo buena parte de la ingesta diaria de luteína recomendada (6 mg), teniendo en cuenta el consumo medio estimado de aceite de oliva por habitante y día para nuestro país (36 ml). De esta forma, se pretende dotar a los AOVE's de un valor añadido superior al que ya de por sí tiene y ofrecer una alternativa diferente a las actuales, en la lucha contra algunas enfermedades degenerativas humanas.



La estabilidad oxidativa ha mejorado notablemente por adición del extracto de *S. almeriensis* y también se ha mejorado la vida útil de los aceites, protegiéndolos frente a los agentes oxidantes.

Se reduce la oxidación de los AOVE's así como la formación de productos de oxidación, mejorando así la calidad de los mismos. El perfil de ácidos grasos no se ve afectado por la adición de extracto, así como el contenido de tocoferoles.

Además, la adición de extracto de antioxidantes es beneficiosa para los AOVE's siendo posible discriminarlos de acuerdo con la cantidad de extracto añadido. A partir de todos los resultados obtenidos se concluye que la adición de 0,1 mg/ml no afecta de forma decisiva a la calidad y a la composición de los AOVE's en comparación a la de 0,05 mg/ml, por lo tanto, la concentración de 0,05 mg de extracto de *S. almeriensis* por ml de aceite de oliva sería una concentración óptima, conservando todas las propiedades y características de los AOVE's originales, mientras que proporciona dosis importantes de compuestos bioactivos y una mayor estabilidad oxidativa.

La posible introducción al mercado de este tipo de antioxidantes en el aceite de oliva aumentaría la ingesta diaria de carotenoides esenciales en la dieta, con la mejora de las propiedades para la salud de los consumidores, ya que confiere importantes activos nutricionales. No obstante, se deben llevar a cabo futuros trabajos para evaluar la estabilidad química de este tipo de AOVE's durante su almacenamiento y utilización en la cocina.

En este sentido, se han llevado a cabo en esta Tesis distintos ensayos para evaluar la estabilidad de este tipo de AOVE's durante el almacenamiento, y se ha estudiado la estabilidad en función de tres variables principales de degradación: el tiempo, la temperatura y la exposición a la luz.

Tras los análisis de tres de los puntos fundamentales que se relacionan con la degradación físico-química de un AOVE (estabilidad frente a la radiación ultravioleta, estabilidad frente a la temperatura y estabilidad frente al tiempo), así como de la estabilidad de AOVE's obtenidos con aceitunas de distinto índice de maduración y variedades de fruto, se llega a la conclusión de que la adición del extracto de antioxidantes procedente del alga *Scenedesmus almeriensis* a las matrices oleosas produce una mejora importante en sus propiedades físico-químicas. Es decir, la

estabilidad de los AOVE's enriquecidos con extracto de antioxidantes mejora con respecto a los de la matriz original sin aditivar.

Una vez realizado el análisis de la estabilidad de los AOVE's enriquecidos con extracto de antioxidantes frente a la temperatura, se obtienen resultados que podrían ser muy beneficiosos, multiplicando la vida útil de los AOVE's en algunos casos, siendo una de las matrices más adecuadas para adicionar extracto el AOVE de la variedad "Picual", mientras que el de la variedad "Frantoio" ha mostrado una mayor degradación. A pesar de que aumenta la vida útil del aceite control frente a la temperatura, su degradación sigue siendo rápida en relación a otros AOVE's.

Los resultados obtenidos son muy positivos, ya que la adición del extracto de antioxidantes a los AOVE's aumentaría la vida útil de los mismos, además de incorporar a nuestra dieta una gran cantidad de antioxidantes beneficiosos para nuestra salud (lo que permite la prevención de la DMAE, entre otras cosas) sin tener que alterar nuestros hábitos de consumo, ya que estarían incorporados en el propio AOVE, tanto para consumo en crudo (prolongando el tiempo de conservación de un AOVE para que no se degrade), como para su uso en cocina (multiplicando la vida útil de los AOVE's en la fritura).

Respecto a las emociones y preferencias de color, los ensayos realizados muestran diferencias importantes entre los grupos encuestados "acostumbrados" y "no acostumbrados". Como era de esperar, el color de los aceites influye en la apreciación de los mismos y depende fuertemente de los pares de emociones que se tengan en cuenta en cada momento.

En esta Tesis Doctoral también se concluye que la microalga *S. almeriensis* es una buena fuente de compuestos bioactivos y podría ser explotada para la extracción de carotenoides para su incorporación en diferentes productos alimentarios o para ser incluida en complementos alimentarios.

Finalmente, es importante resaltar la aplicabilidad de los resultados obtenidos, la cual produciría una línea de AOVE's enriquecidos con nuevos antioxidantes que vendría a sumar, tanto en estrategias de lucha contra enfermedades degenerativas humanas, así como en el desarrollo del tejido industrial y social de nuestro entorno. Se pretende dotar al AOVE de un valor añadido superior al que ya de por sí tiene y ofrecer una alternativa diferente a las que existen en la actualidad, en la lucha contra la DMAE.





8. BIBLIOGRAFÍA

8.- BIBLIOGRAFÍA

A

- Achir, N., Randrianatoandro, V.A., Bohuon, P., Laffargue, A. y Avallone, S. (2010). Kinetic study of β -carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 349-361.
- Ación, F.G., Brindley, C., García-Malea, M.C., Fernández-Sevilla, J.M., Ibáñez, M.J., Núñez, R. y Molina, E. (2003). Assessment of the production of ^{13}C labeled compounds from phototrophic microalgae at laboratory scale. *Biomolecular Engineering*, 20, 149-162.
- Ación, F.G, González-López, C.V., Fernández-Sevilla, J.M. y Molina, E. (2012a). Conversion of CO_2 into biomass by microalgae: How realistic a contribution may it be to significant CO_2 removal? (Review). *Appl Microbiol Biotechnol*, 96, 577-586.
- Ación, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., Magán, J.J. y Molina-Grima, E. (2012b). Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances*, 30, 1344-1353.
- Ación, F.G., García, F., Sánchez, J.A., Fernández-Sevilla, J.M. y Molina, E. (1998). Modeling of biomass productivity in tubular photobioreactors for microalgal cultures: Effects of dilution rate, tube diameter, and solar irradiance. *Biotechnology and Bioengineering*, 58, 605-616.
- Agramont, A., Llinas, M., López-Sabater, C., Boatella, J. y De la Torre, M.C. (1986). Evolution de la teneur en tocopherol et en tocotrienol pendant le murissage des olives. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 70, 419.
- Aguilera, M.P. (2006). Influencia de las condiciones de batido de la pasta en los compuestos volátiles de oxidación del aceite de oliva virgen. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén.
- Alam, A.U., Couch, J.R. y Creger, C. (1968). The carotenoids of the marigold, *Tagetes erecta*. *Can. J. Bot.*, 46, 1539-1541.
- Alba, J., Izquierdo, J.R. y Gutiérrez, F. (1997). Aceite de oliva virgen. Análisis sensorial. *Agrícola Española*, S.A. Madrid.
- Alonso, V. y Aparicio, R. (1993). Characterization of European virgin olive oils using fatty acids. *Grasas y Aceites*, 44, 18-24.
- Álvaro, L., Moreira, H., Lillo, J. y Franklin, A. (2015). Color preference in red-green dichromats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*, 112, 9316-9321. DOI:10.1073/pnas.1502104112.
- Andrewes, P., Busch, J., De Joode, T., Groenewegen, A. y Alexandre, H. (2003). Sensory properties of virgin olive oil polyphenols: identification of Deacetoxy-

ligstroside aglicon as a key contributor to pungency. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51, 1415-1420.

- Angerosa, F. (2003). Calidad sensorial de los aceites de oliva. En Aparicio R., Hardwood, J. Manual del aceite de oliva. *Ed. Mundi-Prensa*. Madrid, 345-380.
- Aparicio, R. y Harwood, J. (2003). Manual del aceite de oliva. A. Madrid. *Vicente Ediciones Mundi-Prensa*. Madrid.
- Aparicio, R., Roda, L., Albi, M.A. y Gutiérrez, F. (1999). Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4150-4155.
- Aparicio-Ruiz, R., Mínguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B. (2011). Thermal degradation kinetics of lutein, β -carotene and β -cryptoxantin. *Journal of food Composition and analysis*, 24 (6), 811-820.
- Apt, K.E. y Behrens, P.W. (1999). Commercial development in microalgal biotechnology. *J. Phycol.*, 35, 215-226.
- Arad, S. y Yaron, A. (1992). Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetics. *Trends Food Sci. Technol*, 3, 92-97.
- Arthur, R. (2009). Omega-3 sources. *Journal of Complementary Medicine*, 8, 28-32.
- Aslan, S. y Kapdan, I.K. (2006). Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. *Ecological Engineering*, 28, 64-70.
- Astorg, P. (1997). Food carotenoids and cancer prevention: an overview of current research. *Trends Food Sci. Tech.*, 8, 406-413.

B

- Baeten, V., Dardenne, P. y Aparicio, R. (2001). Interpretation of Fourier Transform Raman Spectra of the unsaponifiable matter in a selection of edible oils. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5098-5107.
- Bajpai, P. y Bajpai, P.K. (1993). Eicosapentaenoic acid (EPA) production from microorganism: a review. *J. Biotechnol.*, 30, 161-183.
- Barbarino, E. y Lourenco, S.O. (2005). An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, 17, 447-460.
- Bays, H.E. y Dujovne, C.A. (1993). Antioxidant in the treatment and prevention of atherosclerotic cardiovascular disease. *Clínica e Investigación. Arteriosclerosis*, 42, 498-506.
- Becker, W. (2004). Microalgae in human and animal nutrition. En: Richmond, A. (ed). *Handbook of microalgal culture*. Blackwell, Oxford, 312-351.



- Beltrán, G., Aguilera, M.P., Del Río, C., Sánchez, S. y Martínez, L. (2005). Influence of fruit ripening on the natural antioxidant content of Hojiblanca virgin olive oils. *Food Chemistry*, 89, 207-215.
- Bendich, A. (1989). Symposium conclusions: Biological actions of carotenoids. *J. Nutr.*, 119, 135-136.
- Benemann, J.R., Weissmann, J.C., Koopman, B.L. y Oswald, W.J. (1977). Energy production by microbial photosynthesis. *Nature*, 268, 19-23.
- Berenguer, M.J., Gracia, M.S. y Espada, J.L. (2006). Calidad del aceite de oliva cv. Arbequina bajo suministro variable de riego en Aragón. *Actas XIX Congreso Nacional de Riegos*. Zaragoza. 61-63.
- Birren, F. (1978). Color and human response: Aspects of light and color bearing on the reactions of living things and the welfare of human beings. *New York*.
- Blinkova, L.P., Gorobets, O.B. y Batur, A.P. (2001). Biological activity of *Spirulina*. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2, 114-118.
- Block, G., Patterson, B. y Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, 18, 1-29.
- Böhm, F., Tinkler, J.H. y Truscott, T.G. (1995). Carotenoids protect against cell membrane damage by the nitrogen dioxide radical. *Nature Med.*, 1, 98-99.
- Borowitzka, M.A. (1988). Vitamins and Fine Chemicals from Microalgae, en *Microalgal Biotechnology*, Borowitzka and Borowitzka (Eds.). *Cambridge University Press*. Cambridge. 153-196.
- Boskou, D. (1996). Olive oil composition. En: *Olive oil chemistry and technology*. Ed. *AOCS Press*. Champaign. Illinois.
- Bosma, T.L., Dole, J.M. y Maness, N.O. (2003). Optimizing Marigold (*Tagetes erecta L.*) petal and pigment yield. *Crop Science*, 43, 1897-1898.
- Botia J.M, Ortuño, A., Benavente-García, O., Frias, J., Marcos, D. y Del Río, J.A. (2001). Modulation of biosynthesis of some phenolic compounds in *Olea europaea L.* fruits: Their influence on olive oil quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 49, 355-358.
- Brennan, L. y Owende, P. (2010). Biofuels from microalgae - A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14, 557-577.
- Britton, G. (1995). Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 9, 1551-1558.
- Britton, G. y Hornero-Mendez, D. (1997). Carotenoids and colour in fruit and vegetables. En: *Phytochemistry of Fruit and Vegetables* (editores Tomás-Barberán, F.A., Robins, R.J.). *Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, Oxford Science Carotenoides*, 11-25.



- Brown, M.R., Mular, M., Miller, I., Farmer, C. y Trenerry, C. (1999). The vitamin content of microalgae used in aquaculture. *Journal of Applied Phycology*, 11, 247-255.
- Brune, D.E., Lundquist, T.J. y Benemann, J.R. (2009). Microalgal biomass for greenhouse gas reductions: Potencial for replacement of fossil fuel and animal feeds. *Journal of Environmental Engineering*, 135, 1136-1144.
- Bruton, T., Lyons, H., Lerat, Y., Stanley, M. y Borasmussen, M. (2009). A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland. *Sustainable Energy Ireland*.

C

- Cadoret, J.P. y Bernard, O. (2008). La production de biocarburant lipidique avec des microalgues: promesses et défis. *Journal de la Societe de Biologie*, 202, 201-211.
- Calvo, C., Salvador, A., y Fizman, S.M. (2001). Influence of colour intensity on the perception of colour and sweetness in various fruit and flavoured yoghurts. *European Food Research and Technology*, 213, 99-103.
- Camacho, F.G., Rodríguez, J.G., Mirón, A.S., García, M.C., Belarbi, E.H., Chisti, Y., et al. (2007). Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnology Advances*, 25, 176-194.
- Camgöz, N., Yener, C. y Güvenç, D. (2002). Effects of hue, saturation, and brightness on preference. *Color Research and Application*, 27 (3), 199-207.
- Capella, P., Fedeli, E., Bonaga, G. y Lerker, G. (1997). Manuale degli oli e dei grassi. Tecniche Nuove. Milano (Italy).
- Carlsson, D.J., Suprunchuk, T. y Wiles, H.M. (1976). Photooxidation of unsaturated oils. Effects of singlet oxygen quenchers. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 53, 656.
- Carrasco Pancorbo, A. (2006). Determinación de compuestos fenólicos en aceites de oliva mediante técnicas y metodologías separativas avanzadas. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- Carrasco, A., García, R., Zarrouk, W. y Fernández, A. (2010). El aceite de oliva virgen: Tesoro de Andalucía. Capítulo 8: Calidad sensorial del aceite de oliva. ISBN: 978-84-92526-30-7.
- Caselli, S., Modi, G.; Nizzi, F. y Fiorino, P. (1993). Variabilidad de la composición en ácidos grasos, en esteroides y en alcoholes del aceite de oliva de cultivares de la Toscana. *Olivae*, 47, 46-51.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2013). State Indicator Report on Fruits and Vegetables 2013 from the Division of Nutrition, Physical Activity, and Obesity of the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion.
- CEE. (1991). Características de los aceites de oliva y de los aceites de orujo de oliva y métodos de análisis. Reglamento 2568/91. DOCE.



- Cerón, M.C., Campos, I., Sánchez, J.F., Acién, F.G., Molina, E. y Fernández-Sevilla, J.M. (2008). Recovery of lutein from microalgae biomass: Development of a process for *Scenedesmus almeriensis* biomass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11761-11766.
- Cerretani, L., Bendini, A., Rodríguez-Estrada, M.T., Vittadini, E., y Chiavaro, E. (2009). Microwave heating of different commercial categories of olive oil: Part I. Effect on chemical oxidative stability indices and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 115, 1381-1388.
- Certik, M. y Shimizu, S. (1999). Biosynthesis and regulation of microbial polyunsaturated fatty acid production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 87, 1-14.
- Chang, E.H. y Yang, S.S. (2003). Some characteristics of microalgae isolated in Taiwan for biofixation of carbon dioxide. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 44, 43-52.
- Chao, J.C.J., Huang, C.-H., Wu, S.-J., Yang, S.C., Chang, N.-C., Shieh, M.-J. y Lo, P.N. (2002). Effects of β -carotene, Vitamin C and E on antioxidant status in hyperlipidemic smokers. *J. Nutr. Biochem*, 13, 427-434.
- Child, I.L., Hansen, J.A. y Hornbeck, F.W. (1968). Age and sex differences in children's color preferences. *Child Dev*, 39, 237-247.
- Chisti, Y. (2007). Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances*, 25, 294-306.
- Chisti, Y. (2008). Biodiesel from microalgae beats bioethanol. *Trends in Biotechnology*, 26, 126-131.
- Choungorian, A. (1968). Color preference and cultural variation. *Perceptual and Motor Skills*, 26, 1203-1206.
- Cichelli, A. y Pertesana, G.P. (2004). High-performance liquid chromatography analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils: Chemometric approach to variety classification. *Journal of Chromatography A*, 1046, 141-146.
- CIE Publication 15, (2004). Colorimetry, third ed. Central Bureau of the International Commission on Illumination, Vienna.
- Civantos, L. (2009). La maduración de las aceitunas. En Algunas contribuciones sobre Olivicultura y Elaiotécnia desde la perspectiva de la experiencia. Vilar, J. Ed. *Gea Wesfalia Separator Andalucía*, S.L.
- Civantos, L., Contreras, R., Grana, R. (1999). Obtención del aceite de oliva virgen. 2ª Ed. *Editorial Agrícola Española*. Madrid.
- Codoceo, R. y Muñoz, R.A. (1999). Vitaminas liposolubles: vitaminas A, E y K, en Hernández M.; Sastre, A. Ed. *Tratado de Nutrición*. Díaz de Santos. Madrid, 177-202.
- Cohen, D., Finkel, A. y Sussman, M. (1976). On the role of algae in larviculture of *Macrobrachium rosenbergii*. *Aquaculture*, 8, 199-207.



- Cohn, J. (1984). Experimentelle untersuchungen über die Gefühlston und der Farben, Helligkeiten, und ihrer combination. *Philosophische Studien*, 10, 562-603.
- Commission Implementing Regulation (EU), nº 299/2013: amending Regulation (EEC) nº 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. Official Journal of the European Union.
- Commission Regulation (1991). (EEC) nº 2568/91: on the characteristics of olive oil and olive-pomace oil and on the relevant methods of analysis. *Official Journal of European Union*, L248, 1-82.
- Consejería de Agricultura y Pesca. Reglamento de la Denominación de Origen “Baena” y su Consejo Regulador. Orden de 28/12/1965, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla. BOJA 7, 18-1-1966.
- Consejería de Agricultura y Pesca. Reglamento de la Denominación de Origen “Sierra de Segura” y su Consejo Regulador. Orden de 23/04/1993, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla. BOJA 62, 12-6-1993.
- Consejería de Agricultura y Pesca. Reglamento de la Denominación de Origen “Priego de Córdoba” y su Consejo Regulador. Orden de 29/11/1995, Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla. BOJA 158, 14-12-1995.
- Consejo Oleícola Internacional. COI. (1987). Valoración organoléptica del aceite de oliva virgen. T-20. COI: Análisis Sensorial: Vocabulario General Básico. COI/T. 20/DOC. nº4. In.; 1987.
- Consejo Oleícola Internacional. COI. (2011). <http://www.internationaloliveoil.org/modules/search>.
- Costa, J.A.V. y De Morais, M.G. (2011). The role of biochemical engineering in the production of biofuels from microalgae. *Bioresource Technology*, 102, 2-9.
- Crozier, W.R. (1999). The meanings of colour: preferences among hues. *Pigment & Resin Technology*, 28, 6-14.
- Cysewski, G.R. y Todd Lorenz, R. (2004). En: “Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products. Major industrial species. Richmond, A. (Ed) *Handbook of microalgal culture*. Blackwell, Oxford. 281-288.

D

- De-Bashan, L.E. y Bashan, Y. (2010). Inmovilized microalgae for removing pollutants: Review of practical aspects. *Bioresource Technology*, 101, 1611-1627.
- De la Noue, J. y De Pauw, N. (1998). The potencial of microalgal biotechnology: a review of production and uses of microalgae. *Biotech. Adv.*, 6, 725-770.
- De Torres Sánchez, A. (2013). Influencia de los factores tecnológicos en la calidad y en el contenido en antioxidantes del aceite de oliva virgen. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén.



- Del Campo, J.A., Moreno, J., Rodríguez, H., Vargas, M.A., Rivas, J. y García-Guerrero, M. (2000). Carotenoid content of chlorophycean microalgae: Factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. *Journal of Biotechnology*, 76, 51-59.
- Del Campo, J.A., Rodríguez, H., Moreno, J., Vargas, M.A., Rivas, J. y Guerrero, M.G. (2001). Lutein production by *Muriellopsis* sp. in an outdoor tubular photobioreactor. *J. Biotechnol*, 85, 289-295.
- Delgado-Vargas, F., Jiménez, A.R. y Paredes-López, O. (2000). Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40, 173-289.
- Delgado-Vargas, F. y Paredes-López, O. (1997). Effects of enzymatic treatments on carotenoid extraction from marigold flowers (*Tagetes erecta*). *Food Chemistry*, 58 (3), March, 255-258.
- Delgado-Vargas, F. y Paredes-López, O. (2003). Natural colorants for food and nutraceutical uses. CRC Press. ISBN 1-58716-076-5.
- Demming-Adams, B. y Adams, W.W. III. (2002). Antioxidants in Photosynthesis and Human Nutrition. *Science*, 298, 2149-2153.
- Deng, R. y Chow, T.J. (2010). Hypolipidemic, antioxidant, and antiinflammatory activities of microalgae *Spirulina*. *Cardiovascular Therapeutics*, 28, 33-45.
- Derner, R.B., Ohse, S., Villela, M., De Carvalho, S.M. y Fett, R. (2006). Microalgae, products and applications. *Ciencia Rural*, 36, 1678-4596.
- Di Giovachino, L., Angerosa, F. y Di Giacinto, L. (1996). Effect of mixing leaves with olives on organoleptic quality of oil obtained by centrifugation. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 73(3), 371-374.
- Dionisi, F., Amelotti, G. y Cert, A. (1992). Recenti acquisizioni per la valutazione delle caratteristiche di qualità dell'olio extravergine di olive. *Olive oil quality*, Florencia, 209-214.
- Dorcus, R.N. (1926). Colour preferences and colour associations. *J Genet Psychol.*, 33, 399-434.
- Durand-Chastel, H. (1980). Production and use of Spirulina in México. In: Shelef, G. y Soeder, C.J. (Eds) *Algae Biomass*. Elsevier/North Holland Biomedical Press. Amsterdam, 51-54.
- Duyn, M.A.S.V. y Pivonka, E. (2000). Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: selected literature. *Journal of the American Dietetic Association*, 100, 1511-1521.
- Dwyer, J.H., Navab, M., Dwyer, K.M, Hassan, K., Sun, P., Shircore, A., Hama-Levy, S., Hough, G., Wang, X., Drake, T, Merz, N.B. y Fogelman A.M. (2001). Oxygenated carotenoid lutein and the progression of early atherosclerosis. The Los Angeles atherosclerosis study. *Circulation*, 103, 2922-2927.



E

- Endo, Y., Usuki, K. y Kaneda, T. (1984). Antioxidant effects of chlorophylls and their decomposition products on the photooxidation of methyl linoleate. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 61, 718.
- Esterbauer, H., Jurgens, D., Quehenberger, O. y Koller E. (1987). Autoxidation of human low density lipoprotein: loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes. *The Journal of Lipid Research*, 28, 495-509.
- European Food Information Council (EUFIC). (2012). EUFIC Review. Fruit and vegetable consumption in Europe – do Europeans get enough? Available at: <http://www.eufic.org/article/en/expid/Fruit-vegetable-consumption-Europe/>
- European Patent. (2006). Composition comprising olive oil enriched and supplemented with lutein, WO 2006117826 (A2). Application number: WO2006IT00304 20060502.
- Eysenck, H.J. (1941). A critical and experimental study of color preferences. *J. Am Psychol.*, 54, 385-391.

F

- Fairchild, M.D. (2005). Color appearance models. 2nd Edition, *John Wiley & Sons Inc.* England.
- Fairchild, M.D. y Melgosa, M. (2012). La tienda de las curiosidades sobre el color, Editorial: Universidad de Granada (ISBN: 978-84-338-5382-0).
- Fakourelis, N., Lee, E.C. y Min, D.B. (1987). Effects of chlorophyll and β -carotene on the oxidation stability of olive oil. *Journal of Food Science*, 52, 234.
- Fedeli, E. (1996). Tecnología de producción y de conservación del aceite; en *Enciclopedia Mundial del Olivo*, I ed. COI ed. *Plaza & Janés Editores S. A.* Barcelona, 253-294.
- Fernández-Sevilla, J.M., Ación-Fernández, F.G. y Molina Grima, E. (2010). Biotechnological production of lutein and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(1), 27-40.
- Fiorino, P. (1996). Técnicas agronómicas y características del aceite de oliva, en *Enciclopedia Mundial del Olivo*, I ed. COI ed. *Plaza & Janés Editores S.A.* Barcelona, 197-222.
- Fiorino, P. y Nizzi, F. (1991). Maturazione delle olive e variazioni di alcuni componente dell'olio. *Olivae*, 35, 25-33.
- Fitó, M. (2003). Efectos antioxidantes del aceite de oliva y de sus compuestos fenólicos. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona.



- Food and Nutrition Board, Institute of Medicine. (2000). Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Washington, D.C.: *National Academy Press*.
- Fujimura, T. y Okamoto, H. (1972). Notes on progress made in developing a mass culturing technique for *Macrobrachium rosenbergii* in Hawaii. En: Coastal Aquaculture in the Indo-Pacific Region. T.V.R. Pillay, Surrey: *Fishing News Books Ltd.* (Ed.), 313-327.

G

- Galoppini, C. y Fiorentini, R. (1991). Lavorazione delle olive e qualità dell'olio. Giornata di studio sulla "Definizione di qualità per l'olio di oiva, *Spoleto*, 21-28.
- Gandul-Rojas, B. y Mínguez-Mosquera, M.I. (1996a). Chlorophyll and carotenoid composition in virgin olive oils from various Spanish olive varieties. *J. Sci. Food Agric*, 72, 31-39.
- Gandul-Rojas, B. y Mínguez-Mosquera, M.I. (1996b). Chlorophyllase activity in olive fruits and its relationship with the loss of chlorophyll pigments in the fruits and oils. *J. Sci. Food Agric*, 72, 291-294.
- Gandul-Rojas, B. y Mínguez-Mosquera, M.I. (1999). Chlorophyll and pattern in virgin olive oil. Adulteration control. *1st International Congress on Pigments in Food Technology*, Sevilla, 381-385.
- García-González, M., Moreno, J., Manzano, J.C., Florencio, F.J. y García-Guerrero, M.G. (2005). Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, 115, 81-90.
- Garrido, J., Gandul, B., Gallardo, L. y Mínguez, M.I. (1990a). Pigmentos clorofílicos y carotenoides responsables del color en el aceite de oliva virgen. *Grasas y Aceites*, 41(6), 404-409.
- Garrido, J., Gandul, B., Gallardo, L., Mínguez, M.I. y Pereda, J. (1990b). Composición clorofílica y carotenoide del aceite de oliva virgen. Valor en provitamina A. *Grasas y Aceites*, 41(6), 410-417.
- Garth, T.R. (1922). The Color Preferences of Five Hundred and Fifty-Nine Full-Blood Indians. *Journal of Experimental Psychology*, 5(6), 392-418.
- Garth, T.R. (1924). A Color Preference Scale for One Thousand White Children. *Journal of Experimental Psychology*, 7(3), 233-241.
- Gaziano, J.M., Manson, J.E., Branch, L.G., Colditz, G.A., Willett, W.C. y Buring, J.E. (1995). A prospective study of consumption of carotenoids in fruits and vegetables and decreased cardiovascular mortality in the elderly. *Annals of Epidemiology*, 5, 255-260.
- Gerald, F. y Combs, J.R. (1992). The vitamins fundamental aspects in nutrition and health. *Academic Press Inc.* San Diego. (California).



- Gimeno, E. (2004). Compuestos fenólicos: Un análisis de sus beneficios para la salud. *Ámbito Farmacéutico. Nutrición*, 23, 80-84. Nº 6.
- Giuffrida, D., Salvo, F., Salvo, A., La Pera, L. y Dugo, G. (2007). Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various Sicilian olive varieties. *Food Chemistry*, 101, 833-837.
- Gómez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., y Lercker, G. (2007). Effect of filtration systems on the phenolic content in virgin olive oil by HPLC-DAD-MSD. *American Journal of Food Technology*, 2, 671-678.
- Gómez-Rico, A., Salvador, M.D. y Fregapane, G. (2009). Virgin olive oil and olive fruit minor constituents as affected by irrigation management base don SWP and TDF as compared to ETc in médium-density Young olive orchards (*Olea europaea L. cv. Cornicabra* and *Morisca*). *Food Research International*, 42, 1067-1076.
- Gómez-Rico, A., Salvador, M.D., Moriana, A., Pérez, D., Olmedilla N., Rivas, F. y Fregapane, G. (2007). Influence of different irrigation in strategies in a traditional Cornicabra cv. Olive orchard on virgin olive oil composition and quality. *Food Chemistry*, 100, 568-578.
- Gómez-Robledo, L. (2011). Aportaciones colorimétricas a la caracterización y mejora de aceites de oliva virgen. Tesis Doctoral. Universidad de Granada.
- González Cárdenas, Y.A. (2010). Caracterización química del color de diferentes variedades de guayaba (*Psidium guajava L.*) colombiana. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Colombia.
- González, C.V., Acién, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., Sánchez, J.F., Cerón, M.C. y Molina, E. (2009). Utilization of the cyanobacteria *Anabaena sp.* ATCC 33047 in CO₂ removal processes. *Bioresource Technology*, 100, 5904-5910.
- Goodwin, T.W. (1965). Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. *Academic Press Inc.*, London, Great Britain.
- Graell, J., Arbós, J., Duró, V., Clota, J., Torrelles, R., Ciria, R., Puig, J. y Munté M. (1992). Calidad del aceite de oliva virgen "D.O: Borjas Blancas". Influencia del proceso de extracción. II Salón Industrial Oleícola SIO'92, Reus, Tarragona.
- Granado, F., Herrero-Barbudo, C., Acién-Fernández, G., Molina-Grima, E., Fernández-Sevilla, J. M., Pérez-Sacristán, B., et al. (2009). In vitro bioaccessibility of lutein and zeaxanthin from the microalgae *Scenedesmus almeriensis*. *Food Chemistry*, 114, 747-752.
- Granado, F., López-López, I., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Cofrades, S., Pérez-Sacristán, B. y Delgado-Pando, G. (2010). Lutein-enriched frahkfurter-type products: physicochemical characteristics and lutein in vitro bioaccessibility, *Food Chemistry*, 120, 741-748.
- Granado, F., Olmedilla, B., y Blanco, I. (2003). Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *British Journal of Nutrition*, 90, 487-502.



- Grundy, S.M., Florentin, L., Nix, D. y Whelan, M.F. (1988). Comparison of monounsaturated fatty acids and carbohydrates for reducing raised levels of plasma cholesterol in man. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 47, 965-969.
- Gucci, R., Servili, M. y Esposito, S. (2004). Oil quality of olive cv "Leccino" grown under irrigation of dry-farmer conditions. *Acta Horticulturae*, 664, 297-302
- Gudin, C. y Thepenier, C. (1986). Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. *Advances in Biotechnological Processes*, 6, 73-110.
- Gustafson, K. (1989). Microalgae as a source of nutraceuticals. *Journal of the National Cancer Institute*, 2, 1254.
- Gutfinger, T. (1981). Polyphenols in olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 68, 966-968.
- Gutiérrez, F., Perdiguero, S., Gutiérrez R. y Olías, J.M. (1992). Evaluation of the bitter taste in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 69, 394.
- Gutiérrez, R. y Gutiérrez, F. (1986). Método rápido para definir y clasificar el color de los aceites de oliva vírgenes. *Grasas y Aceites*, 37, 282-284.
- Gutiérrez, R., Janer, C., Janer, M.L., Gutiérrez F. y Vázquez, A. (1977). Relación entre los polifenoles y la calidad y estabilidad del aceite de oliva virgen. *Grasas y Aceites*, 28, 101.
- Guzmán, S., Gato, A. y Calleja, J.M. (2001). Antiinflammatory, analgesic and free radical scavenging activities of the marine microalgae *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytotherapy Research*, 15, 224-230.

H

- Hameed, A.M.S. (2007). Effect of algal density in bead, bead size and bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Journal of Biotechnology*, 6, 1185-1191.
- Harder, R. y Von Witsch, V. (1942). Über Massenkultur Von Diatomeen. *Ber. Bot Ges.* 60, 142.
- Heber, D. y Lu, Q.Y. (2002). Overview of mechanisms of action of lycopene. *Exp. Biol. Med.* 227, 920-923.
- Henrikson, R. (1994). Microalga *Spirulina*. *Ediciones Urano*, ISBN: 84-7953-047-2.
- Heras, H., Kean-Howie, J. y Ackman, R.G. (1994). The potential use of lipid microspheres as nutritional supplements for adult *Ostrea edulis*. *Aquaculture*. 123, (3-4), 309-322.



- Hermoso, M., Uceda, M., Frías, L. y Beltrán, G. (1999). Maduración en El cultivo del olivo, 3 ed. (Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L., ed.) *Mundi Prensa*, Consejería de Agricultura y Pesca (Junta de Andalucía), Madrid.
- Hernández, J.P., De-Bashan, L.E. y Bashan, Y. (2006). Starvation enhances phosphorus removal from wastewater by the microalga *Chlorella spp.* co-immobilized with *Azospirillum brasilense*. *Enzyme Microbial Technology*, 38, 190-198.
- Hidalgo, F., Navas, M.A., Guinda, A., Ruíz, M.A., León, M., Lanzón, A., Maestro, R., Janer del Valle, M.L., Pérez, M.C., Cert, A., Alba J., Gutiérrez F., Dobarganes, M.C. y Graciani, E. (1993). La calidad del aceite de oliva virgen: Posibles nuevos criterios para su evaluación. *Grasas y Aceites*, 44(1), 10-17.
- Hoffmann, J.P. (1998). Wastewater treatment with suspended and non-suspended algae. *Journal of Phycology*, 34, 757-763.
- Hosikian, A., Halim, R., Lim, S. y Danquah, M.K. (2010). Chlorophyll Extraction from Microalgae: A Review on the Process Engineering Aspects. *International Journal of Chemical Engineering*, art.nº 391632.
- Humanes, J. y Civantos, M. (1992). Producción de aceite de oliva de calidad. Influencia en el cultivo. Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Huntley, M.E. y Redalje, D.G. (2007). CO₂ mitigation and renewable oil from photosynthetic microbes: A new appraisal. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 12, 573-608.

I

- Interesse, F.S., Ruggiero, P. y Vitagliano, M. (1971). Autoxidation of olive oil. Effects of chlorophyll pigments. *Agrarian Industry*, 9, 318.
- International Olive Council (IOC). (2013a) World Olive Oil Figures – Production. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>.
- International Olive Council (IOC). (2013b) World Olive Oil Figures – Consumption. <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>.
- Isler, O. (1971). Carotenoids. Stuttgart: *Birkhäuser Verlag Basel*.
- ISO 6885. (2006). Animal and vegetable fats and oils - Determination of Anisidine Value.
- ISO 9936. (2006). Animal and vegetable fats and oils - Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography.
- ISO/CIE. (2014). ISO/CIE 11664-6: 2014 (former CIE S 014-6/E: 2013). Joint ISO/CIE Standard: Colorimetry — Part 6: CIEDE2000 Colour-Difference Formula. Vienna, CIE Central Bureau.



J

- Jacoboni, A., Pinnol, M. y Baltadori, A. (1999). The production of *Olea europaea* L. in Viterbo in relation to the climatological factors. *Acta Horticulturae*, 474, 229-232.
- Jialal, I., Norkus, E.P., Cristol, L., Grundy, S.M. (1991). β -carotene inhibits the oxidative modification of low density lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 1086, 134-138.
- Johnson, A., Johnson, O. y Baksh, M. (1986). The Colors of Emotions in Machiguenga. *American Anthropologist*, 88(3), 674-681.
- Johnson, E.A. y Schroeder, W.A. (1995). Microbial carotenoids. (Ed.: A.Fiechter). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 53, 119-178.
- Johnson-Down, L., Saudny, H. y Gray-Donald, K. (2002). Food habits of Canadians: Lutein and lycopene Intake in the Canadian Population. *Journal of the American Dietetic Association*, 102(7), 988-991.
- Jones, D.A., Kurmaly, K. y Arshard, A. (1987). Penaeid shrimp hatchery trials using microencapsulated diets. *Aquaculture*, 64(2), 133-146.
- Jong-Yuh, C. y Mei-Fen, S. (2005). Potential hypoglycemic effects of *Chlorella* in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sciences*, 77, 980-990.

K

- Kanazawa, A., Teshima, S.I. y Sakamoto, M. (1985). Effects of dietary lipids, fatty acids and phospholipids on growth and survival of prawn (*Penaeus japonicus*) larvae. *Aquaculture*, 50, 39-49.
- Kijlstra, A., Tian, Y., Kelly, E. y Berendschot, T. (2012). Lutein: more than just a filter for blue light. *Progress in Retinal and Eye Research*, 31, 303-315.
- Kimmons, J., Gillespie, C., Seymour, J., Serdula, M. y Blanck, H.M. (2009). Fruit and vegetable intake among adolescents and adults in the United States: Percentage meeting individualized recommendations. *The Medscape Journal of Medicine*, 11, 26.
- Kiritsakis, A. (1980). The effect of light on the oxidative deterioration of olive oil. Proc. Int. Congr. Biol. Value Olive Oil. Chanea. Greece. Sep, 8-12.
- Kiritsakis, A. y Osman, M. (1995). Efectos del β -caroteno y del α -tocoferol en la estabilidad del aceite de oliva. *Olivae*, 56, 25-28.
- Kishimoto, M., Okamura, T., Nagashima, H., Minowa, T., Yokohama, S. y Yamabei, K. (1994). CO₂ fixation and oil production using microalgae. *Journal of Fermentation Bioengineering*, 78, 479-482.



- Knauer, J. y Southgate, P.C. (1999). A review of the nutritional requirements of bivalves and the development of alternative and artificial diets for bivalve aquaculture. *Reviews in Fisheries Science*, 7, 241-280.
- Konica Minolta. (2007). Precise color communication. 9242-4830-92.
- Koptera, Z.P. (1970). *Microbiologiya Zhurnal* (Kiev), 32, 355-360.
- Krinsky, N.I. (1989). Carotenoids and cancer in animal models. *J.Nutr.*, 119, 123-126.
- Krinsky, N.I. y Johnson, E.J. (2005). Review Carotenoid actions and their relation to health and disease. *Molecular Aspects of Medicine*, 26, 459-516.
- Krinsky, N.I., Landrum, J.T. y Bone, R.A. (2003). Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Ann. Rev. Nutr.*, 23, 171-201.
- Kuehni, R.G. (1990). Industrial color-difference: progress and problems. *Color Res. Appl.*, 15, 261-265.
- Kwallek, N., Lewis, C.M., Lin-Hsiao, J.W.D. y Woodson, H. (1996). Effects of nine monochromatic office interior colors on clerical tasks and worker mood. *Color Research & Application*, 21 (6), 448-458.

L

- Labrinea, E.P., Thomaidis, N.S. y Georgiou, C.A. (2001). Direct olive oil anisidine value determination by flow injection. *Analytica Chimica Acta*, 448, 201-206.
- Laguerre, M., Lecomte, J. y Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-282.
- Lavens, P., Sorgeloos, P., Dhert, P. y Devresse, B. (1995). Larval food. En: Bromage, N. y Roberts, R. (eds). Broodstock management and egg and larval quality. *Blackwell Scientific*, Oxford, 99, 373-397.
- Lee, E.C. y Min, D.B. (1988). Quenching mechanism of β -carotene on the chlorophyll sensitized photooxidation of soybean oil. *Journal of Food Science*, 53, 1893.
- Leibowitz, H.M., Krueger, D.E., Maunder, L.R., Milton, R.C., Kini, M.M., Kahn, H.A. et al. (1980). The Framingham Eye Study monograph: An ophthalmological and epidemiological study of cataract, glaucoma, diabetic retinopathy, macular degeneration, and visual acuity in a general population of 2631 adults, 1973-1975. *Surv Ophthalmol.*, 24, 335-610.
- Li, Y., Horsman, M., Wu, N., Lan, C.Q. y Dubois-Calero, N. (2008). Biofuels from Microalgae. *American Chemical Society and American Institute of Chemical Engineers*, 4, 815-820.
- Liang, S., Xueming, L., Chen, F. y Chen, Z. (2004). Current microalgal health food R & D activities in China. *Hydrobiologia*, 512, 45-48.



- Lillo, J., Álvaro, L., Moreira, H. (2014). An experimental method for the assessment of color simulation tools. *Journal of Vision*, 14(5), Article 15, DOI:10.1167/14.8.15.
- Lipworth, L., Martínez, M.E., Angell, J., Hsieh, C.C. y Trichopoulos, D. (1997). Olive Oil and Human Cancer: An Assessment of the Evidence. *Preventive Medicine*, 26, 181-190.
- Livingston, A.L. (1986). Rapid analysis of xantophyll and carotene in dried plant materials. *J. Assoc. Anal. Chem.* 69, 1017-1019.
- López, M.C., Godia, O. y Boatella, J. (1986). Evolución del contenido en carotenoides de los aceites a lo largo de la maduración de las aceitunas del Montsiá. *Grasas y Aceites*, 37(4), 197-202.
- López-Miranda, J., Gómez, P., Castro, P., Marín, C., Paz, E., Bravo, M.D., Blanco, J., Jiménez-Perez, J., Fuentes, F. y Pérez-Jiménez, F. (2000). La dieta mediterránea mejora la resistencia a la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. *Medicina Clínica*, 115, 363-365.

M

- Malecha, S. (1983). Commercial seed production of the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, in Hawaii. In: James P. McVey (Editor), CRC Handbook of Mariculture, *Crustacean Aquaculture*. Boca Raton, Florida, 1, 205-230.
- Malheiro, R., Casal, S., Lamas, H., Bento, A. y Pereira, J.A. (2012). Can tea extracts protect extra virgin olive oil from oxidation during microwave heating?. *Food Research International*, 48, 148-154.
- Malheiro, R., Casal, S., Ramalhosa, E. y Pereira, J.A. (2011). Microwave heating: a time saving technology or a way to induce vegetable oils oxidation?. In: S. Grundas (Ed.), *Advances in Induction and Microwave Heating of Mineral and Organic Materials*, Rijeka: Croatia. 597-614.
- Malheiro, R., Rodrigues, N., Manzke, G., Bento, A., Pereira, J. A. y Casal, S. (2013a). The use of olive leaves and tea extracts as effective antioxidants against the oxidation of soybean oil under microwave heating. *Industrial Crops and Products*, 44, 37-43.
- Malheiro, R., Casal, S., Teixeira, H., Bento, A. y Pereira, J.A. (2013b). Effect of olive leaves addition during the extraction process of overmature fruits on olive oil quality. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 509-521.
- Mallick, N. (2002). Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: A review. *Biometals*, 15, 377-390.
- Maoka, T., Fujiwara, Y., Hashimoto, K. y Akimoto, N. (2001). Isolation of a series of apocarotenoids from the fruits of the red paprika capsicum L. *J. Agric. Food Chem*, 49, 1601-1606.



- Mares-Perlman, J.A., Millen, A.E., Ficek, T.L. y Hankinson, S.E. (2002). The body of evidence to support a protective role for lutein and zeaxanthin in delaying chronic disease. Overview. *J. Nutrition*, 132, S518- 524.
- Martínez, M., Fuentes, M., Concepción de Miguel, Marín, J.M., Sánchez, J. y Osorio, E. (2010). Caracterización en base a su perfil colorimétrico y contenido en pigmentos, de aceites de oliva virgen procedentes de tres zonas oleícolas de la provincia de Badajoz. *Congreso nacional del color*. Alicante.
- Matsui, M.S., Muizzuddin, N., Arad, S. y Marenus, K. (2003). Sulfated polysaccharides from red microalgae have anti-inflammatory properties in vitro and in vivo. *Applied Biochemistry and Biotechnology A.*, 104, 13-22.
- Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. (2003). Application of Tristimulus Colorimetry to estimate the carotenoids content in ultrafrozen orange juices. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 51(25), 7266-7270.
- Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. (2004a). Estabilidad de los pigmentos carotenoides en los alimentos. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 54(2), 209-215.
- Meléndez-Martínez A.J., Vicario I.M. y Heredia F.J. (2004b). Importancia nutricional de los pigmentos carotenoides. *Archivos latinoamericanos de nutrición*, 54(2), 149-154.
- Meléndez-Martínez, A.J., Vicario, I.M. y Heredia, F.J. (2005). Instrumental measurement of orange juice colour: A review. *Journal of the Science of Food and Agricultura*, 85, 894-901.
- Melgosa, M., Gómez-Robledo, L., Huertas, R., Capitán-Vallvey, L.F., Moyano, M.J. y Heredia, F.J. (2009). Color measurements in blue-tinted cups for virgin-olive-oil tasting. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 86, 627-636.
- Melgosa, M., Huertas, R., Hita, E., Roa, J.M., Heredia, F.J., Alba, J. y Moyano, M.J. (2004). Proposal of a uniform color scale for virgin olive oils. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 81, 323-329.
- Melgosa, M., Huertas, R., Hita, E., Roa, J.M., Heredia, F.J., Alba, J. y Moyano, M.J. (2005). Performance of two color scales for virgin olive oils: Influence of ripeness, variety, and harvest season. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 82, 21-25.
- Melgosa, M., Martínez-García, J., Gómez-Robledo, L., Perales, E., Martínez-Verdú, F.M. y Dauser, T. (2014). Measuring color differences in automotive samples with lightness flop: A test of the AUDI2000 color-difference formula. *Optics Express*, 22, 3458-3467.
- Mendiola, J.A., Rodríguez-Meizoso, I., Señoráns, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A. e Ibáñez, E. (2008). *Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry*, 7, 3301-3309.
- Mensink, R.P. y Katan, M.B. (1992). Effect of dietary fatty acids on serum lipids and lipoproteins. A meta-analysis of 27 trials. *Artheroscler, Thrombosis and Vascular Biology*, 12, 911-919.



- Mérida, J. y Pérez, M. (2014). Procesado de alimentos. *AMV Ediciones*. ISBN: 978-84-94-980-9-0.
- Metting, F.B. (1996). Biodiversity and application of microalgae. *Journal Industrial Microbiology*, 17, 477-489.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Gandul, B., Garrido-Fernández, J. y Gallardo, L. (1990). Pigments present in virgin olive oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 67(3), 192-196.
- Mínguez-Mosquera, M.I. (1997). Clorofilas y carotenoides en Tecnología de los Alimentos. Sevilla, Spain. Secretariado de publicaciones de la Universidad de Sevilla.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y Garrido-Fernández, J. (1986a). Composición y evolución de clorofilas y carotenoides durante el desarrollo y maduración de los frutos del olivo. *Grasas y Aceites*, 37(6), 337-342.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y Garrido-Fernández, J. (1986b). Identificación de pigmentos carotenoides en frutos de distintas variedades de olivo *Olea europea L.* *Grasas y Aceites*. 37(5), 272-276.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y Garrido-Fernández, J. (1987). Diferenciación de las variedades de olivo “Hojiblanca” y “Manzanilla” según su contenido pigmentario. *Grasas y aceites*, 38(1), 4-8.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y Garrido-Fernández, J. (1989). Chlorophyll and carotenoid presence in olive fruit (*Olea europea*). *J. Agric. Food Chem.*, 37, 1-7.
- Mínguez-Mosquera, M.I. y Garrido-Fernández, J. (1991). Color-pigment correlation in virgin olive oil. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, 68, 332-336.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Pérez-Gálvez, A. y Hornero-Méndez, D. (2005). Pigmentos carotenoides en frutas y vegetales; mucho más que simples “colorantes” naturales. *Agro Csic*, 108-113.
- Mínguez-Mosquera, M.I., Rejano-Navarro, L., Gandul-Rojas, B., Sánchez-Gómez, A. y Garrido-Fernández, J. (1991). J. Color-pigment correlation in virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists’ Society*, 68(5), 332-336.
- Ministerio de Agricultura. (1997). Reglamento de la Denominación de origen “Borjas Blancas” y su Consejo Regulador. Orden de 10 de Mayo de 1977, Ministerio de Agricultura, Madrid. BOE 166, 13-9-1977.
- Ministerio de Agricultura. (1979). Reglamento de la Denominación de origen “Siurana” y su Consejo Regulador. Orden de 19 de Noviembre de 1979, Ministerio de Agricultura, Madrid. BOE 166, 13-12-1979.
- Mirandola, R., Tuccolli, M., Vaglini, S. y De Risi, P. (1989). Sistemi qualità. *ETS Editrice*, Pisa.
- Molina, E., García, F., Sánchez, J.A., Fernández, J.M., Ación, F.G. y Contreras, A.A. mathematical model of microalgal growth in light limited chemostat culture. (1994). *J Chem. Technol. Biotechnol.*, 61, 167-173.



- Montedoro, G.F, Sevilí, M., Baldioli, M., Magnarini-Cossignani, L. y Damiani, P. (1993). Potenziali modelli che definiscono la tipicità degli oli extra vergeni di oliva ed i fattori che vi concorrono alla luce dell'attuazione della. D.O.C. *Industrie Alimentari*, XXXII, 618-631.
- Morita, M., Watanabe, Y. y Saiki, H. (2002). Photosynthetic productivity of conical helical tubular photobioreactor incorporating *Chlorella sorokiniana* under field conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 77, 155-162.
- Motilva, M.J., Jaria, I., Bellart, I. y Romero, M.P. (1998). Estudio de la calidad del aceite de oliva virgen de la denominación de Origen "Les Garrigues" (Lleida) durante la campaña 1995/96. *Grasas y Aceites*, 49(5-6), 425-433.
- Moyano, M.J. (2002). Estudio del color de aceites de oliva vírgenes de Andalucía. Sevilla: Universidad de Sevilla. Tesis Doctoral.
- Muller, H.G. y Tobin, G. (1986). Nutrición y ciencia de los alimentos. Acribia (Ed.). Zaragoza. ISBN 84-200-0585.
- Muller-Feuga, A. (2000). The role of microalgae in aquaculture: situation and trends. *Journal of Applied Phycology*, 12, 527-534.

N

- Naguib, Y.M.A. (2000). Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 1150-1154.
- Nakagawa, K., Fujimoto, K. y Miyazawa, T. (1996). β -carotene as a high-potency antioxidant to prevent the formation of phospholipid hydroperoxides in red blood cells of mice. *Biochim Biophys Acta*, 1299, 110-116.
- Navarrete-Bolaños, J.L., Rangel-Cruz, C.L., Jiménez-Islas, H., Botello-Álvarez, E. y Rico-Martínez, R. (2005). Pre-treatment effects on the extraction efficiency of xanthophylls from marigold flower (*Tagetes erecta*) using hexane. *Food Research International*, 38(2), 159-165.
- Nell, J.A., Diemar, J.A. y Heasman, M.P. (1996). Food value of live yeasts and dry yeast-based diets fed to Sydney rock oyster *Saccostrea commercialis* spat. *Aquaculture*, 145(1-4), 235-243.
- Nemcsics, A. (1993). Colour Dynamics: Environmental Colour Design. ISBN: 0131381997, 9780131381995.
- Nidhi, B. y Baskaran, V. (2011). Influence of vegetable oils on micellization of lutein in a simulated digestion model. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 88, 367-372.
- Nishino, H. (1998). Cancer prevention by carotenoids. *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, 402, 159-163.
- Niyogi, K.K., Björkman, O. y Grossman, A.R. (1997). The roles of specific xanthophylls in photoprotection. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94, 14162-12167.



- Norman, R. y Scott, W. (1952). Color and Affect: A review and semantic evaluation. *The Journal of General Psychology*, 46, 185-223.

O

- Olaizola, M. (2003). Commercial development of microalgal biotechnology: From the test tube to the marketplace. *Biomolecular Engineering*, 20, 459-466.
- Oliver, J. y Palou, A. (2000). Review chromatographic determination of carotenoids in foods. *Journal of Chromatography A.*, 881, 543-555.
- Olmedilla, B., Granado, F. y Blanco, I. (2001). Carotenoides y salud humana. Madrid, Fundación Española de la Nutrición. ISBN: 84-930544-2-9.
- Olson, J.A. (1999). Carotenoids and human health. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 49(1-5), 7-11.
- Omenn, G.S., Goodman, G.E., Thornquist, M.D., Balmesk, J., Cullenk, M.R., Glass, A. et al. (1996). Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine*, 334, 1150-1155.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2013). Health at a Glance 2013. OECD Indicators.
- Orgaz, F. y Fereres, E. (2004). Riego. En: El cultivo del olivo. Editores: Barranco, D., Fernández-Escobar, R.L. y Rallo., M.P. *Consejería de Agricultura y Pesca*, 337-362.
- Osgood, C.E., Suci, G.J. y Tannbaum, P.H. (1957). The measurement of meaning. Urbana, USA: *University of Illinois Press*, 323-324.
- Oswald, W.J. y Golueke, C.G. (1960). Biological Transformation of Solar Energy. *Advances in Applied Microbiology*, 2, 223-262.
- Ou, L.C. (2004). Quantification of Colour Emotion and Colour Harmony. Leeds, UK. University of Leeds.
- Ou, L.C., Luo, M.R., Woodcock, A. y Wright, A. (2004a). A study of colour emotion and colour preference. Part I: Colour emotions for single colours. *Color Research & Application*, 29(3), 232-240.
- Ou, L.C., Luo, M.R., Woodcock, A. y Wright, A. (2004b). A study of colour emotion and colour preference. Part II: Colour emotions for two-colour combinations. *Color Research & Application*, 29(4), 292-298.
- Ou, L.C., Luo, M.R., Woodcock, A., Wright, A. (2004c). A study of colour emotion and colour preference. Part III: Colour preference modeling. *Color Research & Application*, 29(5), 381-389.



- Owen, R.W., Giacosa, A., Hull, W.E., Haubner, R., Spiegelhalter, B. y Bartsch, H. (2000). The antioxidant/anticancer potencial of phenolic compounds isolated from olive oil. *European Journal of Cancer*, 36, 1235-1247.
- Ozawa, Y., Sasaki, M., Takahashi, N., Kamoshita, M., Miyake, S. y Tsubota, K. (2012). Neuroprotective effects of lutein in the retina. *Current Pharmaceutical Design*, 18, 51-56.

P

- Packer, L. y Obermüller-Jevic, U. (2002). Vitamin E in disease prevention and therapy: Future perspectives en Packer, L., Traber, M., Kraemer, K., Frei, B. Ed. The antioxidant Vitamin C and E. *AOCS Press*. California. 255, 288.
- Palozza, P. y Krinsky, N.I. (1992). Antioxidant effects of carotenoids in Vivo and in Vitro: An overview. *Methods Enzymol*, 213, 403-420.
- Pannelli, G. y Servili, M. (1991). Osservazioni poliennali sulle variazioni di parametri agronomici durante la maturazione di frutti di cultivar precoci e tardive di olivo. *Olea* 21, (Septiembre).
- Pannelli, G., Servili, M., Selvaggini, M. y Montedoro, G. (1994). Effect of agronomic and seasonal factor on olive (*Olea europaea L.*) production and on the qualitative characteristics of the oil. *Acta Horticulturae*, 356, 239-243.
- Patumi, M., D'Andria Marsilio, V., Fontaneda, G., Morelli, G. y Lanza, B. (2002). Olive and olive oil quality after intensive monoculture olive growing (*Olea Europea L.*, Kalamata) in different irrigation regimes. *Food Chemistry*, 77, 27-34.
- Pérez, M.M, Yebra, A., Huertas, R., Melgosa, M., García-Toledo, H. y Carrillo, F. (2003). El color en relación con las propiedades químicas y organolépticas del aceite de oliva virgen. *Actas Expoliva*.
- Perona, J.S., Cañizares, J., Montero, E., Sánchez-Domínguez, J.M., Catalá, A. y Ruíz-Gutiérrez, V. (2004). Virgin olive oil reduces blood pressure in hypertensive elderly subjects. *Clinical Nutrition*, 23, 1113-1121.
- Peterson, J.J., Dwyer, J.T., Jacques, P.F. y McCullough, M.L. (2012). Associations between flavonoids and cardiovascular disease incidence or mortality in European and US populations. *Nutrition Reviews*, 70, 491-508.
- Petruccioli, G. (1971). Caratteristiche degli oli provenienti da olive raccolte con diversi sistemi. *Industria Alimentari*, X (6), 69-75.
- Philip, T. y Berry, J.W. (1975). Nature of lutein acylation in Marigold (*Tagetes erecta*) flowers. *J. Food Sci.*, 40, 1089-1090.
- Piccaglia, R., Marotti, M. y Grandi, S. (1998). Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta*. *Industrial Crops and Products*, 8(1), 45-51.



- Pittman, J.K., Dean, A.P. y Osudenko, O. (2011). The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources. *Bioresource Technology*, 102, 17-25.
- Plutchik, R. (1980). Emotion, a psychoevolutionary synthesis. New York, 21, 529-533.
- Pomerleau, J., Lock, K., Knai, C. y McKee, M. (2004). Effectiveness of interventions and programmes promoting fruit and vegetable intake. Background paper for the Joint FAO/WHO workshop on fruit and vegetables for health.p.133.
- Pruder, G.D. (1983). Journal of the Institute of Electrical and Electronics Engineers, 2, 1002-1004.
- Pulz, O. (2001). Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 287-293.
- Pulz, O. y Scheibenbogen, K. (1998). Photobioreactors: design and performance with respect to light energy input. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 59, 123-152.

R

- Raja, R., Hemaiswarya, S., Kumar, N.A., Sridhar, S. y Rengasamy, R. (2008). Critical Review in Microbiology, 34, 77-88.
- Ranalli, A. (1992a). Carotenoids in virgin olive oils: Effect of Technology. *Ital. J. Food Sci.*, 1, 53-57.
- Ranalli, A. (1992b). Variabilità degli indici cromatici e analitici degli oli vergini d'oliva in funzione di parametri tecnologici. *Industrie Alimentari.*, XXXI, 513-526.
- Ranalli, A. y Serraiocco, A. (1996). Quantitative and qualitative effects of a pectolytic enzyme in olive oil production. *Grasas y Aceites*, 47(4), 227-236.
- Ranalli, A., De Mattia, G., Ferrante, M.L. y Giansante, L. (1997). Incidence of olive cultivation area on the analytical characteristics of the oil. Note 1. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 74, 501-508.
- Ranalli, A., Malfatti, A., Lucera, L., Contento, S. y Sortiriuo, E. (2005). Effects of the processing techniques on the natural colourings and the other functional constituents in virgin olive oil. *Food Research International*, 38, 873-878.
- Rangaswamy, L., Raju, M., Parthasarathy, T. y Baskaran, V. (2007). Lutein Zeaxantin in leafy and their bioavailability: olive oil influences the absorption of dietary lutein and its accumulation in adult rats. *J. Agri. Food. Chem.*, 55, 6395-6400.
- Reboloso, M.M., Acien, G.G., Sánchez, J.A. y Guil, J.L. (2000). Biomass nutrient profiles of the microalga *Porphyridium cruentum*. *Food Chemistry*, 70(3), 345-353.
- Reglamento CE 61/2011. Diario Oficial de la Unión Europea de la Comisión 24/01/2011.



- Reijnders, L. (2008). Do biofuels from microalgae beat biofuels from terrestrial plants?. *Trends in Biotechnology*, 26, 349-350.
- Reitan, K.I., Raimuzzo, J.R., Oie, G. y Olsen, Y. (1997). A review of the nutritional effects of algae in marine fish larvae. *Aquaculture*, 155(1), 207-221.
- Renaud, S. y De Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet*, 339, 1523-1526.
- Renaud, S., De Lorgeril, M., Delaye, J., Guidollet, J., Jacquard, F., Mamelle, N. et al. (1995). Cretan Mediterranean diet for prevention of coronary heart disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 61, S1360-1367.
- Richmond, A. (1990). Large scale microalgal culture and applications. *Progress in Phycological Research*, 7, 269-330.
- Ridgway, J. (1993). Olive Oil: its attributes and diversity. *Nutr. Food Sci.*, 3, 30-32.
- Roa, J.M., Moreno, M.P., Vacas, M.C. y Melgosa, M. (2001). Color preferences in personal and social settings for Spanish teenagers. *Atti Fondazione Giorgio Ronchi*, 56, 29-43.
- Roca, M. y Mínguez, M.I. (2001). Changes in chloroplast pigments of olive varieties during fruit ripening. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 832-839.
- Rodríguez-Amaya, D.B. (1997). Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods. Washington, D.C.: OMNI/USAID.
- Ruiz Ortega, E. (2012). Obtención y purificación de ficoeritrina mediante cromatografía de adsorción en lecho expandido. Escalado del proceso, caracterización fisicoquímica y aplicación como colorante natural. Tesis Doctoral. Universidad de Jaén.
- Ruiz, D., Egea, J., Tomás Barberán, F.A. y Gil, M.I. (2005). Carotenoids from new apricot (*Prunus armeniaca*, L.) varieties and their relationship with flesh and skin color. *Journal of Agriculture and Food Chemistr.*, 53, 6368-6374.

S

- Salas, J., Pastor, M., Castro, J. y Vega, V. (1997). Influencia del riego sobre la composición y características organolépticas del aceite de oliva. *Grasas y Aceites*, 48 (2), 74-82.
- Salmerón, J.F., Gómez-Robledo, L., Carvajal, M.A., Huertas, R., Moyano, M.J., Gordillo B., Palma, A.J., Heredia, F.J. y Melgosa, M. (2012). Measuring the colour of virgin olive oils in a new colour scale using a low-cost portable electronic device. *Journal of Food Engineering*, 111, 247-254.



- Sánchez, J.F., Fernández, J.M., Ación, F.G., Rueda, A., Pérez-Parra, J., y Molina, E. (2008a). Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochemistry*, 43, 398-405.
- Sánchez, J.F., Fernández, J.M., Ación, F.G., Cerón, M.C., Pérez-Parra, J. y Molina, E. (2008b). Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: Influence of irradiance, dilution rate and temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79, 719-729.
- Sato, T., Kajiwara, K., Hoshino, H. y Nakamura, T. (2000). Quantitative evaluation and categorizing of human emotion induced bet alour. *Adv Colour Sci Technol.*, 3, 53-59.
- Sayago, A., Marín, M.I., Aparicio, R. y Morales, M.T. (2007). Vitamina E y aceites vegetales. *Grasas y Aceites*, 58(1), 74-86.
- Schoefs, B. (2002). Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis. *Trends in Food Science & Technology*, 13 (11), 361-371.
- Schünemann, H.J., Mc Cann, S., Grant, B.J.B., Trevisan, M., Muti, P. y Freudenheim, J.L. (2002). Lung function in relation to intake of carotenoids and other antioxidant vitamins in a population-based study. *American Journal of Epidemiology*, 155(5), 463-471.
- Seddon, J.M., Ajani, U.A., Sperduto, R.D., Hiller, R., Blair, N., Burton, T.C., et al. (1994). Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. *JAMA*, 272, 1413-1420.
- Seefeldt, L.C. (2007). Utah group plans to make biodiesel from algae. *Industrial Bioprocessing*, 29, 5-6.
- Senger, H., Wagner, C., Hermsmeier, D., Hohl, N., Urbig T. y Bishop, N. (1993). The influence of light intensity and wavelength on the contents of α - and β -carotene and their xanthophylls in green algae. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 18, 273-279.
- Seppanen, C.M. y Csallany, A.S. (2002). The effect of paprika carotenoids on in vivo lipid peroxidation measured by urinary excretion of secondary oxidation products. *Nutrition Research*, 22, 1055-1065.
- Servili, M. y Montedoro, G.F. (2002). Contribution of phenolic compounds to virgin olive oil quality. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 602-613.
- Servili, M., Esposito, S., Fabiani, R., Urbani, S., Taticchi, A., Mariucci, F., Selvaggini, R. y Montedoro, G.F. (2009). Phenolic compounds in olive oil: antioxidant, health and organoleptic activities according to their chemical structure. *Inflammopharmacology*, 17, 76-84.
- Shen, N.C. (1937). The Color Preference of 1368 Chinese Students, with Special Reference to the Most Preferred color. *The Journal of Social Psychology*, 8(2), 185-204.
- Shi, X.M., Jiang, Y. y Chen, F. (2002). High-yield production of lutein by the green microalga *Chlorella protothecoides* in heterotrophic fed-batch culture. *Biotech. Prog.*, 18(4), 723-727.



- Shimizu, Y. (2000). Microalgae as a drug source. En: Fusetani N. (Ed.). *Drugs from the sea*. Basel: Karger, 30-45.
- Sies, H. y Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62, S1315-1321.
- Silva, S. (2004). Luteína, alimento para tu vista. *Food Ingredients*, 80-81.
- Simic, M.G. (1992). Carotenoid free radicals. *Methods Enzymol.*, 213, 444-453.
- Simpson, K.L. (1983). Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. *Proc Nutr Soc.*, 42, 7-17.
- Singh, S., Kate, B.N. y Banecjee, U.C. (2005). Bioactive compounds from cyanobacteria and microalgae: An overview. *Critical Reviews in Biotechnology*, 25, 73-95.
- Slattery, M., Benson, J., Curtin, K, Ma, K.-N., Schaeffer, D. y Potter, J.D. (2000). Carotenoids and colon cancer. *AM. J. Clin. Nutr.*, 71, 575-582.
- Snodderly, D.M. (1995). Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, S1448-61.
- Solé, M.A. (1995). Algunas observaciones sobre la evolución del color del aceite de la variedad "Arbequina" en la comarca de Les Garrigues durante el periodo de recolección. I Simposi de l'olivera "Arbequina" en Catalunya, Lleida. 163-166.
- Southon, S. (2000). Increased fruit and vegetable consumption within the EU: potential health benefits. *Food Res. Int.*, 33, 211-217.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. y Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.*, 101, 87-96.
- Stanley, J. (2005). Vitamin E supplements and vascular disease. *Lipid Technology*, 17, 15-21.
- Starr, R.C. (1971). Algal culture-sources and methods of cultivation. En: "Methods in Enzymology". (A. San Pietron, ed). *Academic Press*, New York, 23, 29-53.
- Stephen, E., Ross, I.L., Mussgnug, J.H., Wagner, L.D., Borowitzka, M.A., Posten, C., Kruse, O. y Hankamer, B. (2010). Future prospects of microalgal biofuel production systems. *Trends in Plant Science*, 15(10), 554-564.
- Stolz, P. y Obermayer, B. (2005). Manufacturing microalgae for skin care. *Cosmetic Toiletries*, 120, 99-106.
- Su, Q., Rowley, K.G. y Balazs, N.D.H. (2002). Carotenoids: separation methods applicable to biological samples. *Journal of Chromatography B*, 781, 393-418.



T

- Tamiya, H. (1957). Mass Culture of Algae .*Annual Review of Plant Physiology*, 8, 309-334.
- Tanaka, T., Makita, H., Ohnishi, M., Mori, H., Satoh, K. y Hara, A. (1995). Chemoprevention of rat oral carcinogenesis by naturally occurring xanthophylls, astaxanthin and canthaxanthin. *Cancer Res.*, 55, 4059-4064.
- Tavani, A. y La Vecchia, C. (1999). β -carotene and risk of coronary heart disease. A review of observational and intervention studies. *Biomed & Pharmacother*, 53, 409-416.
- Teikari, J.M., Laatikainen, L., Virtamo, J., Haukka, J., Rautalahti, M., Liesto, K., et al. (1998). Six-year supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene and age-related maculopathy. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 76, 224–229.
- Tennant, D.R., Davidson, J. y Day, A.J. (2014). Phytonutrient intakes in relation to European fruit and vegetable consumption patterns observed in different food surveys. *British Journal of Nutrition*, 112, 1214-1225.
- Thurstone, L. (1994). A law of Comparative Judgment (reprint of the original). *Psychological Review*, 101(2), 266-270.
- Todd Lorenz, R. y Cysewski, G.R. (2000). Commercial potential for Haematococcus microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trend Biotechnology*, 18, 160-167.
- Torgerson, W. (1958). Theory and Methods of Scaling. New York.
- Tous, J. y Romero, A. (1992). Caracterización del color de los aceites de oliva vírgenes de cultivares catalanes. *Grasas y Aceites*, 43(6), 347-351.
- Tous, J., Romero, A., Guerrero, L., Díaz, I. y Hermoso, J.F. (1997). Características químico-sensoriales de los aceites de oliva “Arbequina” obtenidos en distintas zonas de España. *Grasas y Aceites*, 48(6), 415-424.
- Tovar, M.J., Montilva, M.J. y Romero, M.P. (2001). Changes in the phenolic composition of virgin olive oil from Young trees (*Olea europaea* L. cv. Arbequina) grow under linear irrigation strategies. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 5502-5508.
- Tovar, M.J., Romero, M.P., Alegre, S., Girona, J. y Montilva, M.J. (2002). Composition and organoleptic characteristics of oil from Arbequina olive (*Olea europaea* L.) trees under deficit irrigation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82, 1755-1763.
- Trapero, A. y Blanco, M.A. (1999). Enfermedades; en el cultivo del olivo, 3 ed. (Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L., ed: Mundi-Prensa, *Consejería de Agricultura y Pesca* (Junta de Andalucía), Madrid, 476-532.
- Trichopoulou, A. y Lagiou, P. (1997). Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of cultural, history, and lifestyle. *Nutrition Reviews*, 55, 383-389.



- Tsukada, O., Kawahara, T. y Miyachi, S. (1997). Mass Culture of Chlorella in Asian countries. In: Mitsui A., Miyachi. San Pietro A., Tamura S. (Eds.). Academic Press. New Cork. *Biological Solar Energy Conversión*, 455-471.

U

- Uceda, M. y Hermoso, M. (1999). La calidad del aceite de oliva en el cultivo del olivo 3ª ed. (Barranco, D.; Fernández-Escobar, R.; Rallo, L., ed). Mundi-Prensa, *Consejería de Agricultura y Pesca* (Junta de Andalucía), Madrid, 571-596.
- Uceda, M., Hermoso, M. y Aguilera, M.P. (2004). La calidad del aceite de oliva. En: El Cultivo del Olivo. Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, R. (Eds). *Mundi Prensa*. Junta de Andalucía.

V

- Van Beilen, J.B. (2010). Why microalgal biofuels won't save the internal combustion machine?. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 4, 41-52.
- Vasconcelos, P.M.M.G. (1985). Estudo da Variação Regional da Cor dos Azeites Virgens Portugueses. *Boletim do Instituto do Azeite e Productos Oleaginosos*, 12(1), 29-47.
- Vázquez, A. (1980). A study of the polar compounds in olive oil by gas chromatography. *Grasas y Aceites*, 31, 309.
- Vázquez-Roncero, A. y Maestro, R. (1970). Los colorantes antociánicos de la aceituna madura. I. Estudio cualitativo. *Grasas y Aceites*, 21(4), 208-214.
- Veer, P., Jansen, M.C.J.F., Klerk, M. y Kok, F.J. (2000). Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. *Public Health Nutrition*, 3, 103-107.
- VERIS (Vitamin E Research and Information Service). (1997). Efficacy of carotenoids. VERIS Research Summary. August. *LaGrange*, Illinois.
- Verma, N.M., Mehrotra, S., Shukla, A. y Mishra, B.N. (2010). Prospective of biodiesel production utilizing microalgae as the cell factories: A comprehensive discussion. *African Journal of Biotechnology*, 9, 1402-1411.
- Vidal, V.A.C. y Lefèvre, P.M. (1945). A cor de azeite. Sua realçáo com o clima, o solo e as variedades de oliveira. *Separata de Agronomia Lusitana*, VII (III).
- Visioli, F. y Galli, C. (1998). Olive oil phenols and their potential effects on human health. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 4292-4296.



W

- Walker, D.A. (2009). Biofuels, facts, fantasy, and feasibility. *Journal of Applied Phycology*, 21(5), 509-517.
- Woodall, A.A, Lee, S.W, Weesie, R.J, Jackson, M.J y Britton, G. (1997). Oxidation of carotenoids by free radicals: relationship between structure and reactivity. *Biochim Biophys Acta*, 1336, 33-42.
- World Health Organization. (2014). Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health. Promoting fruit and vegetable consumption around the world. <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/en/>

X

- Xiao, K., Luo, M.R., Li, C., Cui, G. y Park, D. (2011). Investigation of colour size effect for colour appearance assessment. *Color Research and Application*, 36, 201-209.
- Xin, J.H., Cheng, K.M., Taylor, G., Sato, T. y Hansuebsai, A. (2004). Cross-regional comparison of colour emotions Part II: Quantitative analysis. *Color Research & Application*, 29(6), 451-457.

Y

- Yamaguchi, K. (1997). Recent advances in microalgal bioscience in Japan, with special reference to utilization of biomass and metabolites: A review. *Journal of Applied Phycology*, 8, 487-502.
- Yanagi M., Watanabe, Y. y Saiki, H. (1995). CO₂ fixation by *Chlorella sp.* HA-1 and its utilization. *Energy Conversion Management*, 36, 713-716.
- Yen, H.-, Sun, C.-, y Ma, T.-. (2011). The comparison of lutein production by *Scenedesmus sp.* in the autotrophic and the mixotrophic cultivation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 164, 353-361.

Z

- Zamora, R., Olmo, C., Navarro, J.L. e Hidalgo, F.J. (2004). Contribution of phospholipid pyrrolization of the color reversion produced during deodorization of poorly degummed vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4166-4171.



-
- Zhang, L.X., Coney, R.V. y Bertram, J.S. (1991). Carotenoids enhance gap functional communication and inhibit lipid peroxidation in C3H/10T/2 cells: Relationship to their cancer chemopreventive action. *Carcinogenesis*, 12, 109-114.
 - Ziegler, R.G. (1989). A review of epidemiologic evidence that carotenoids reduce the risk of cancer. *J. Nutr.*, 119, 116-122.
 - Zunin, P., Evangelisti, F., Pagano, M.A., Tiscornia, E. y Petacch, R. (1995). Phenolic compounds in oil obtained from *Olea europaea* and anti-Dacus treatments. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 72, 55-59.

PÁGINAS WEB

- <http://www.eufic.org/article/en/expid/Fruit-vegetable-consumption-Europe/>
- <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:023:0001:0014:ES:PDF>
- <http://www.icoftalmologia.es/es/enfermedades-de-los-ojos/dmae>
- <http://www.internationaloliveoil.org/modules/search>.
- <http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>
- <http://www.predimed.es/>
- <http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/en/>





9. ANEXOS



9. ANEXO I

Tabla 9.1.1

Diferencia de color de los AOVE's "SM" tanto control como enriquecidos con antioxidantes a diferentes concentraciones, izquierda (0,05 mg luteína/ml) y derecha (0,1 mg luteína/ml).

Concentración 0,05 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ SM	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ SM	Concentración 0,1 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ SM	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ SM
Días	Control	Antioxidantes	Días	Control	Antioxidantes
1	1,1	1,14	1	1,45	2,3
2	1,76	0,96	2	2,72	2,29
4	2,64	0,49	3	3,4	1,31
7	4,11	0,46	6	7,18	3,12
8	4,44	0,71	7	8,74	3,69
11	5,9	1,78	8	10,76	4,99
14	7,76	2,41	9	12,4	6,03
15	8,77	2,22	10	13,97	6,81
18	11,49	3,21	13	19,6	9,66
21	14,61	4,49	14	21,6	10,54
23	16,56	5,35	15	23,17	10,91
28	21,81	7,09	16	25,42	11,47
30	24,1	7,99	17	27,33	12,24
32	26,6	8,62	20	32,69	13,89
35	30,45	9,88	21	34,92	14,41
37	32,71	10,29	22	37,08	15
39	35,55	10,95	29	41,6	15,91
42	40	11,89	31	43,96	16,11
45	44,96	12,91	34	47,94	17,1
50	51,89	14,17	35	49,89	17,28
52	55,93	15,23	37	53,68	17,91
57	61,86	16,75	42	65,78	19,14
59	67,08	18,89	50	79,97	20
64	77,44	22,98	56	85,99	20,97
66	82,54	25,85			

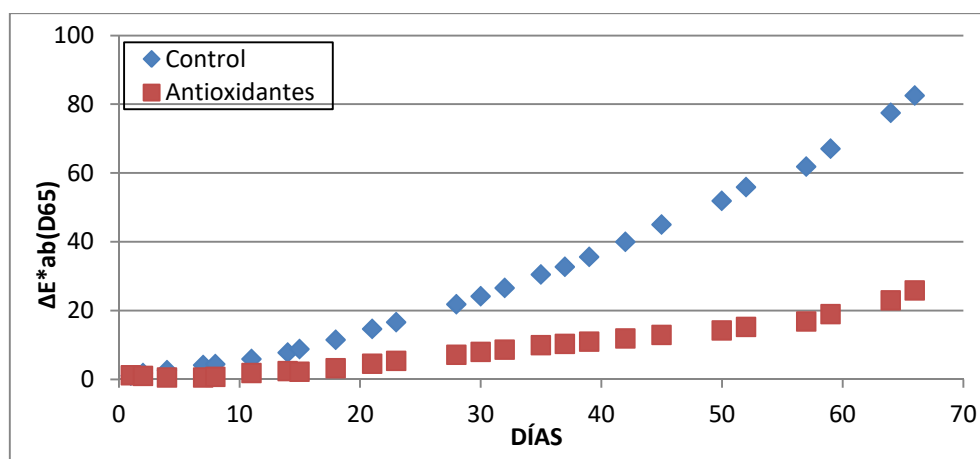


Figura 9.1.1

Foto-estabilidad del AOVE "SM" bajo condiciones de iluminación controlada con lámpara ultravioleta enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

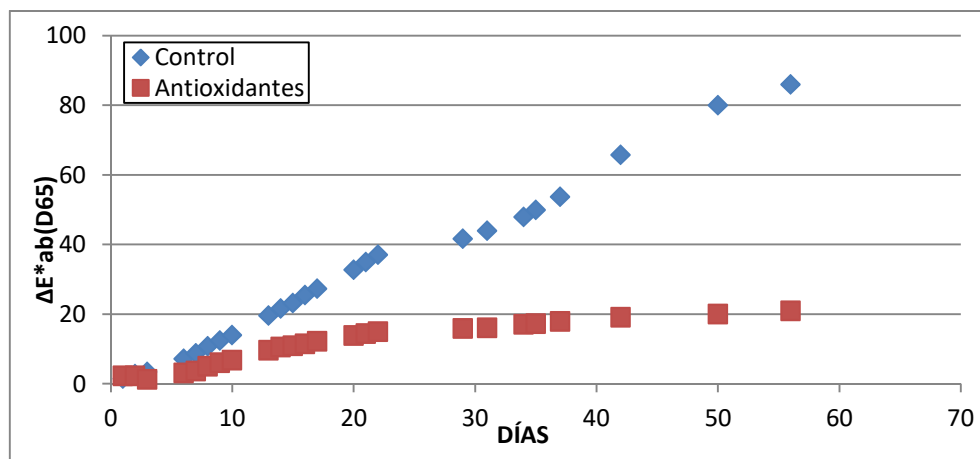


Figura 9.1.2

Foto-estabilidad del AOVE "SM" bajo condiciones de iluminación controlada con lámpara ultravioleta enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,1 mg luteína/ml.

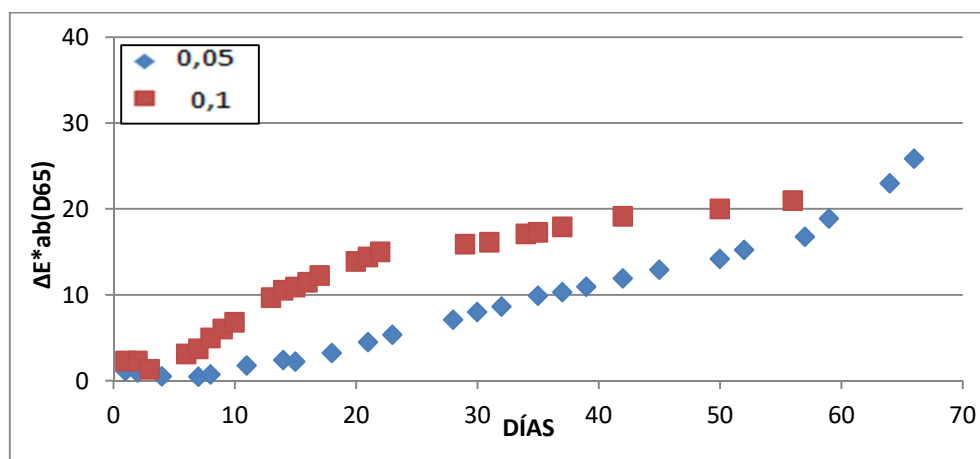


Figura 9.1.3

Comparativa de la Foto-estabilidad de los AOVE's "SM" enriquecidos con antioxidantes a diferentes concentraciones (0,05 mg luteína/ml y 0,1 mg luteína/ml) bajo condiciones de iluminación controlada con lámpara ultravioleta.

Tabla 9.1.2

Diferencia de color de los AOVE's "OB" tanto control como enriquecidos con antioxidantes a diferentes concentraciones, izquierda (0,05 mg luteína/ml) y derecha (0,1 mg luteína/ml).

Concentración 0,05 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OB	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OB	Concentración 0,1 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OB	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OB
Días	Control	Antioxidantes	Días	Control	Antioxidantes
1	0,89	1,23	1	1,45	2,33
2	1,84	1,05	2	3,63	2,16
4	3,25	0,81	3	5,23	2,55
7	5,89	1,27	6	10	5,39
8	6,73	1,65	7	11,74	6,2
11	9,69	2,41	8	12,64	7,25
14	12,92	3,22	9	14,22	8,29
15	14,4	3,61	10	15,34	8,77
18	18,4	4,83	13	19,31	11,04
21	22,49	5,74	14	20,95	11,25
23	25,45	6,5	15	21,97	11,58
28	33,45	8	16	23,53	11,94
30	37,35	9,09	17	25,23	12,53
32	41,5	10,59	20	28,87	13,4
35	48,56	13,4	21	30,91	13,71
37	52,91	15,27	22	32,48	14,22
39	57,92	18,12	29	36,55	14,79
42	67,38	23,51	31	38,12	14,93
45	78,04	30,77	34	42,19	15,53
50	93,9	43,59	35	44,25	15,84
52	100,21	53,11	37	48,53	16,3
57	106,69	68,19	42	59,13	17,34
59	109,74	82,6	50	75,77	18,72
64	112,57	107,67	56	83,34	21,81
66	113,24	115,92			



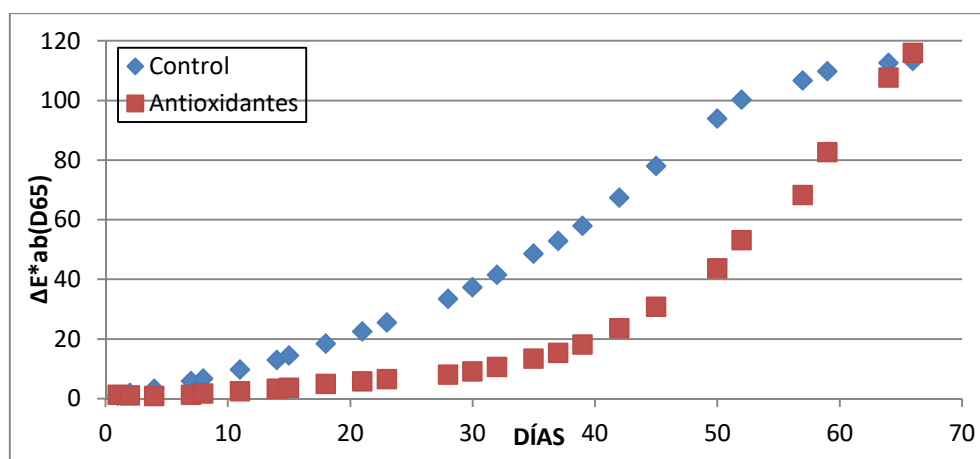


Figura 9.1.4

Foto-estabilidad del AOVE "OB" bajo condiciones de iluminación controlada con lámpara ultravioleta enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

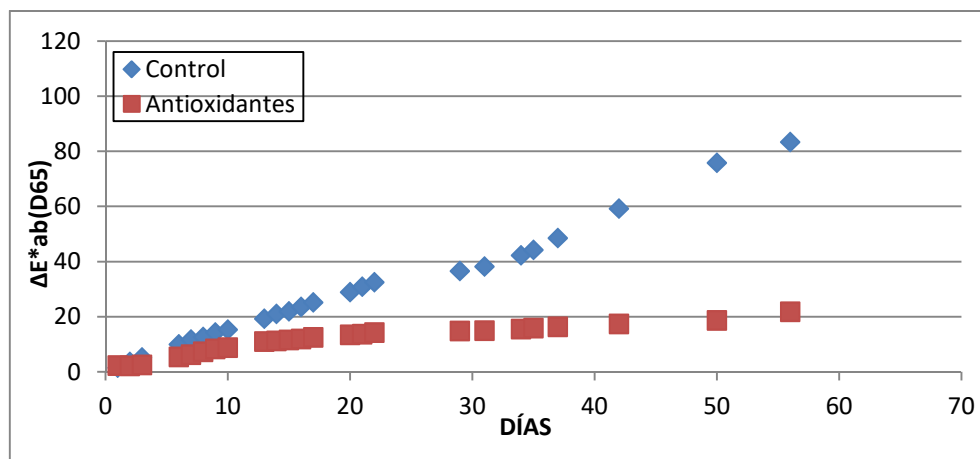


Figura 9.1.5

Foto-estabilidad del AOVE "OB" bajo condiciones de iluminación controlada con lámpara ultravioleta enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,1 mg luteína/ml.

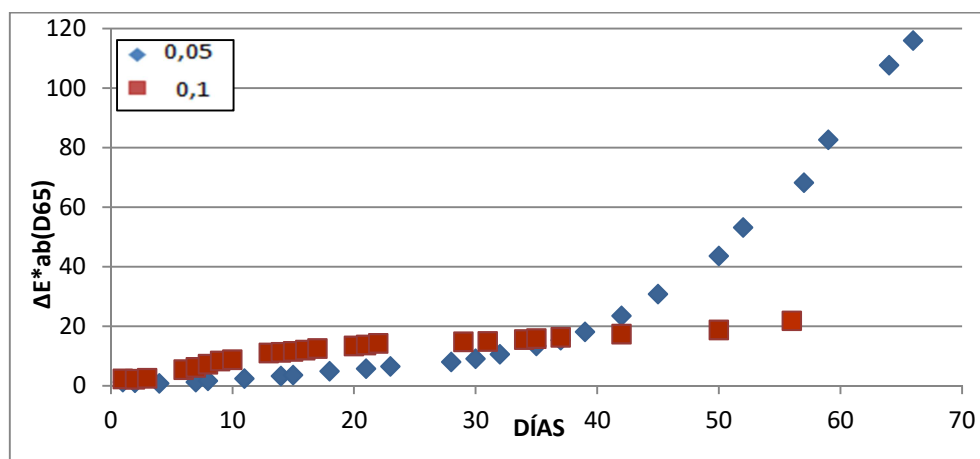


Figura 9.1.6

Comparativa de la Foto-estabilidad de los AOVE's "OB" enriquecidos con antioxidantes a diferentes concentraciones (0,05 mg luteína/ml y 0,1 mg luteína/ml) bajo condiciones de iluminación controlada con lámpara ultravioleta.

Tabla 9.1.3

Diferencia de color de los AOVE's "OG" tanto control como enriquecidos con antioxidantes a diferentes concentraciones, izquierda (0,05 mg luteína/ml) y derecha (0,1 mg luteína/ml).

Concentración 0,05 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OG	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OG	Concentración 0,1 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OG	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OG
Días	Control	Antioxidantes	Días	Control	Antioxidantes
1	0,81	1,01	1	1,72	0,89
2	1,94	0,62	2	4,52	1,22
4	4,62	0,52	3	5,9	1,56
7	7,48	1,53	6	10,1	4,43
8	8,26	1,94	7	11,04	5,12
11	10,68	3,01	8	12,06	6,08
14	13,3	3,39	9	13,26	6,97
15	14,57	3,68	10	14,85	7,39
18	17,97	4,58	13	18,13	9,18
21	21,46	5,38	14	20,74	9,59
23	23,92	5,85	15	22,22	9,8
28	30,75	6,92	16	24,16	10,26
30	33,88	7,41	17	26,45	10,73
32	37,46	8,11	20	31,22	11,5
35	43,33	9,3	21	34,31	11,74
37	46,86	9,92	22	36,73	12,07
39	51,08	11,11	29	41,98	12,93
42	58,61	12,99	31	43,72	13,1
45	67,7	15,79	34	49,94	13,42
50	83,54	20,7	35	53,42	13,8
52	92,47	24,75	37	58,17	14,13
57	102,45	31,83	42	76,36	15,21
59	107,26	38,94	50	93,27	16,65
64	111,67	57,05	56	101,57	17,73
66	112,59	67,63			

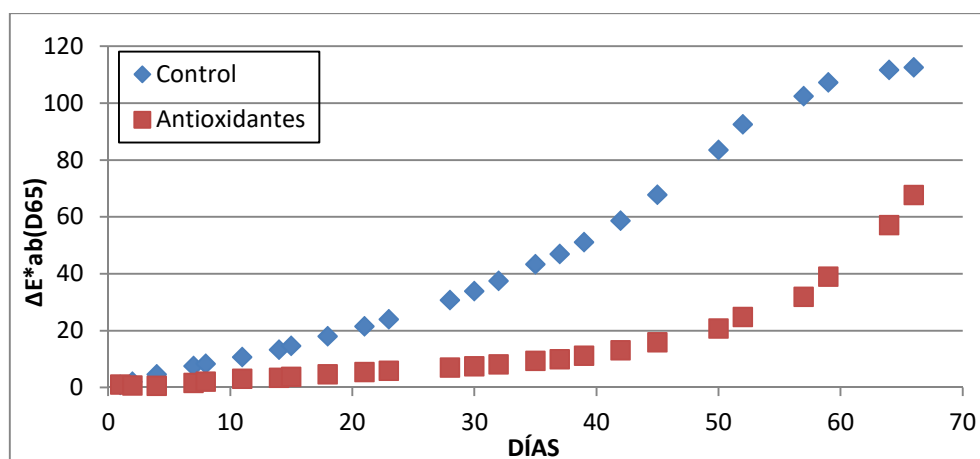


Figura 9.1.7

Foto-estabilidad del AOVE "OG" bajo condiciones de iluminación controlada con lámpara ultravioleta enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

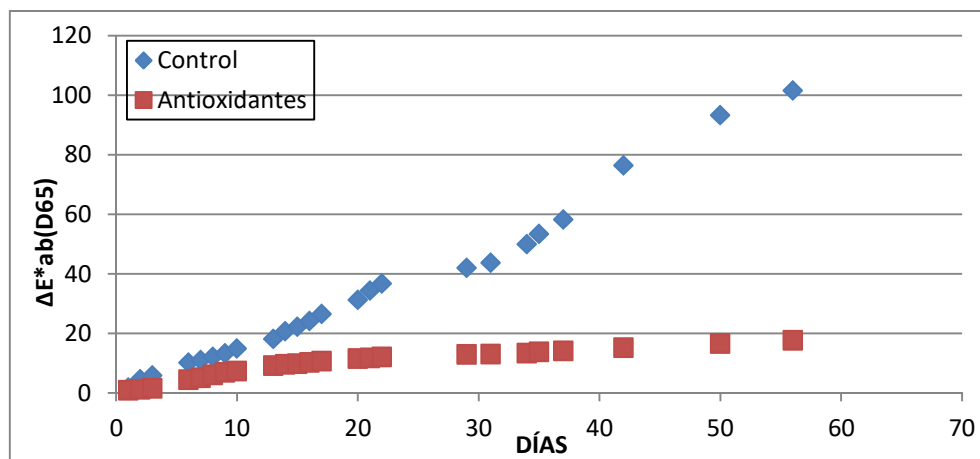


Figura 9.1.8

Foto-estabilidad del AOVE "OG" bajo condiciones de iluminación controlada con lámpara ultravioleta enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,1 mg luteína/ml.

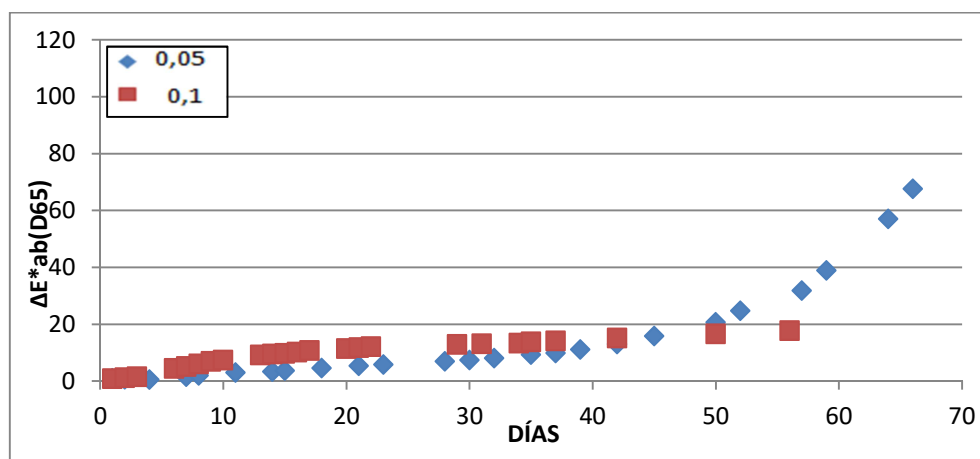


Figura 9.1.9

Comparativa de la Foto-estabilidad de los AOVE´s "OG" enriquecidos con antioxidantes a diferentes concentraciones (0,05 mg luteína/ml y 0,1 mg luteína/ml) bajo condiciones de iluminación controlada con lámpara ultravioleta.

Tabla 9.1.4

Diferencia de color de los 3 AOVE's anteriores enriquecidos con antioxidantes a diferentes concentraciones, izquierda (0,05 mg luteína/ml) y derecha (0,1 mg luteína/ml).

$\Delta E^*_{ab}(D65)$ (0,05 mg luteína/ml)				$\Delta E^*_{ab}(D65)$ (0,1 mg luteína/ml)			
Días	SM	OB	OG	Días	SM	OB	OG
1	1,14	1,23	1,01	1	2,3	2,33	0,89
2	0,96	1,05	0,62	2	2,29	2,16	1,22
4	0,49	0,81	0,52	3	1,31	2,55	1,56
7	0,46	1,27	1,53	6	3,12	5,39	4,43
8	0,71	1,65	1,94	7	3,69	6,2	5,12
11	1,78	2,41	3,01	8	4,99	7,25	6,08
14	2,41	3,22	3,39	9	6,03	8,29	6,97
15	2,22	3,61	3,68	10	6,81	8,77	7,39
18	3,21	4,83	4,58	13	9,66	11,04	9,18
21	4,49	5,74	5,38	14	10,54	11,25	9,59
23	5,35	6,5	5,85	15	10,91	11,58	9,8
28	7,09	8	6,92	16	11,47	11,94	10,26
30	7,99	9,09	7,41	17	12,24	12,53	10,73
32	8,62	10,59	8,11	20	13,89	13,4	11,5
35	9,88	13,4	9,3	21	14,41	13,71	11,74
37	10,29	15,27	9,92	22	15	14,22	12,07
39	10,95	18,12	11,11	29	15,91	14,79	12,93
42	11,89	23,51	12,99	31	16,11	14,93	13,1
45	12,91	30,77	15,79	34	17,1	15,53	13,42
50	14,17	43,59	20,7	35	17,28	15,84	13,8
52	15,23	53,11	24,75	37	17,91	16,3	14,13
57	16,75	68,19	31,83	42	19,14	17,34	15,21
59	18,89	82,6	38,94	50	20	18,72	16,65
64	22,98	107,67	57,05	56	20,97	21,81	17,73
66	25,85	115,92	67,63				



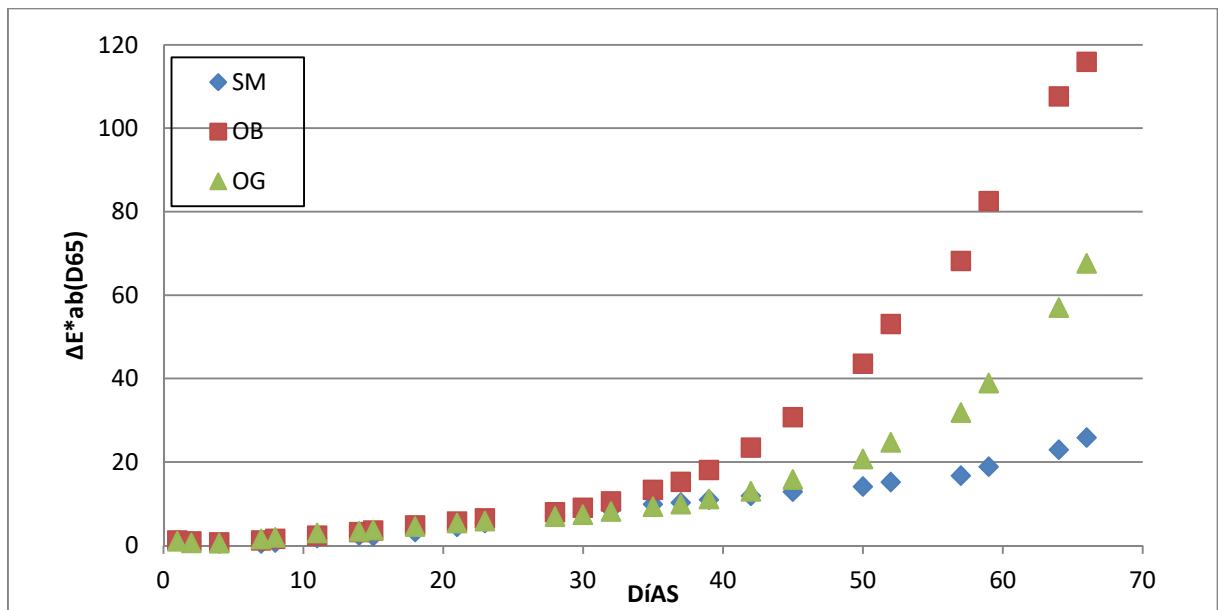


Figura 9.1.10

Diferencias de color CIELAB producidas en AOVE's enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml, como consecuencia de exposición continua a luz ultravioleta.

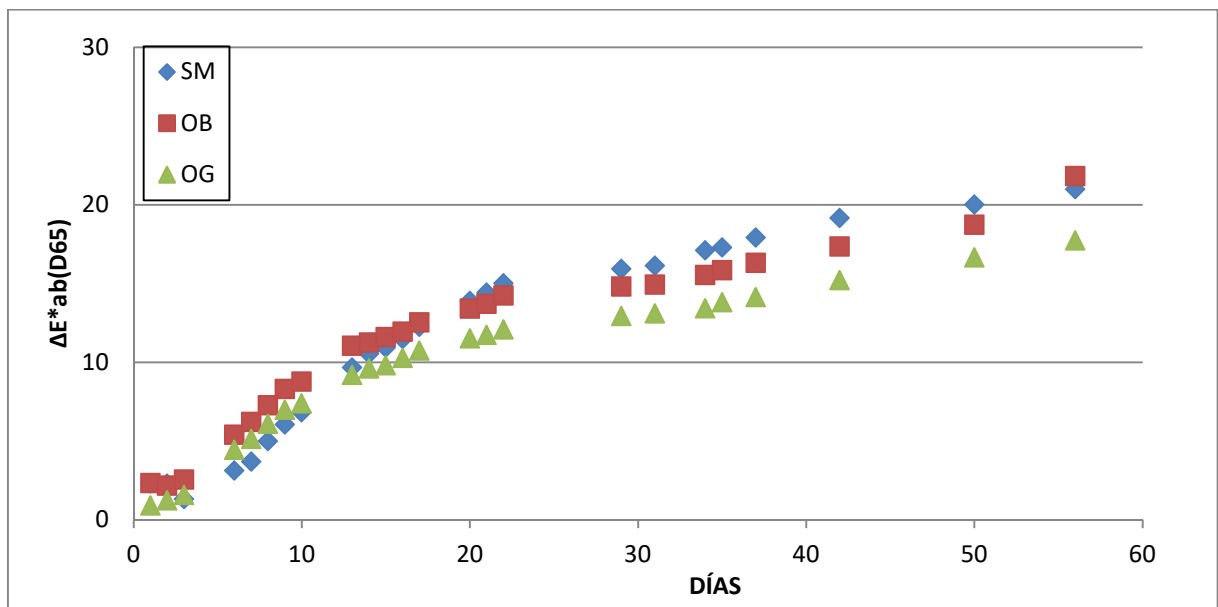


Figura 9.1.11

Diferencias de color CIELAB producidas en AOVE's enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,1 mg luteína/ml, como consecuencia de exposición continua a luz ultravioleta.

Tabla 9.1.5

Diferencia de color de los AOVE's "CCP" (izquierda) y "CCA" (derecha) tanto control como enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

Concentración 0,05 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCP	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCP	Concentración 0,05 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCA	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCA
Días	Control	Antioxidantes	Días	Control	Antioxidantes
1	1,05	1,43	1	0,95	1,57
2	2,84	1,92	2	2,37	2,12
4	4,9	2,75	4	4,02	3,08
7	6,99	3,22	7	5,63	3,89
8	7,74	3,3	8	6,11	4,12
11	9,6	3,33	11	7,43	4,48
14	11,38	3,57	14	8,97	4,57
15	12,18	3,65	15	9,68	4,71
18	14,13	4,18	18	11,8	5,16
21	16,37	4,39	21	13,92	5,45
23	17,81	4,63	23	15,34	5,58
28	22,02	5,43	28	19,45	5,87
30	23,89	6,01	30	21,56	6,07
32	25,93	6,75	32	23,9	6,36
35	29,16	8,22	35	27,69	6,97
37	31,13	9,27	37	29,93	7,24
39	33,47	10,75	39	32,75	8,02
42	37,27	13,39	42	37,45	9,2
45	41,27	16,94	45	42,78	10,96
50	46,76	23,11	50	50,35	14,65
52	49,91	27,72	52	54,66	17,83
57	54,68	35,29	57	62,35	23,25
59	58,83	44,66	59	69,56	29,95
64	68	75,49	64	84,66	52,23
66	74,77	89,67	66	91	66,77



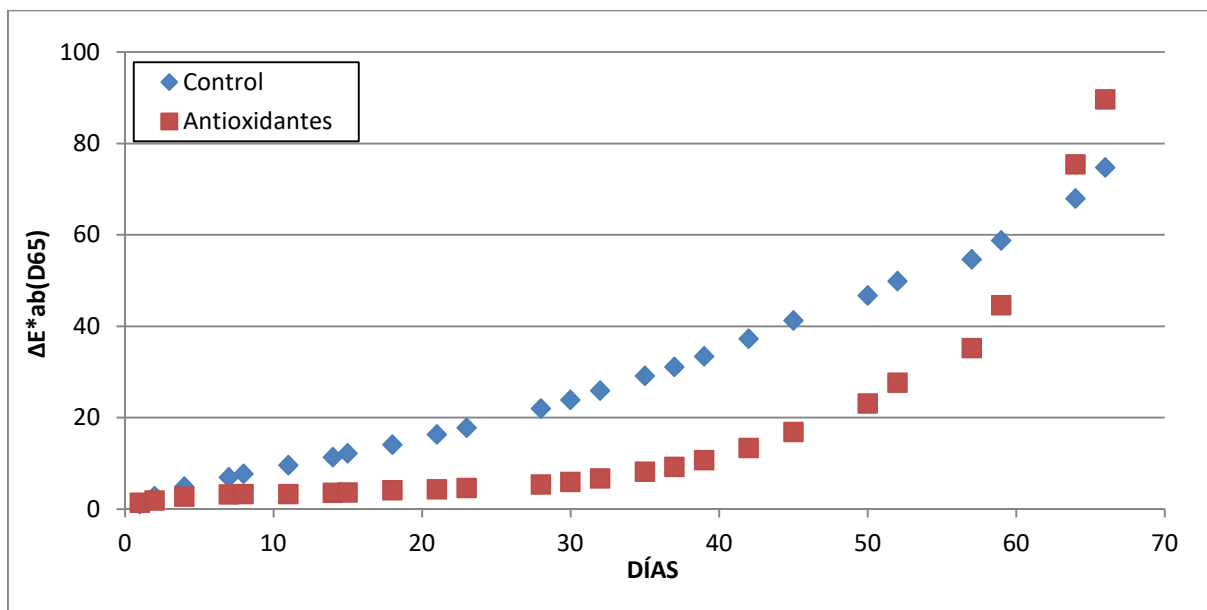


Figura 9.1.12

Variación de los parámetros colorimétricos del AOVE "CCP" enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml, bajo condiciones de iluminación controlada con lámpara ultravioleta.

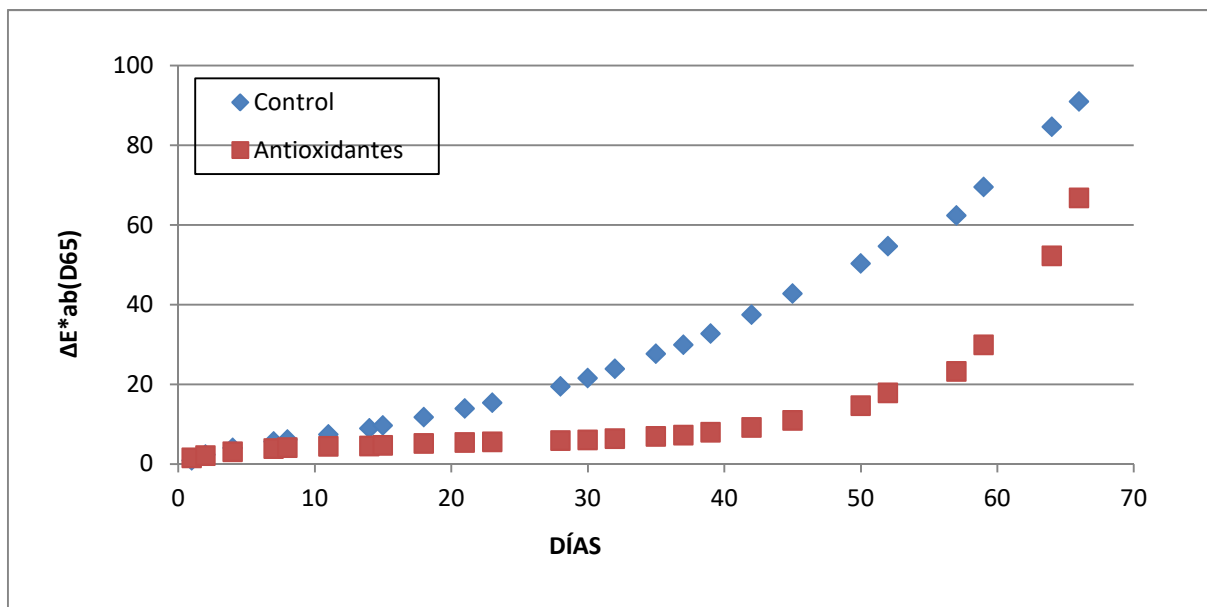


Figura 9.1.13

Variación de los parámetros colorimétricos del AOVE "CCA" enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml, bajo condiciones de iluminación controlada con lámpara ultravioleta.

Tabla 9.1.6
Comparativa de la diferencia de color de los 5 AOVE's controles.

$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CONTROLES					
Días	SM	OB	OG	CCP	CCA
1	1,1	0,89	0,81	1,05	0,95
2	1,76	1,84	1,94	2,84	2,37
4	2,64	3,25	4,62	4,9	4,02
7	4,11	5,89	7,48	6,99	5,63
8	4,44	6,73	8,26	7,74	6,11
11	5,9	9,69	10,68	9,6	7,43
14	7,76	12,92	13,3	11,38	8,97
15	8,77	14,4	14,57	12,18	9,68
18	11,49	18,4	17,97	14,13	11,8
21	14,61	22,49	21,46	16,37	13,92
23	16,56	25,45	23,92	17,81	15,34
28	21,81	33,45	30,75	22,02	19,45
30	24,1	37,35	33,88	23,89	21,56
32	26,6	41,5	37,46	25,93	23,9
35	30,45	48,56	43,33	29,16	27,69
37	32,71	52,91	46,86	31,13	29,93
39	35,55	57,92	51,08	33,47	32,75
42	40	67,38	58,61	37,27	37,45
45	44,96	78,04	67,7	41,27	42,78
50	51,89	93,9	83,54	46,76	50,35
52	55,93	100,21	92,47	49,91	54,66
57	61,86	106,69	102,45	54,68	62,35
59	67,08	109,74	107,26	58,83	69,56
64	77,44	112,57	111,67	68	84,66
66	82,54	113,24	112,59	74,77	91

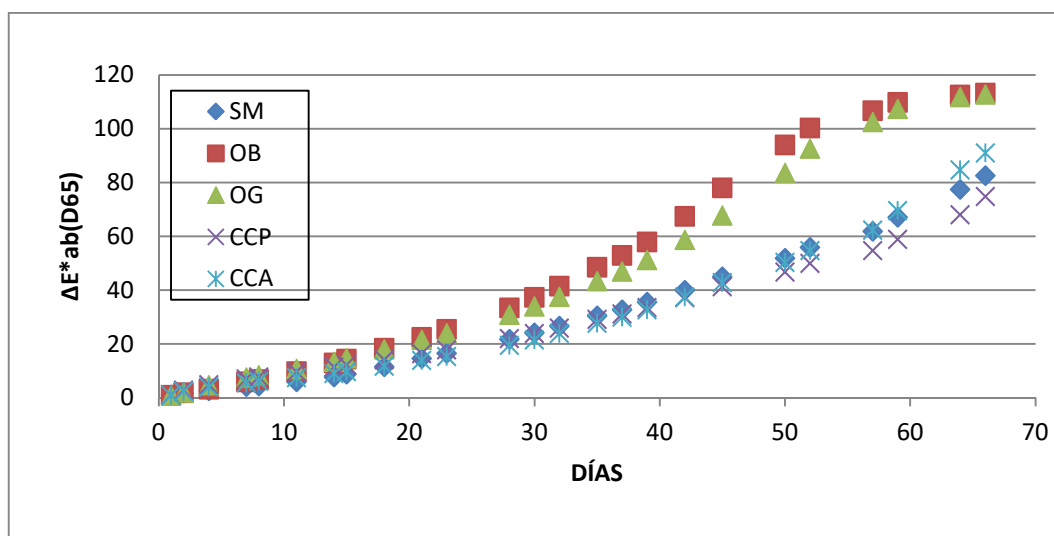


Figura 9.1.14
Foto-estabilidad de los AOVE's controles bajo condiciones de iluminación ultravioleta.

Tabla 9.1.7

Comparativa de la diferencia de color de los 5 AOVE's enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

$\Delta E^*_{ab}(D65)$ ANTIOXIDANTES (0,05 mg luteína /ml)					
Días	SM	OB	OG	CCP	CCA
1	1,14	1,23	1,01	1,43	1,57
2	0,96	1,05	0,62	1,92	2,12
4	0,49	0,81	0,52	2,75	3,08
7	0,46	1,27	1,53	3,22	3,89
8	0,71	1,65	1,94	3,3	4,12
11	1,78	2,41	3,01	3,33	4,48
14	2,41	3,22	3,39	3,57	4,57
15	2,22	3,61	3,68	3,65	4,71
18	3,21	4,83	4,58	4,18	5,16
21	4,49	5,74	5,38	4,39	5,45
23	5,35	6,5	5,85	4,63	5,58
28	7,09	8	6,92	5,43	5,87
30	7,99	9,09	7,41	6,01	6,07
32	8,62	10,59	8,11	6,75	6,36
35	9,88	13,4	9,3	8,22	6,97
37	10,29	15,27	9,92	9,27	7,24
39	10,95	18,12	11,11	10,75	8,02
42	11,89	23,51	12,99	13,39	9,2
45	12,91	30,77	15,79	16,94	10,96
50	14,17	43,59	20,7	23,11	14,65
52	15,23	53,11	24,75	27,72	17,83
57	16,75	68,19	31,83	35,29	23,25
59	18,89	82,6	38,94	44,66	29,95
64	22,98	107,67	57,05	75,49	52,23
66	25,85	115,92	67,63	89,67	66,77

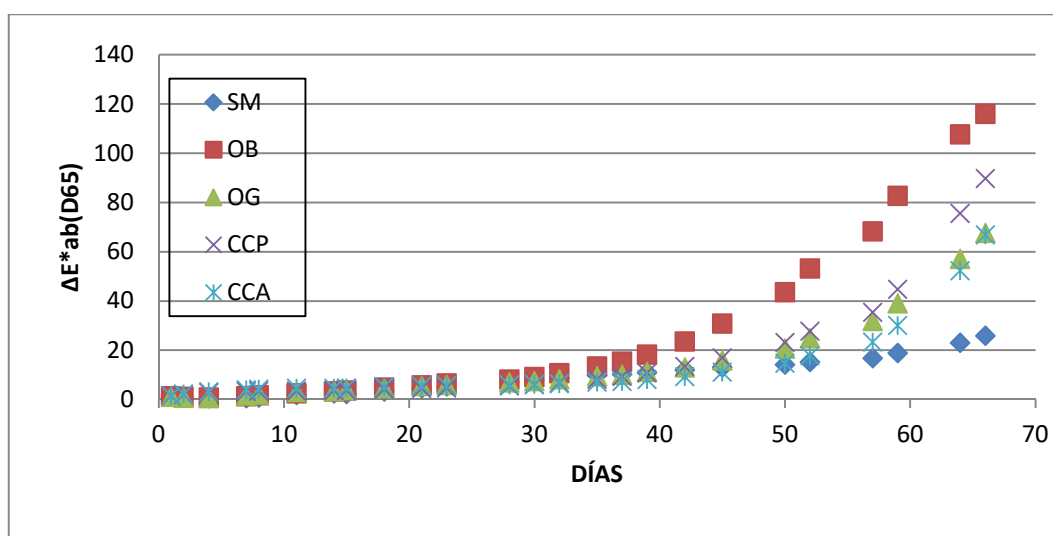
**Figura 9.1.15**

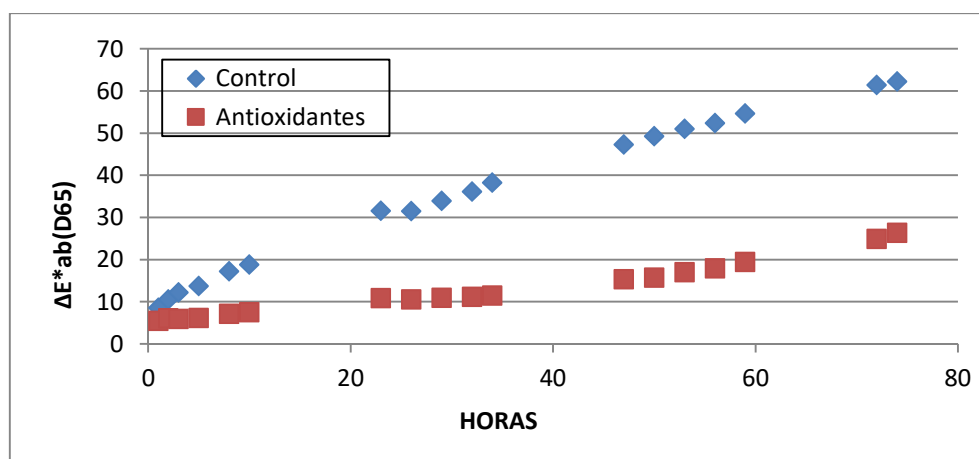
Foto-estabilidad de los AOVE's enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml bajo condiciones de iluminación ultravioleta.

Tabla 9.1.8

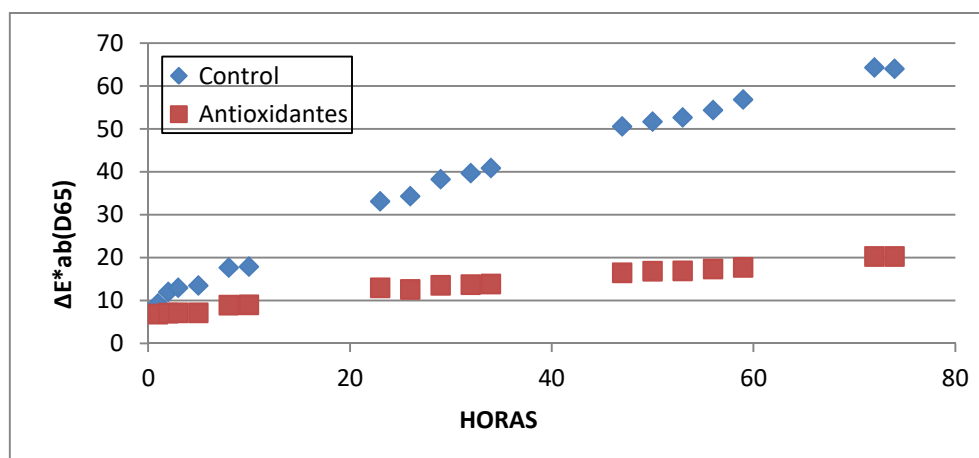
Diferencia de color de los AOVE's "SM" tanto control como enriquecidos con antioxidantes a diferentes concentraciones, izquierda (0,05 mg luteína/ml) y derecha (0,1 mg luteína/ml).

Concentración 0,05 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ SM	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ SM	Concentración 0,1 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ SM	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ SM
Horas	Control	Antioxidantes	Horas	Control	Antioxidantes
1	8,58	5,46	1	9,33	6,86
2	10,55	6,01	2	12	7,09
3	12,21	5,93	3	12,94	7,13
5	13,7	6,1	5	13,5	7,13
8	17,19	7,08	8	17,63	8,89
10	18,82	7,48	10	17,84	9
23	31,56	10,86	23	33,1	12,94
26	31,5	10,51	26	34,25	12,55
29	33,92	10,87	29	38,2	13,57
32	36,15	11,16	32	39,66	13,69
34	38,21	11,46	34	40,83	13,84
47	47,25	15,31	47	50,53	16,46
50	49,27	15,7	50	51,67	16,82
53	51,01	16,98	53	52,6	16,89
56	52,35	17,9	56	54,31	17,32
59	54,61	19,4	59	56,79	17,75
72	61,39	24,87	72	64,29	20,24
74	62,25	26,32	74	64	20,28

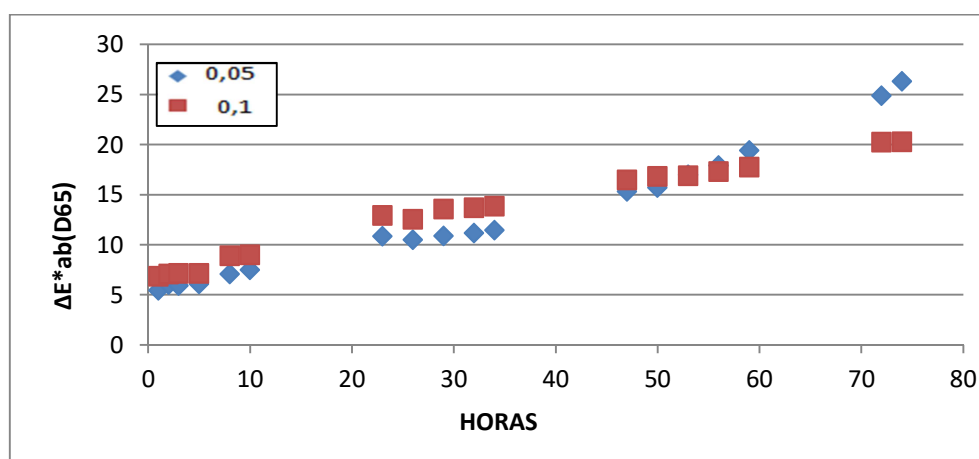


**Figura 9.1.16**

Termo-estabilidad del AOVE "SM" en función del tiempo de calentamiento a 120°C enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

**Figura 9.1.17**

Termo-estabilidad del AOVE "SM" en función del tiempo de calentamiento a 120°C enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,1 mg luteína/ml.

**Figura 9.1.18**

Comparativa de la Termo-estabilidad de los AOVE's "SM" enriquecidos con antioxidantes a diferentes concentraciones (0,05 mg luteína/ml y 0,1 mg luteína/ml) en función del tiempo de calentamiento a 120°C.

Tabla 9.1.9

Diferencia de color de los AOVE's "OB" tanto control como enriquecidos con antioxidantes a diferentes concentraciones, izquierda (0,05 mg luteína/ml) y derecha (0,1 mg luteína/ml).

Concentración 0,05 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OB	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OB
Horas	Control	Antioxidantes
1	9,87	4,34
2	10,8	4,27
3	12,26	4,88
5	13,17	5,17
8	16,03	5,97
10	17,63	6,22
23	28,83	9,2
26	30,29	8,8
29	32,78	9,58
32	34,01	9,67
34	36,28	10,21
47	45,43	13,74
50	46,3	13,64
53	48,34	14,77
56	49,6	15,56
59	52	16,84
72	58,78	21,77
74	59,56	23,01

Concentración 0,1 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OB	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OB
Horas	Control	Antioxidantes
1	10,46	7,26
2	11,18	7,43
3	10,72	7,31
5	11,85	8,2
8	15,94	8,99
10	16,45	9,04
23	28,52	12,42
26	29,9	12,47
29	32,3	13,14
32	34	13,21
34	34,88	13,42
47	41,76	15,44
50	43,39	15,52
53	44,85	16,06
56	46,53	16,61
59	47,66	16,92
72	54,83	19,23
74	54,74	18,85

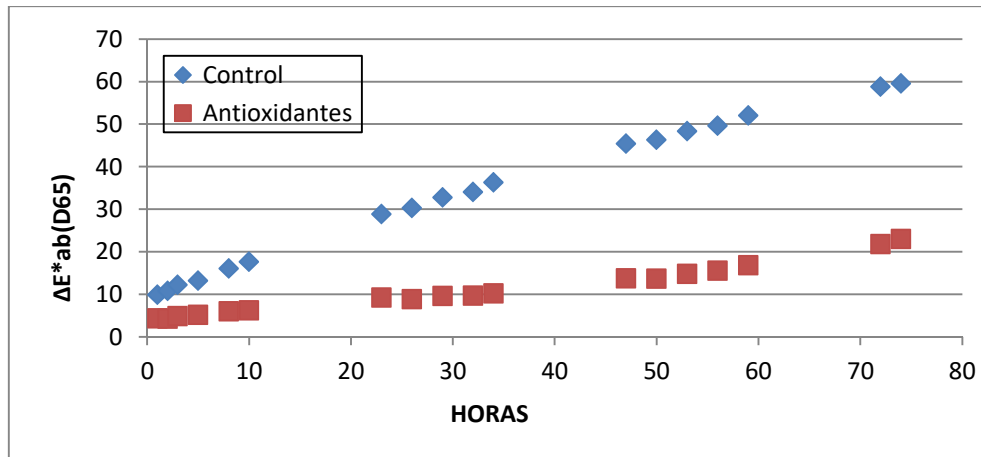


Figura 9.1.19

Termo-estabilidad del AOVE "OB" en función del tiempo de calentamiento a 120°C enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

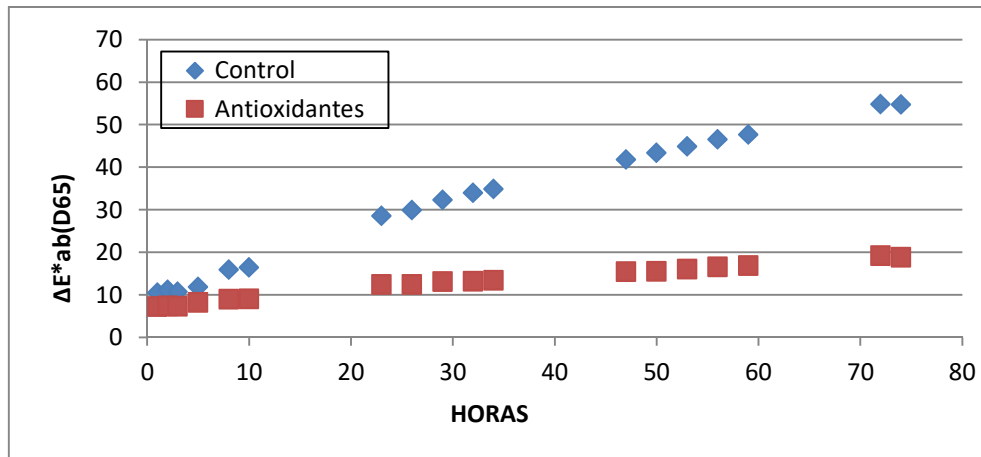


Figura 9.1.20

Termo-estabilidad del AOVE "OB" en función del tiempo de calentamiento a 120°C enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,1 mg luteína/ml.

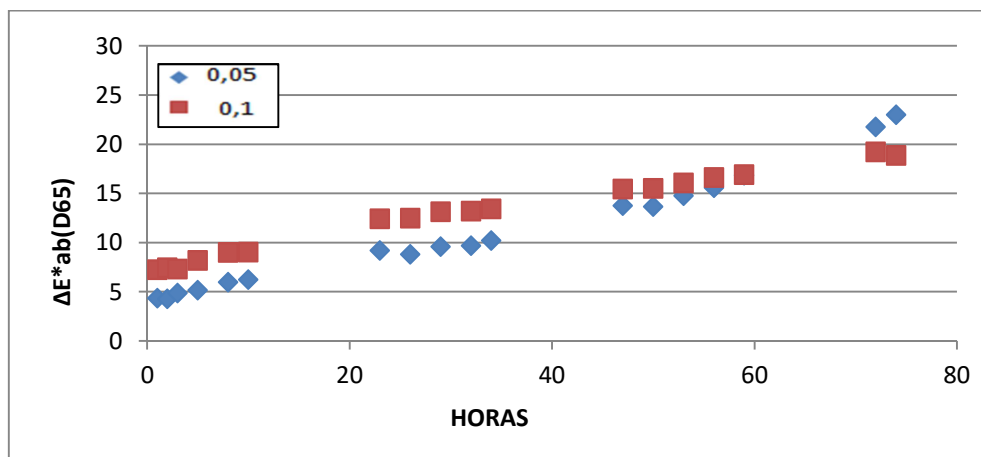


Figura 9.1.21

Comparativa de la Termo-estabilidad de los AOVE's "OB" enriquecidos con antioxidantes a diferentes concentraciones (0,05 mg luteína/ml y 0,1 mg luteína/ml) en función del tiempo de calentamiento a 120°C.

Tabla 9.1.10

Diferencia de color de los AOVE's "OG" tanto control como enriquecidos con antioxidantes a diferentes concentraciones, izquierda (0,05 mg luteína/ml) y derecha (0,1 mg luteína/ml).

Concentración 0,05 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OG	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OG	Concentración 0,1 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OG	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OG
Horas	Control	Antioxidantes	Horas	Control	Antioxidantes
1	8,37	4,21	1	8,45	7,12
2	9,51	4,49	2	9,55	7,06
3	9,96	4,4	3	9,44	7,04
5	10,31	4,46	5	9,94	7,05
8	13,09	5,26	8	12,52	8,43
10	14,98	5,48	10	13,25	8,13
23	25,25	7,71	23	21,26	11,56
26	26,38	7,82	26	26,29	11,76
29	28,75	8,27	29	30,08	12,33
32	29,27	8,21	32	32,84	12,14
34	31,44	9,2	34	34,91	12,95
47	39,84	11,82	47	43,37	15,33
50	43,05	12,69	50	45,37	15,5
53	44,57	13,91	53	47,54	15,82
56	46,92	14,84	56	49,96	16,05
59	47,85	15,34	59	52,31	16,76
72	57,18	23,61	72	60,74	19,05
74	58,72	24,94	74	61,17	19,02

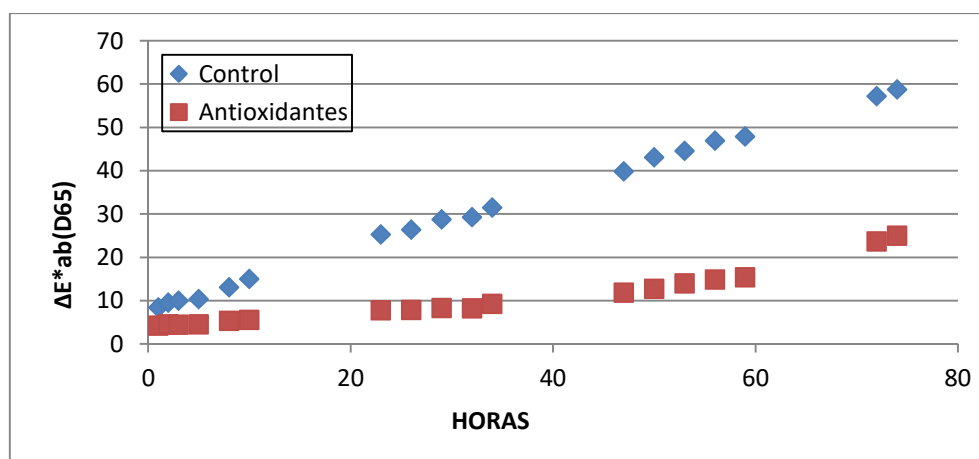


Figura 9.1.22

Termo-estabilidad del AOVE "OG" en función del tiempo de calentamiento a 120°C enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

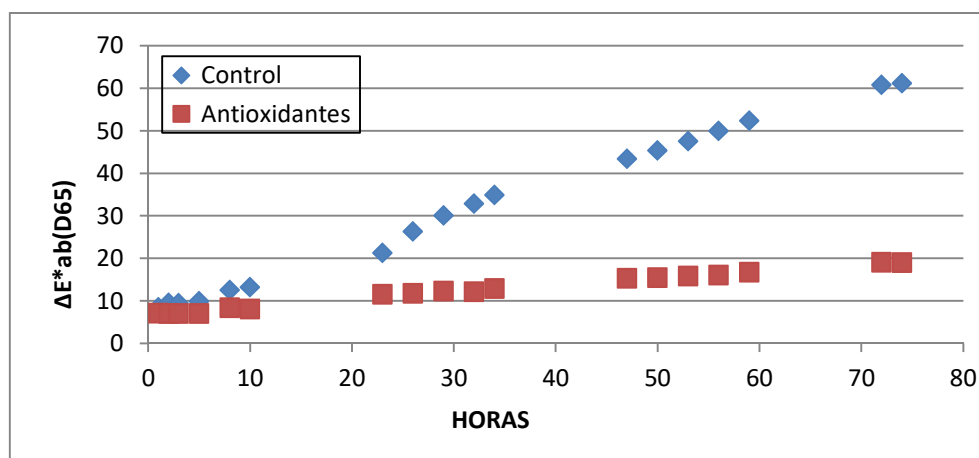


Figura 9.1.23

Termo-estabilidad del AOVE "OG" en función del tiempo de calentamiento a 120°C enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,1 mg luteína/ml.

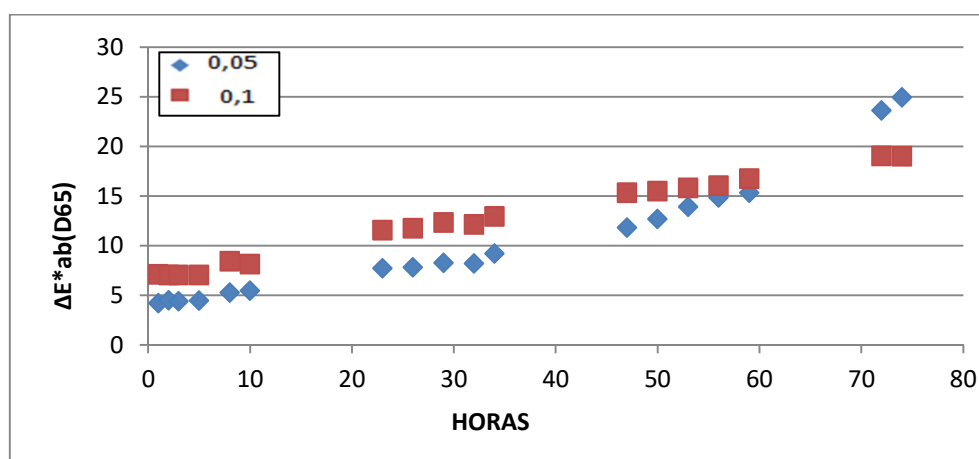


Figura 9.1.24

Comparativa de la Termo-estabilidad de los AOVE's "OG" enriquecidos con antioxidantes a diferentes concentraciones (0,05 mg luteína/ml y 0,1 mg luteína/ml) en función del tiempo de calentamiento a 120°C.

Tabla 9.1.11

Diferencia de color de los AOVE´s "CCP" tanto control como enriquecidos con antioxidantes a diferentes concentraciones, izquierda (0,05 mg luteína/ml) y derecha (0,1 mg luteína/ml).

Concentración 0,05 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCP	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCP	Concentración 0,1 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCP	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCP
Horas	Control	Antioxidantes	Horas	Control	Antioxidantes
1	12,15	5,26	1	8,45	7,12
2	13,93	5,89	2	9,55	7,06
3	15,03	6,18	3	9,44	7,04
5	16,93	6,87	5	9,94	7,05
8	20,89	8,02	8	12,52	8,43
10	22,61	8,56	10	13,25	8,13
23	35,93	12,46	23	21,26	11,56
26	37,51	12,23	26	26,29	11,76
29	39,53	12,91	29	30,08	12,33
32	41,24	13,14	32	32,84	12,14
34	42,85	13,42	34	34,91	12,95
47	52	18,97	47	43,37	15,33
50	52,73	19,87	50	45,37	15,5
53	54,18	21,63	53	47,54	15,82
56	55,26	22,58	56	49,96	16,05
59	56,64	23,65	59	52,31	16,76
72	63,43	31,48	72	60,74	19,05
74	63,39	34,13	74	61,17	19,02

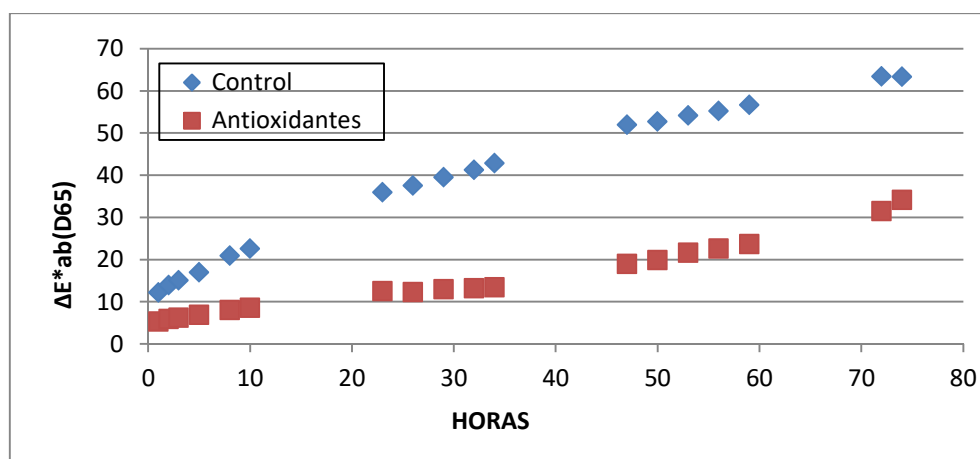


Figura 9.1.25

Termo-estabilidad del AOVE "CCP" en función del tiempo de calentamiento a 120°C enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

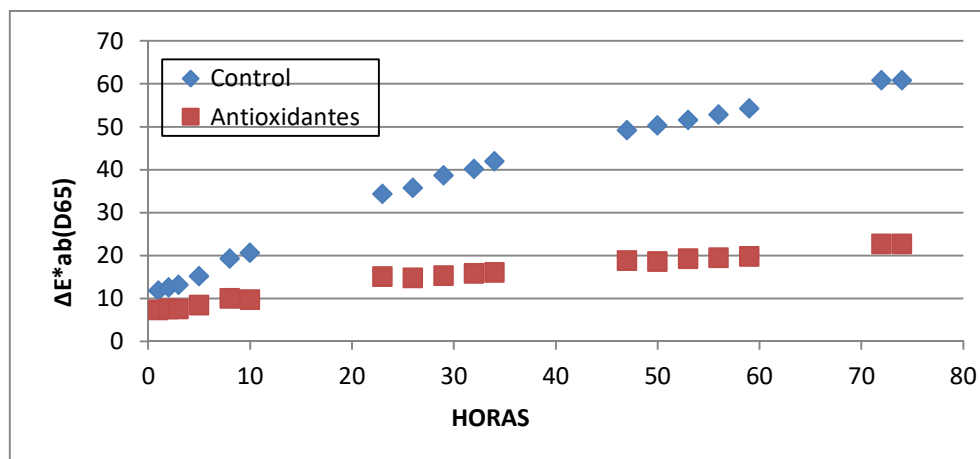


Figura 9.1.26

Termo-estabilidad del AOVE "CCP" en función del tiempo de calentamiento a 120°C enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,1 mg luteína/ml.

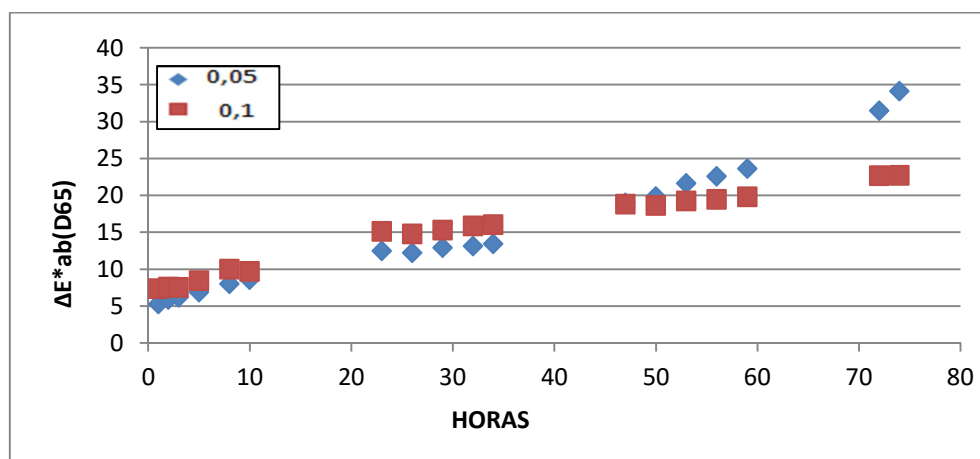


Figura 9.1.27

Comparativa de la Termo-estabilidad de los AOVE's "CCP" enriquecidos con antioxidantes a diferentes concentraciones (0,05 mg luteína/ml y 0,1 mg luteína/ml) en función del tiempo de calentamiento a 120°C.

Tabla 9.1.12

Diferencia de color de los AOVE's "CCA" tanto control como enriquecidos con antioxidantes a diferentes concentraciones, izquierda (0,05 mg luteína/ml) y derecha (0,1 mg luteína/ml).

Concentración 0,05 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCA	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCA
Horas	Control	Antioxidantes
1	10,44	6,21
2	12,94	6,66
3	15,36	6,8
5	18,33	7,27
8	23,4	8,95
10	26,23	9,55
23	43,12	13,82
26	46,24	14,12
29	49,38	14,67
32	51,2	15,36
34	54,29	16,4
47	64,21	21,61
50	65,71	23,01
53	67,5	24,85
56	69,09	25,72
59	70,74	28,41
72	76,78	38,58
74	77,39	40,01

Concentración 0,1mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCA	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCA
Horas	Control	Antioxidantes
1	10,9	7,28
2	14,08	7,71
3	14,02	8,49
5	16,65	9,3
8	21,58	11,46
10	25,04	11,63
23	42,28	16,38
26	45,7	16,96
29	48,34	17,6
32	51,13	18,17
34	52,87	18,36
47	62,73	21,27
50	63,87	21,62
53	65,67	22,2
56	67,42	22,64
59	69,14	23,17
72	75,71	23,78
74	76,08	25,03

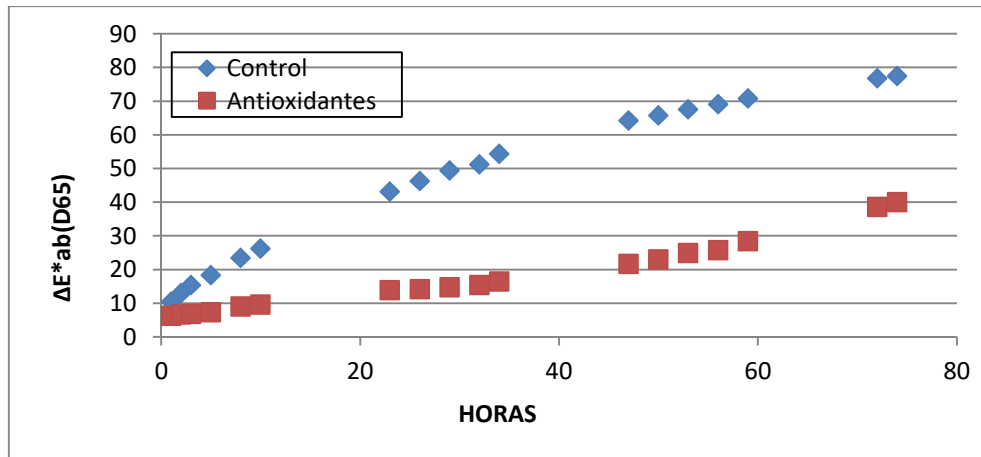


Figura 9.1.28

Termo-estabilidad del AOVE "CCA" en función del tiempo de calentamiento a 120°C enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

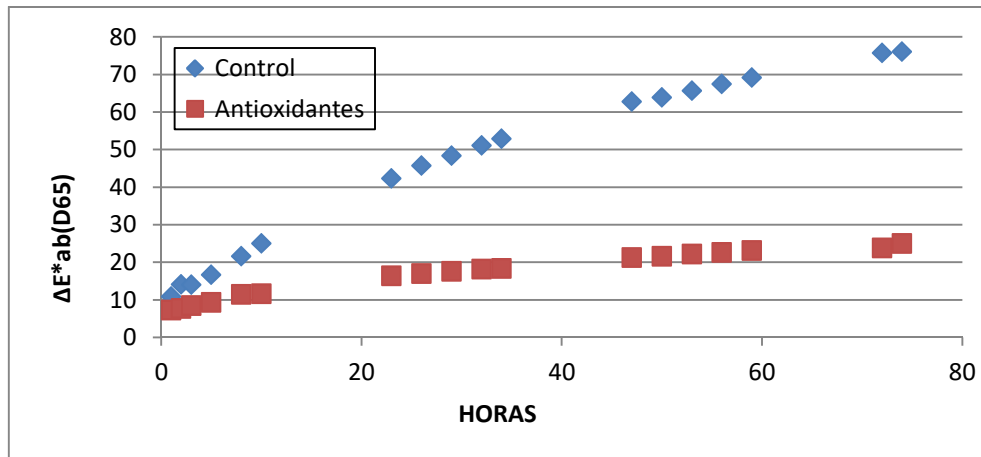


Figura 9.1.29

Termo-estabilidad del AOVE "CCA" en función del tiempo de calentamiento a 120°C enriquecido con antioxidantes a una concentración de 0,1 mg luteína/ml.

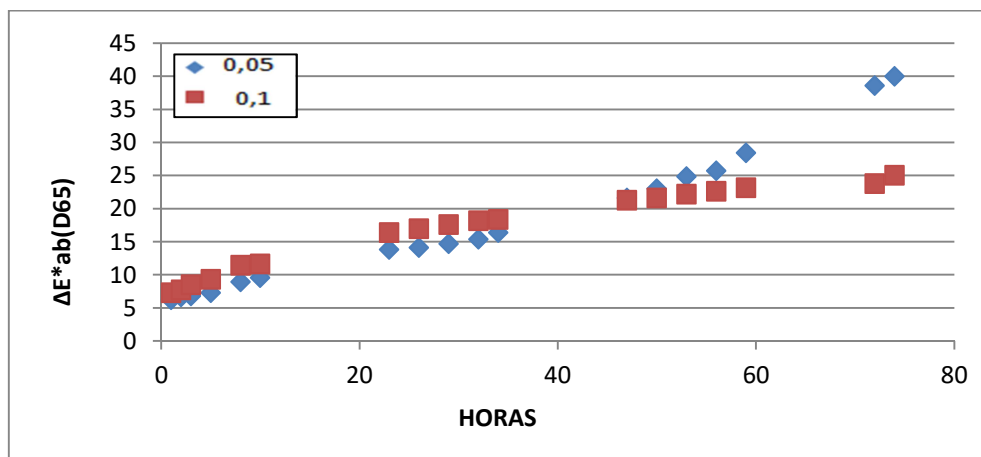


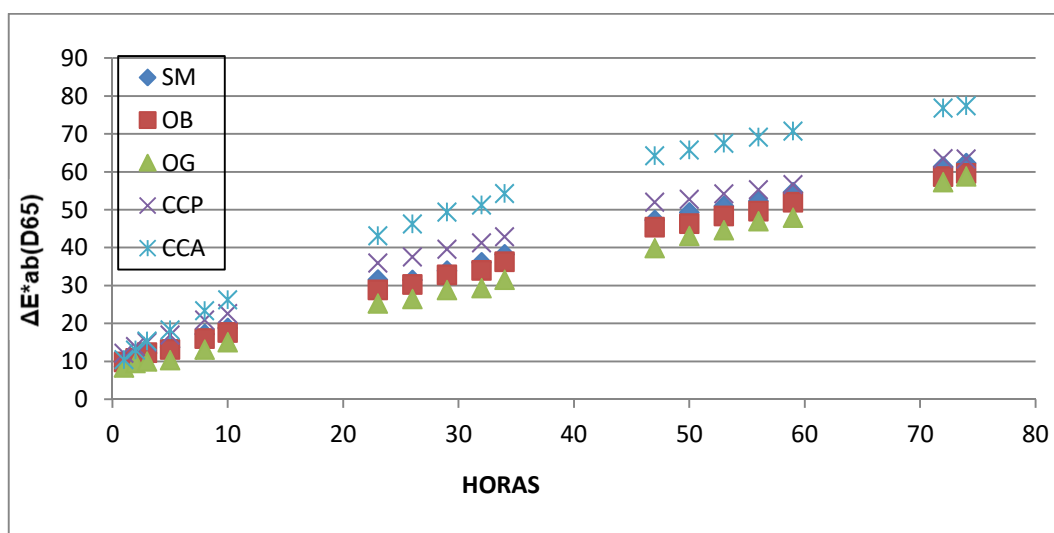
Figura 9.1.30

Comparativa de la Termo-estabilidad de los AOVE's "CCA" enriquecidos con antioxidantes a diferentes concentraciones (0,05 mg luteína/ml y 0,1 mg luteína/ml) en función del tiempo de calentamiento a 120°C.

Tabla 9.1.13

Comparativa en la diferencia de color de los 5 AOVE's controles para el ensayo de 0,05 mg luteína/ml.

$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CONTROLES					
Horas	SM	OB	OG	CCP	CCA
1	8,58	9,87	8,37	12,15	10,44
2	10,55	10,8	9,51	13,93	12,94
3	12,21	12,26	9,96	15,03	15,36
5	13,7	13,17	10,31	16,93	18,33
8	17,19	16,03	13,09	20,89	23,4
10	18,82	17,63	14,98	22,61	26,23
23	31,56	28,83	25,25	35,93	43,12
26	31,5	30,29	26,38	37,51	46,24
29	33,92	32,78	28,75	39,53	49,38
32	36,15	34,01	29,27	41,24	51,2
34	38,21	36,28	31,44	42,85	54,29
47	47,25	45,43	39,84	52	64,21
50	49,27	46,3	43,05	52,73	65,71
53	51,01	48,34	44,57	54,18	67,5
56	52,35	49,6	46,92	55,26	69,09
59	54,61	52	47,85	56,64	70,74
72	61,39	58,78	57,18	63,43	76,78
74	62,25	59,56	58,72	63,39	77,39

**Figura 9.1.31**

Termo-estabilidad de los AOVE's controles en función del tiempo de calentamiento a 120°C. Estos datos corresponden a los aceites control sin enriquecer.

Tabla 9.1.14

Comparativa en la diferencia de color de los 5 AOVE's controles para el ensayo de 0,1mg luteína/ml.

$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CONTROLES					
Horas	SM	OB	OG	CCP	CCA
1	9,33	10,46	8,45	11,83	10,9
2	12	11,18	9,55	12,57	14,08
3	12,94	10,72	9,44	13,18	14,02
5	13,5	11,85	9,94	15,19	16,65
8	17,63	15,94	12,52	19,28	21,58
10	17,84	16,45	13,25	20,59	25,04
23	33,1	28,52	21,26	34,33	42,28
26	34,25	29,9	26,29	35,74	45,7
29	38,2	32,3	30,08	38,66	48,34
32	39,66	34	32,84	40,12	51,13
34	40,83	34,88	34,91	41,92	52,87
47	50,53	41,76	43,37	49,16	62,73
50	51,67	43,39	45,37	50,28	63,87
53	52,6	44,85	47,54	51,57	65,67
56	54,31	46,53	49,96	52,84	67,42
59	56,79	47,66	52,31	54,26	69,14
72	64,29	54,83	60,74	60,84	75,71
74	64	54,74	61,17	60,79	76,08

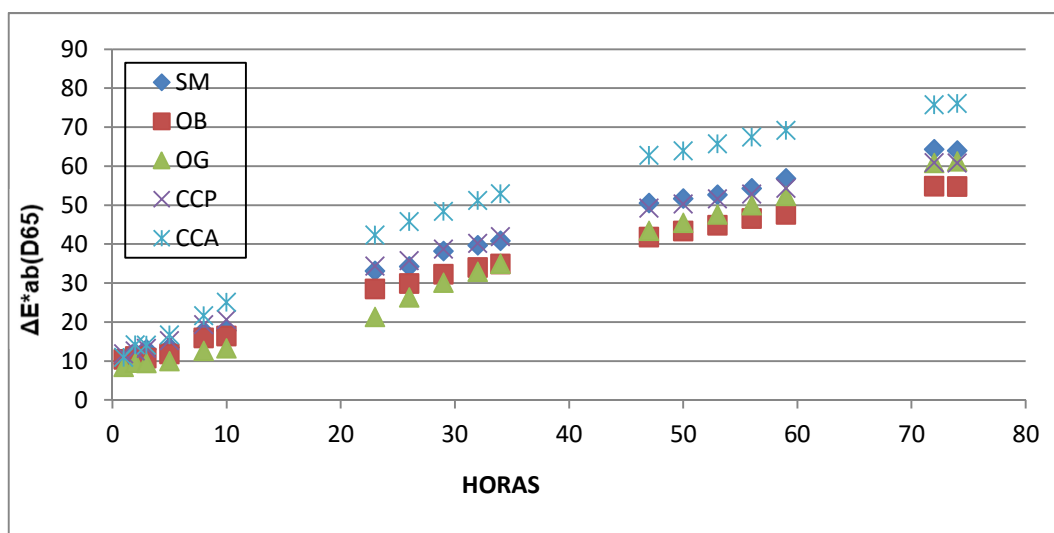


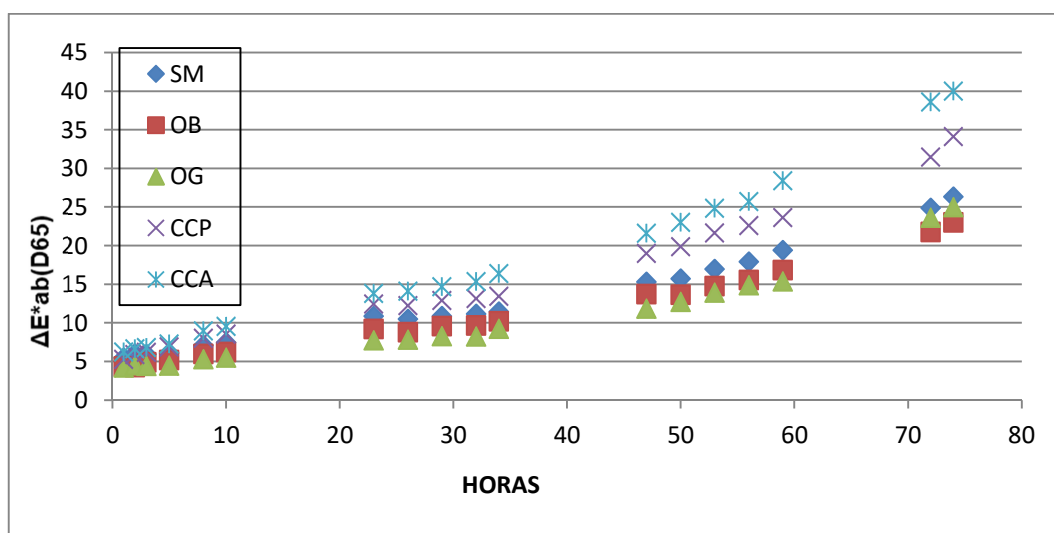
Figura 9.1.32

Termo-estabilidad de los AOVE's controles en función del tiempo de calentamiento a 120°C. Estos datos corresponden a los aceites control sin enriquecer.

Tabla 9.1.15

Comparativa en la diferencia de color de los 5 AOVE's enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

$\Delta E^*_{ab}(D65)$ ANTIOXIDANTES (0,05 mg luteína/ml)					
Horas	SM	OB	OG	CCP	CCA
1	5,46	4,34	4,21	5,26	6,21
2	6,01	4,27	4,49	5,89	6,66
3	5,93	4,88	4,4	6,18	6,8
5	6,1	5,17	4,46	6,87	7,27
8	7,08	5,97	5,26	8,02	8,95
10	7,48	6,22	5,48	8,56	9,55
23	10,86	9,2	7,71	12,46	13,82
26	10,51	8,8	7,82	12,23	14,12
29	10,87	9,58	8,27	12,91	14,67
32	11,16	9,67	8,21	13,14	15,36
34	11,46	10,21	9,2	13,42	16,4
47	15,31	13,74	11,82	18,97	21,61
50	15,7	13,64	12,69	19,87	23,01
53	16,98	14,77	13,91	21,63	24,85
56	17,9	15,56	14,84	22,58	25,72
59	19,4	16,84	15,34	23,65	28,41
72	24,87	21,77	23,61	31,48	38,58
74	26,32	23,01	24,94	34,13	40,01

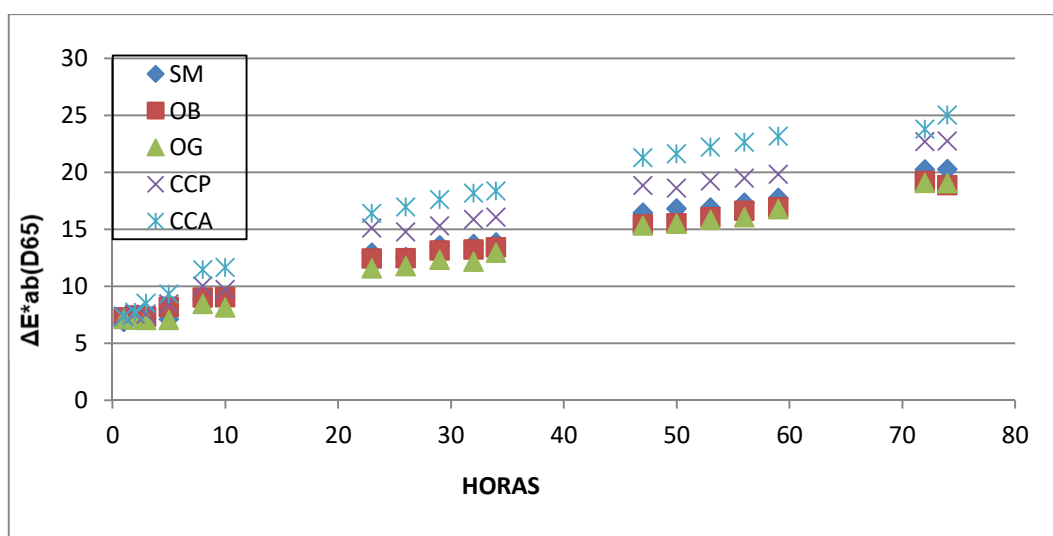
**Figura 9.1.33**

Variación de los parámetros colorimétricos en AOVE's enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

Tabla 9.1.16

Comparativa en la diferencia de color de los 5 AOVE's enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,1 mg luteína/ml.

$\Delta E^*_{ab}(D65)$ ANTIOXIDANTES (0,1 mg luteína/ml)					
Horas	SM	OB	OG	CCP	CCA
1	6,86	7,26	7,12	7,37	7,28
2	7,09	7,43	7,06	7,57	7,71
3	7,13	7,31	7,04	7,53	8,49
5	7,13	8,2	7,05	8,43	9,3
8	8,89	8,99	8,43	10,02	11,46
10	9	9,04	8,13	9,71	11,63
23	12,94	12,42	11,56	15,11	16,38
26	12,55	12,47	11,76	14,77	16,96
29	13,57	13,14	12,33	15,3	17,6
32	13,69	13,21	12,14	15,87	18,17
34	13,84	13,42	12,95	16,05	18,36
47	16,46	15,44	15,33	18,83	21,27
50	16,82	15,52	15,5	18,62	21,62
53	16,89	16,06	15,82	19,24	22,2
56	17,32	16,61	16,05	19,48	22,64
59	17,75	16,92	16,76	19,83	23,17
72	20,24	19,23	19,05	22,68	23,78
74	20,28	18,85	19,02	22,73	25,03

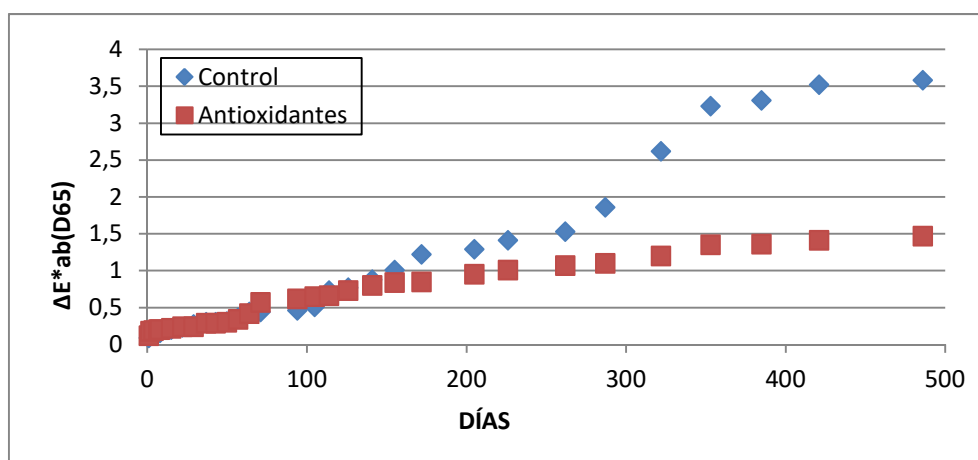
**Figura 9.1.34**

Variación de los parámetros colorimétricos en AOVE's enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,1 mg luteína/ml.

Tabla 9.1.17

Diferencia de color de los AOVE´s "SM" tanto control como enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

Concentración 0,05	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ SM	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ SM
Días	Control	Antioxidantes
1	0,09	0,12
2	0,13	0,18
4	0,13	0,19
7	0,16	0,2
8	0,16	0,2
15	0,2	0,22
22	0,23	0,24
29	0,27	0,24
37	0,3	0,29
43	0,3	0,29
50	0,31	0,3
57	0,36	0,34
64	0,44	0,42
71	0,44	0,57
94	0,46	0,62
105	0,51	0,65
114	0,73	0,66
126	0,77	0,73
141	0,88	0,8
155	1,01	0,84
172	1,22	0,85
205	1,29	0,95
226	1,41	1,01
262	1,53	1,07
287	1,86	1,1
322	2,62	1,2
353	3,23	1,35
385	3,31	1,36
421	3,52	1,41
486	3,58	1,47

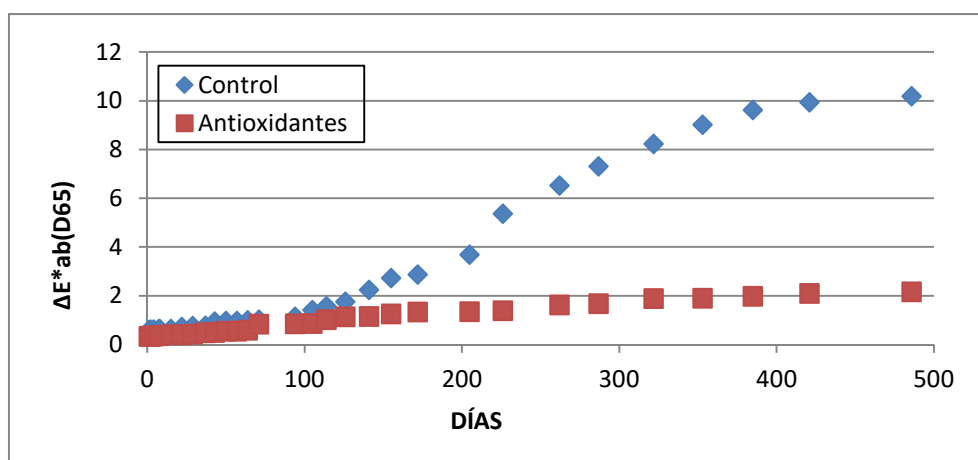
**Figura 9.1.35**

Estabilidad temporal del AOVE "SM" bajo condiciones de almacenamiento seco y en oscuridad a temperatura ambiente (20 °C).

Tabla 9.1.18

Diferencia de color de los AOVE´s "OB" tanto control como enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

Concentración 0,05	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OB	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OB
Días	Control	Antioxidantes
1	0,58	0,34
2	0,61	0,34
4	0,61	0,35
7	0,61	0,36
8	0,64	0,38
15	0,64	0,4
22	0,71	0,4
29	0,75	0,42
37	0,77	0,48
43	0,94	0,49
50	0,96	0,54
57	0,96	0,54
64	0,99	0,59
71	1,02	0,83
94	1,13	0,84
105	1,41	0,86
114	1,57	1,02
126	1,75	1,14
141	2,24	1,15
155	2,72	1,25
172	2,87	1,33
205	3,68	1,34
226	5,36	1,38
262	6,52	1,62
287	7,31	1,67
322	8,23	1,88
353	9,01	1,9
385	9,62	1,97
421	9,94	2,09
486	10,18	2,16

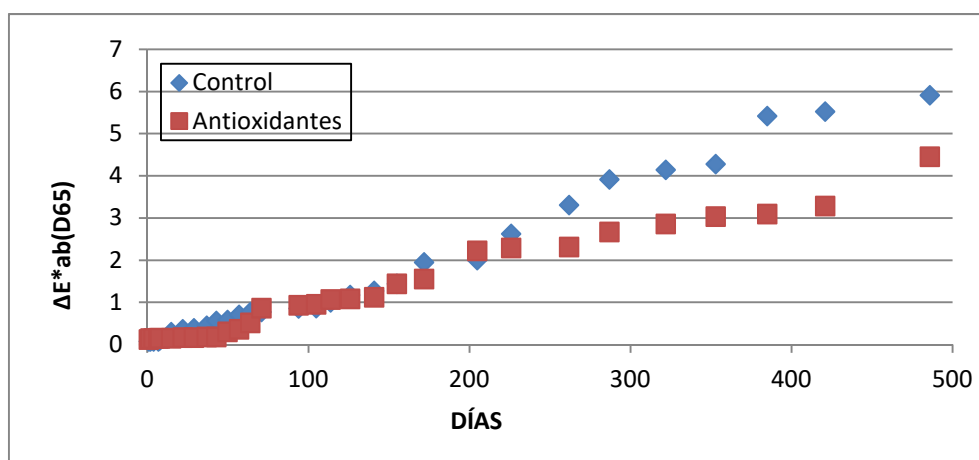
**Figura 9.1.36**

Estabilidad temporal del AOVE "OB" bajo condiciones de almacenamiento seco y en oscuridad a temperatura ambiente (20 °C).

Tabla 9.1.19

Diferencia de color de los AOVE's "OG" tanto control como enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

Concentración 0,05	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OG	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OG
Días	Control	Antioxidantes
1	0,07	0,12
2	0,07	0,14
4	0,07	0,14
7	0,07	0,15
8	0,1	0,15
15	0,29	0,15
22	0,36	0,16
29	0,38	0,16
37	0,44	0,18
43	0,56	0,18
50	0,58	0,3
57	0,7	0,36
64	0,76	0,51
71	0,77	0,86
94	0,85	0,93
105	0,86	0,95
114	1	1,07
126	1,17	1,08
141	1,27	1,12
155	1,44	1,44
172	1,95	1,55
205	2	2,22
226	2,62	2,29
262	3,31	2,31
287	3,91	2,67
322	4,14	2,86
353	4,28	3,03
385	5,42	3,09
421	5,52	3,28
486	5,91	4,45

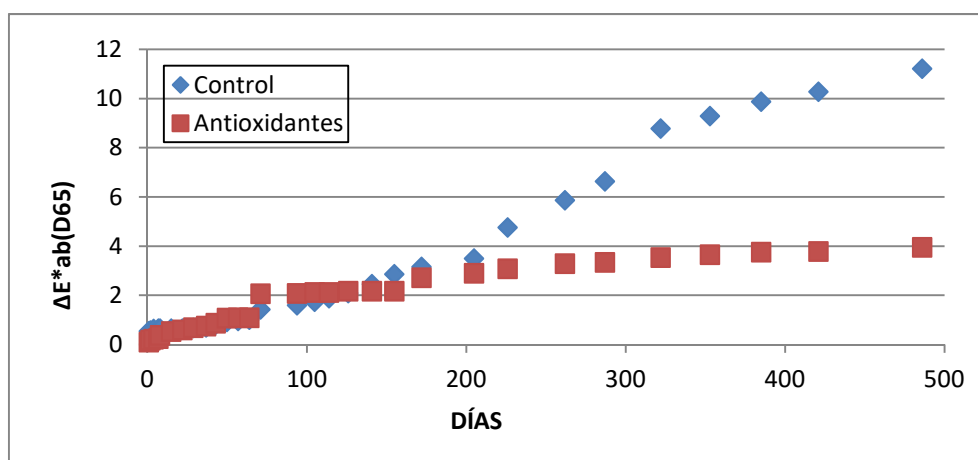
**Figura 9.1.37**

Estabilidad temporal aceite del AOVE "OG" bajo condiciones de almacenamiento seco y en oscuridad a temperatura ambiente (20 °C).

Tabla 9.1.20

Diferencia de color de los AOVE´s "CCP" tanto control como enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

Concentración 0,05	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCP	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCP
Días	Control	Antioxidantes
1	0,54	0,1
2	0,57	0,18
4	0,63	0,22
7	0,64	0,24
8	0,64	0,37
15	0,64	0,53
22	0,64	0,59
29	0,67	0,68
37	0,69	0,75
43	0,81	0,86
50	0,92	1,07
57	0,95	1,08
64	1,01	1,09
71	1,43	2,06
94	1,59	2,08
105	1,74	2,12
114	1,88	2,12
126	2,09	2,16
141	2,45	2,16
155	2,86	2,17
172	3,15	2,71
205	3,49	2,9
226	4,76	3,08
262	5,86	3,28
287	6,63	3,34
322	8,78	3,53
353	9,28	3,65
385	9,87	3,75
421	10,27	3,78
486	11,21	3,95

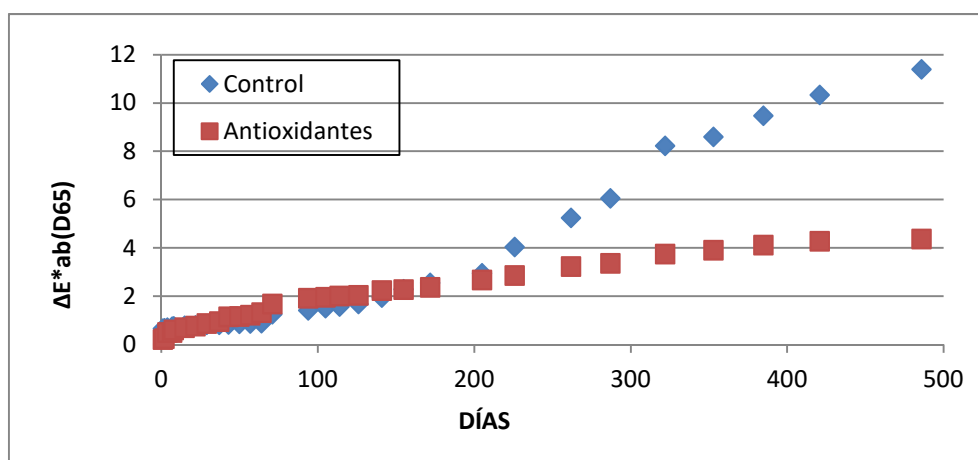
**Figura 9.1.38**

Estabilidad temporal del AOVE "CCP" bajo condiciones de almacenamiento seco y en oscuridad a temperatura ambiente (20 °C).

Tabla 9.1.21

Diferencia de color de los AOVE´s "CCA" tanto control como enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

Concentración 0,05	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCA	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCA
Días	Control	Antioxidantes
1	0,66	0,21
2	0,67	0,24
4	0,69	0,49
7	0,74	0,5
8	0,75	0,6
15	0,78	0,7
22	0,79	0,76
29	0,81	0,86
37	0,82	0,95
43	0,83	1,14
50	0,85	1,16
57	0,87	1,21
64	0,88	1,32
71	1,25	1,67
94	1,41	1,91
105	1,5	1,96
114	1,57	2,01
126	1,67	2,03
141	1,94	2,23
155	2,29	2,27
172	2,55	2,37
205	2,95	2,67
226	4,03	2,85
262	5,24	3,23
287	6,05	3,36
322	8,22	3,74
353	8,59	3,9
385	9,47	4,11
421	10,33	4,28
486	11,39	4,37

**Figura 9.1.39**

Estabilidad temporal del AOVE "CCA" bajo condiciones de almacenamiento seco y en oscuridad a temperatura ambiente (20 °C).

Tabla 9.1.22
Parámetros colorimétricos de los AOVE's controles (sin enriquecer).

Días	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ SM	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OB	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OG	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCP	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCA
1	0,09	0,58	0,07	0,54	0,66
2	0,13	0,61	0,07	0,57	0,67
4	0,13	0,61	0,07	0,63	0,69
7	0,16	0,61	0,07	0,64	0,74
8	0,16	0,64	0,1	0,64	0,75
15	0,2	0,64	0,29	0,64	0,78
22	0,23	0,71	0,36	0,64	0,79
29	0,27	0,75	0,38	0,67	0,81
37	0,3	0,77	0,44	0,69	0,82
43	0,3	0,94	0,56	0,81	0,83
50	0,31	0,96	0,58	0,92	0,85
57	0,36	0,96	0,7	0,95	0,87
64	0,44	0,99	0,76	1,01	0,88
71	0,44	1,02	0,77	1,43	1,25
94	0,46	1,13	0,85	1,59	1,41
105	0,51	1,41	0,86	1,74	1,5
114	0,73	1,57	1	1,88	1,57
126	0,77	1,75	1,17	2,09	1,67
141	0,88	2,24	1,27	2,45	1,94
155	1,01	2,72	1,44	2,86	2,29
172	1,22	2,87	1,95	3,15	2,55
205	1,29	3,68	2	3,49	2,95
226	1,41	5,36	2,62	4,76	4,03
262	1,53	6,52	3,31	5,86	5,24
287	1,86	7,31	3,91	6,63	6,05
322	2,62	8,23	4,14	8,78	8,22
353	3,23	9,01	4,28	9,28	8,59
385	3,31	9,62	5,42	9,87	9,47
421	3,52	9,94	5,52	10,27	10,33
486	3,58	10,18	5,91	11,21	11,39

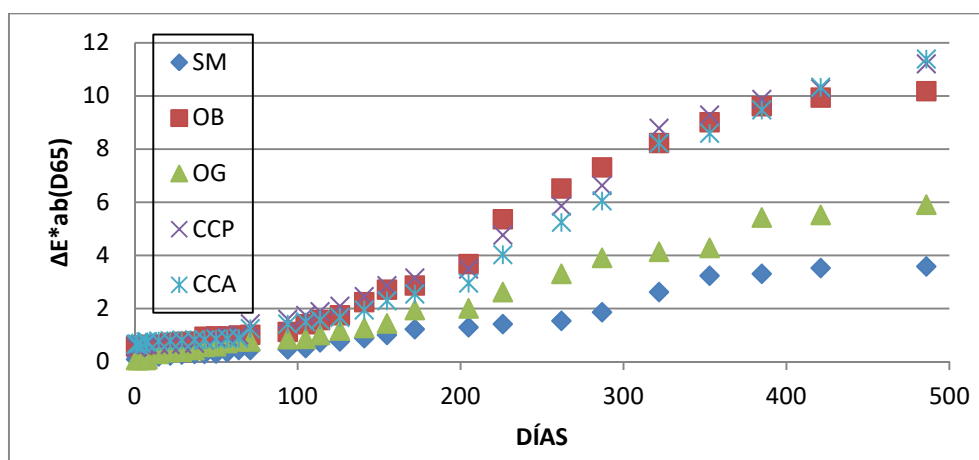


Figura 9.1.40

Estabilidad temporal de los AOVE's controles bajo condiciones de almacenamiento seco y en oscuridad a temperatura ambiente (20 °C).

Tabla 9.1.23

Parámetros colorimétricos de los AOVE's enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

Días	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ SM	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OB	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OG	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCP	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CCA
1	0,12	0,34	0,12	0,1	0,21
2	0,18	0,34	0,14	0,18	0,24
4	0,19	0,35	0,14	0,22	0,49
7	0,2	0,36	0,15	0,24	0,5
8	0,2	0,38	0,15	0,37	0,6
15	0,22	0,4	0,15	0,53	0,7
22	0,24	0,4	0,16	0,59	0,76
29	0,24	0,42	0,16	0,68	0,86
37	0,29	0,48	0,18	0,75	0,95
43	0,29	0,49	0,18	0,86	1,14
50	0,3	0,54	0,3	1,07	1,16
57	0,34	0,54	0,36	1,08	1,21
64	0,42	0,59	0,51	1,09	1,32
71	0,57	0,83	0,86	2,06	1,67
94	0,62	0,84	0,93	2,08	1,91
105	0,65	0,86	0,95	2,12	1,96
114	0,66	1,02	1,07	2,12	2,01
126	0,73	1,14	1,08	2,16	2,03
141	0,8	1,15	1,12	2,16	2,23
155	0,84	1,25	1,44	2,17	2,27
172	0,85	1,33	1,55	2,71	2,37
205	0,95	1,34	2,22	2,9	2,67
226	1,01	1,38	2,29	3,08	2,85
262	1,07	1,62	2,31	3,28	3,23
287	1,1	1,67	2,67	3,34	3,36
322	1,2	1,88	2,86	3,53	3,74
353	1,35	1,9	3,03	3,65	3,9
385	1,36	1,97	3,09	3,75	4,11
421	1,41	2,09	3,28	3,78	4,28
486	1,47	2,16	4,45	3,95	4,37

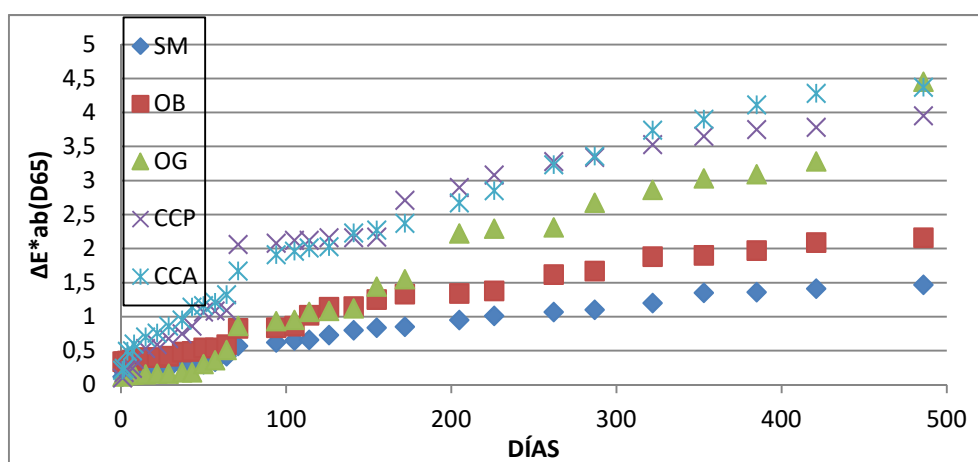


Figura 9.1.41

Estabilidad temporal de los AOVE's enriquecidos con bajo condiciones de almacenamiento seco y en oscuridad a temperatura ambiente (20 °C).

Tabla 9.1.24

Parámetros colorimétricos de los AOVE's con diferentes índices de madurez en los meses de Octubre, Noviembre y Diciembre, tanto control como enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

I.MADUREZ	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OCTUBRE		$\Delta E^*_{ab}(D65)$ NOVIEMBRE		$\Delta E^*_{ab}(D65)$ DICIEMBRE	
	Control	Antioxidantes	Control	Antioxidantes	Control	Antioxidantes
1	4,75	3,67	4,23	3,41	1,36	0,95
2	7,57	5,03	6,73	4,84	1,99	0,65
3	9,56	6,02	7,63	5,58	2,28	0,46
4	12,29	7,53	8,12	6,73	2,86	0,47
7	14,45	10,65	8,28	8,43	4,33	1,48
9	14,85	12,51	8,72	9,02	5,65	1,99
11	14,78	14,17	9,41	9,47	6,73	2,65
14	14,34	15,86	10,78	9,76	8,95	3,52
16	14,12	16,18	11,97	9,87	10,5	4,08
18	13,89	17,27	13,13	9,84	12,02	4,57
22	13,48	18,1	16,23	9,91	17,02	6,12
25	13,54	18,55	19,09	10,36	21,41	7,34
29	14,42	19,51	23,17	10,47	26,34	8,92
32	14,94	19,89	25,37	10,63	29,99	9,59
36	16,38	20,18	29,64	10,49	37,54	11,09
39	17,99	20,78	33,04	10,49	43,94	12,43
43	21,41	20,91	38,95	10,21	55,99	15,28
46	24,5	20,86	43,35	10,08	65,9	18,24
50	28,72	20,79	48,64	10,07	78,65	22,84
53	35,6	20,28	56,42	10,78	96,48	31,85
57	44,55	19,31	67,38	12,7	112,19	45,17
60	52,48	18,4	80,64	16,3	118,29	58,11
64	61,49	17,47	93,25	22,13	121,05	72,39
66	72,38	18,27	102,99	32,93	122,52	87,59

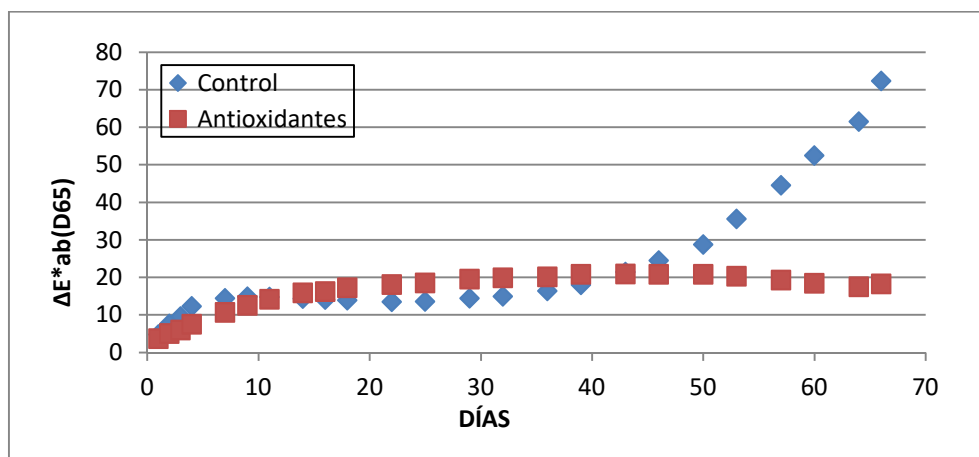
**Figura 9.1.42**

Foto-estabilidad del AOVE "CCP" bajo condiciones de iluminación ultravioleta, procedentes de fruto con diferente grado de maduración. (Mes de Octubre), (0,05 mg luteína/ml).

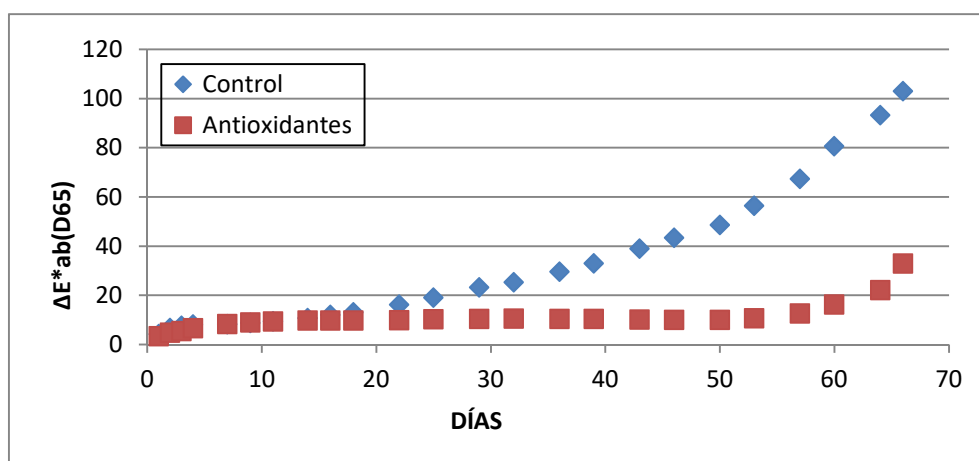
**Figura 9.1.43**

Foto-estabilidad del AOVE "CCP" bajo condiciones de iluminación ultravioleta, procedentes de fruto con diferente grado de maduración. (Mes de Noviembre), (0,05 mg luteína/ml).

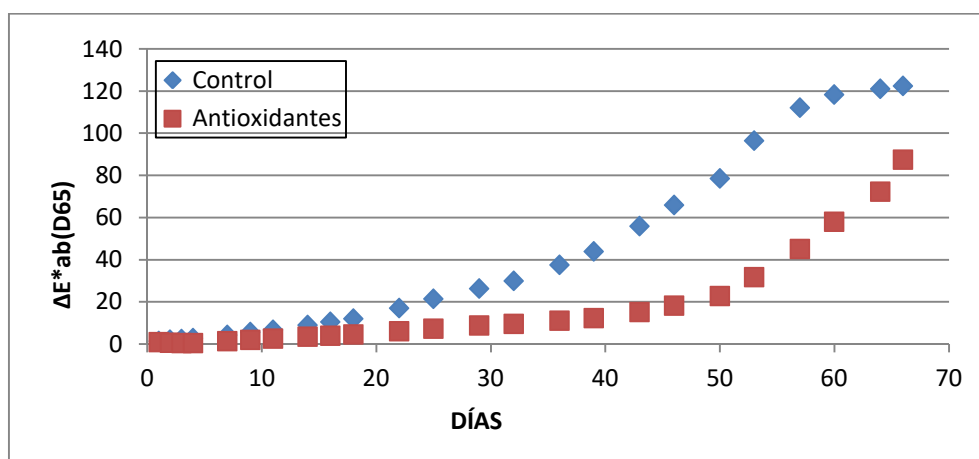
**Figura 9.1.44**

Foto-estabilidad del AOVE "CCP" bajo condiciones de iluminación ultravioleta, procedentes de fruto con diferente grado de maduración. (Mes de Diciembre), (0,05 mg luteína/ml).

Tabla 9.1.25

Parámetros colorimétricos de los AOVE's procedentes de fruto con distinto grado de maduración. Los datos de la izquierda corresponden a los AOVE's sin enriquecer, los de la derecha a los enriquecidos en 0,05 mg luteína/ml.

$\Delta E^*_{ab}(D65)$ (CONTROLES)				$\Delta E^*_{ab}(D65)$ (ANTIOXIDANTES)			
Días	Octubre	Noviembre	Diciembre	Días	Octubre	Noviembre	Diciembre
1	4,75	4,23	1,36	1	3,67	3,41	0,95
2	7,57	6,73	1,99	2	5,03	4,84	0,65
3	9,56	7,63	2,28	3	6,02	5,58	0,46
4	12,29	8,12	2,86	4	7,53	6,73	0,47
7	14,45	8,28	4,33	7	10,65	8,43	1,48
9	14,85	8,72	5,65	9	12,51	9,02	1,99
11	14,78	9,41	6,73	11	14,17	9,47	2,65
14	14,34	10,78	8,95	14	15,86	9,76	3,52
16	14,12	11,97	10,5	16	16,18	9,87	4,08
18	13,89	13,13	12,02	18	17,27	9,84	4,57
22	13,48	16,23	17,02	22	18,1	9,91	6,12
25	13,54	19,09	21,41	25	18,55	10,36	7,34
29	14,42	23,17	26,34	29	19,51	10,47	8,92
32	14,94	25,37	29,99	32	19,89	10,63	9,59
36	16,38	29,64	37,54	36	20,18	10,49	11,09
39	17,99	33,04	43,94	39	20,78	10,49	12,43
43	21,41	38,95	55,99	43	20,91	10,21	15,28
46	24,5	43,35	65,9	46	20,86	10,08	18,24
50	28,72	48,64	78,65	50	20,79	10,07	22,84
53	35,6	56,42	96,48	53	20,28	10,78	31,85
57	44,55	67,38	112,19	57	19,31	12,7	45,17
60	52,48	80,64	118,29	60	18,4	16,3	58,11
64	61,49	93,25	121,05	64	17,47	22,13	72,39
66	72,38	102,99	122,52	66	18,27	32,93	87,59

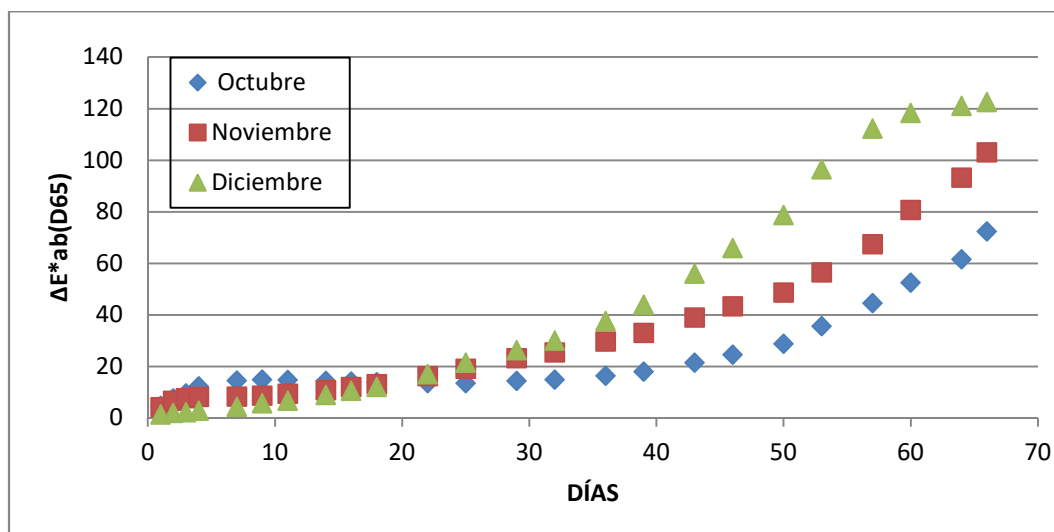


Figura 9.1.45

Foto-estabilidad de los AOVE's de la variedad "Picual" bajo condiciones de iluminación ultravioleta, procedente de fruto con diferente grado de maduración. Estos datos corresponden a los aceites sin enriquecer.

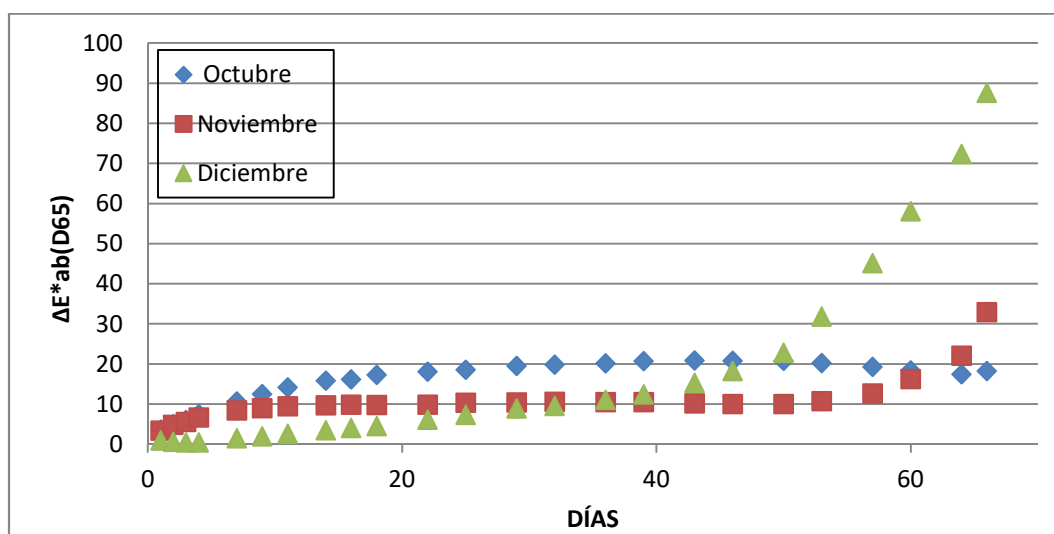


Figura 9.1.46

Foto-estabilidad de los AOVE's de la variedad "Picual" bajo condiciones de iluminación ultravioleta, procedente de fruto con diferente grado de maduración enriquecidos con antioxidantes (0,05 mg luteína/ml).

Tabla 9.1.26

Parámetros colorimétricos de AOVE's de la variedad "Picual" (izquierda) y "Royal" (derecha) enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg/ml.

Concentración 0,05 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ PICUAL	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ PICUAL	Concentración 0,05 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ ROYAL	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ ROYAL
Días	Control	Antioxidantes	Días	Control	Antioxidantes
1	5,1	3,78	1	4,68	2,84
2	8,35	5,13	2	7,46	3,95
3	10	6	3	8,65	4,81
4	11,29	7,45	4	9,25	6,13
7	11,7	10,32	7	9,8	8,33
9	11,61	11,68	9	10,05	9,44
11	11,45	12,76	11	10,08	10,55
14	11,38	13,9	14	10,05	11,42
16	11,58	14,32	16	10,08	11,76
18	11,99	14,69	18	10,19	12
22	13,6	15,13	22	10,72	12,32
25	15,67	15,59	25	11,74	12,87
29	18,41	15,97	29	13,69	14,01
32	19,8	16,25	32	14,79	14,46
36	22,64	16,56	36	17,48	14,78
39	25,06	16,85	39	20,4	14,82
43	29,28	16,8	43	26,25	14,45
46	32,99	16,65	46	32,03	14,1
50	37,64	16,25	50	40,32	13,7
53	44,46	15,51	53	54,96	13,39
57	53,17	14,89	57	76,53	14,14
60	61,47	15,44	60	91,68	16,48
64	71,25	18,24	64	101,7	22,42
66	83,16	25,49	66	108,35	32,81

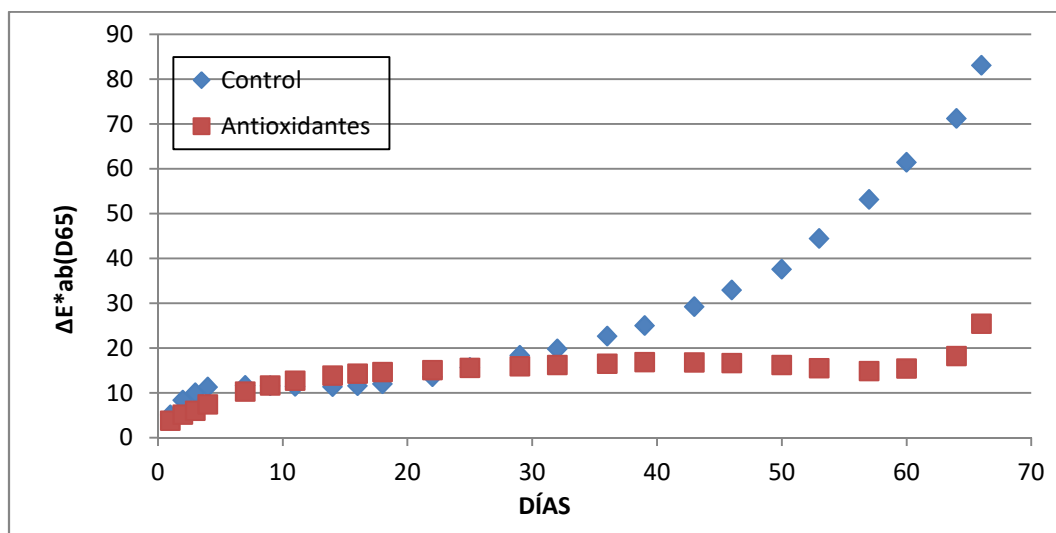


Figura 9.1.47

Foto-estabilidad del AOVE "CCP" bajo condiciones de iluminación ultravioleta, procedentes de diferentes frutos enriquecidos con antioxidantes (0,05 mg luteína/ml).

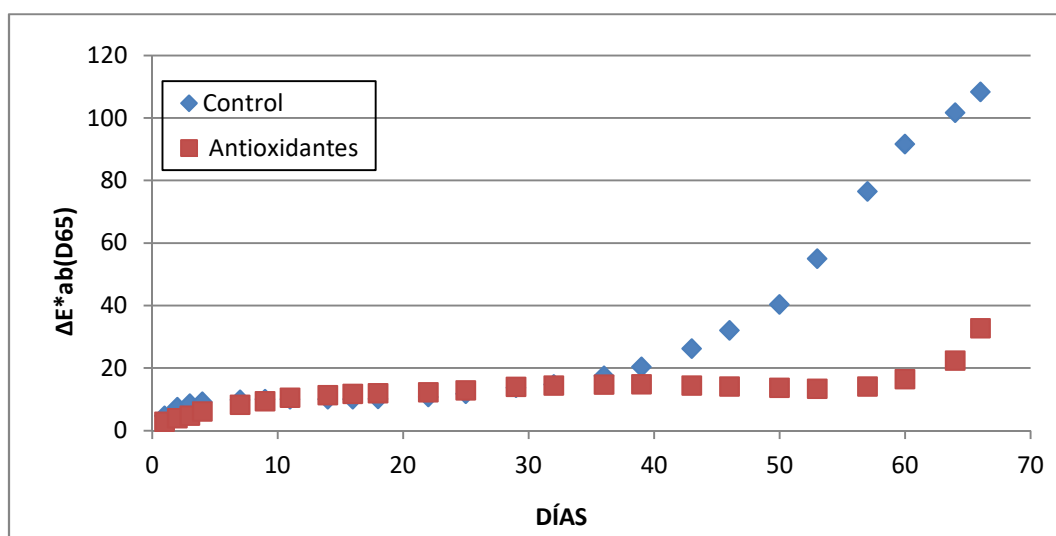


Figura 9.1.48

Foto-estabilidad del AOVE "CCR" bajo condiciones de iluminación ultravioleta, procedentes de diferentes frutos enriquecidos con antioxidantes (0,05 mg luteína/ml).

Tabla 9.1.27

Parámetros colorimétricos de AOVE's de la variedad "Arbequina" (izquierda) y "Frantoio" (derecha) enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg/ml.

Concentración 0,05 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ ARBEQUINA	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ ARBEQUINA	Concentración 0,05 mg/ml	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ FRANTOIO	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ FRANTOIO
Días	Control	Antioxidantes	Días	Control	Antioxidantes
1	4,69	3,66	1	1,38	0,79
2	7,78	5,15	2	2,64	0,5
3	8,8	6,1	3	3,57	0,33
4	9,89	7,59	4	5,16	0,44
7	11,17	9,7	7	7,31	1,15
9	11,75	10,45	9	9,07	1,77
11	12,01	10,93	11	10,95	2,38
14	12,49	11,18	14	13,96	3,43
16	13,04	11,43	16	16,29	4,04
18	13,71	11,6	18	18,54	4,6
22	15,84	11,37	22	24,49	6,19
25	18,52	11,55	25	29,38	7,68
29	23,21	12,35	29	36,89	9,12
32	25,64	12,11	32	41,45	9,91
36	30,9	11,64	36	50,22	12,28
39	35,77	11,47	39	58,47	14,99
43	44,67	11,75	43	73,55	20,69
46	55,84	13,71	46	87,42	26,19
50	72,28	19,7	50	100,54	34,02
53	90,12	36,72	53	109,26	47,48
57	103,63	64,32	57	113,04	66,52
60	108,99	84,8	60	114,21	83,19
64	111,83	99,54	64	114,83	99,06
66	113,5	109,84	66	115,26	111,78

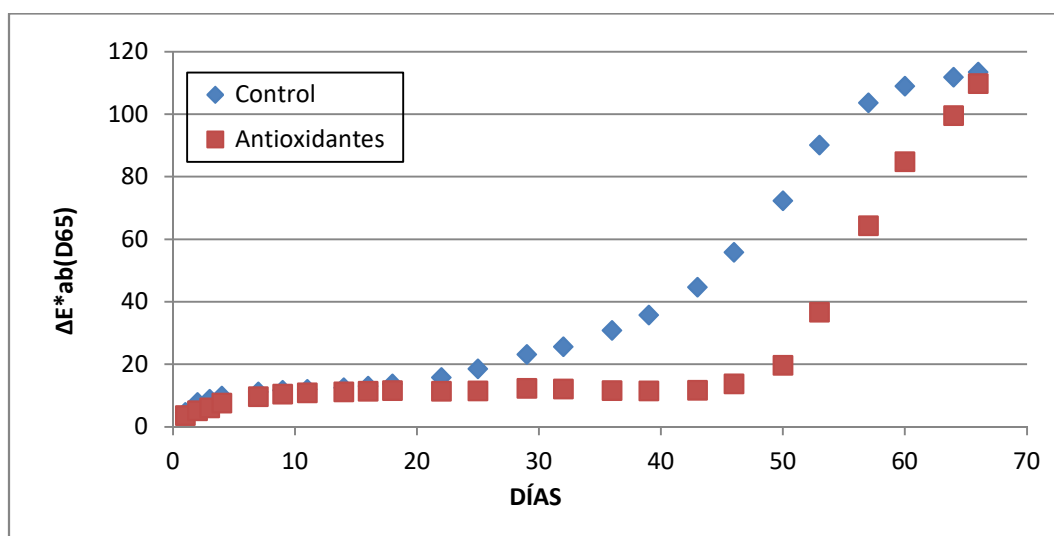
**Figura 9.1.49**

Foto-estabilidad del AOVE "CCA" bajo condiciones de iluminación ultravioleta, procedentes de diferentes frutos enriquecidos con antioxidantes (0,05 mg luteína/ml).

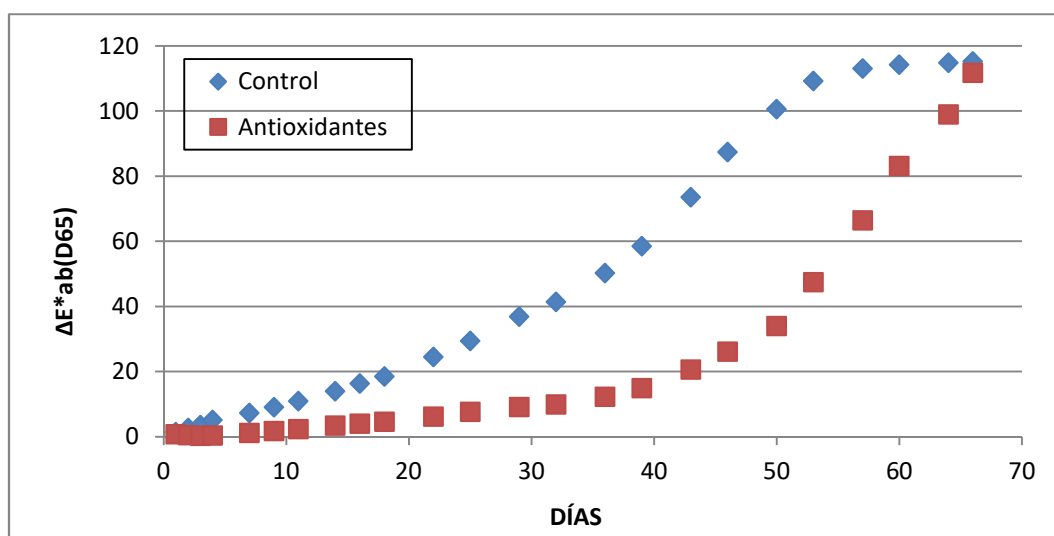
**Figura 9.1.50**

Foto-estabilidad del AOVE "CCF" bajo condiciones de iluminación ultravioleta, procedentes de diferentes frutos enriquecidos con antioxidantes (0,05 mg luteína/ml).

Tabla 9.1.28

Parámetros colorimétricos de los AOVE's sin enriquecer procedentes de diferentes frutos.

$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CONTROLES				
Días	Picual	Arbequina	Frantoio	Royal
1	5,1	4,69	1,38	4,68
2	8,35	7,78	2,64	7,46
3	10	8,8	3,57	8,65
4	11,29	9,89	5,16	9,25
7	11,7	11,17	7,31	9,8
9	11,61	11,75	9,07	10,05
11	11,45	12,01	10,95	10,08
14	11,38	12,49	13,96	10,05
16	11,58	13,04	16,29	10,08
18	11,99	13,71	18,54	10,19
22	13,6	15,84	24,49	10,72
25	15,67	18,52	29,38	11,74
29	18,41	23,21	36,89	13,69
32	19,8	25,64	41,45	14,79
36	22,64	30,9	50,22	17,48
39	25,06	35,77	58,47	20,4
43	29,28	44,67	73,55	26,25
46	32,99	55,84	87,42	32,03
50	37,64	72,28	100,54	40,32
53	44,46	90,12	109,26	54,96
57	53,17	103,63	113,04	76,53
60	61,47	108,99	114,21	91,68
64	71,25	111,83	114,83	101,7
66	83,16	113,5	115,26	108,35

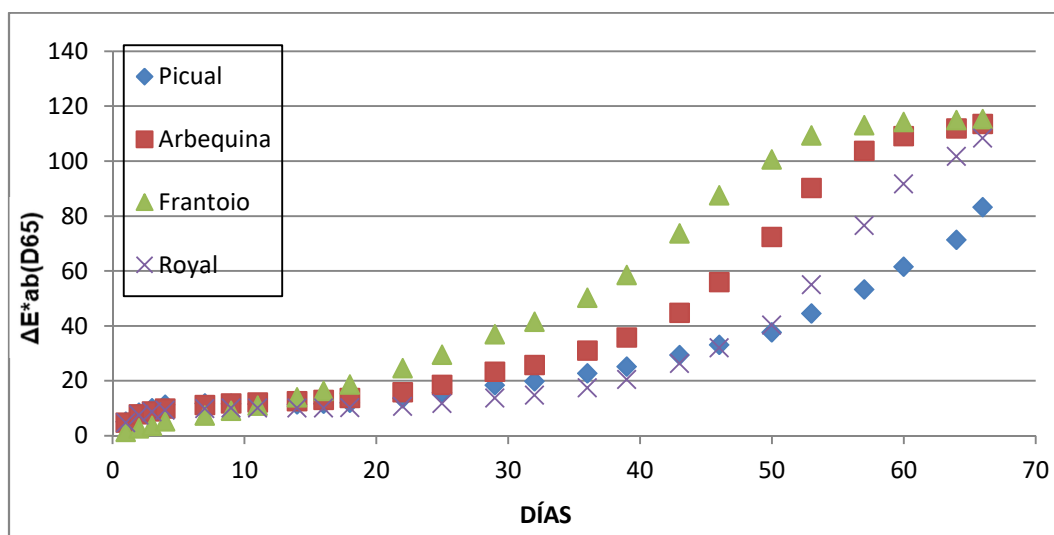


Figura 9.1.51

Foto-estabilidad de los AOVE's sin enriquecer bajo condiciones de iluminaciones ultravioleta, procedentes de diferentes frutos.

Tabla 9.1.29

Parámetros colorimétricos de los AOVE's enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml procedentes de diferentes frutos.

$\Delta E^*_{ab}(D65)$ ANTIOXIDANTES				
Días	Picual	Arbequina	Frantoio	Royal
1	3,78	3,66	0,79	2,84
2	5,13	5,15	0,5	3,95
3	6	6,1	0,33	4,81
4	7,45	7,59	0,44	6,13
7	10,32	9,7	1,15	8,33
9	11,68	10,45	1,77	9,44
11	12,76	10,93	2,38	10,55
14	13,9	11,18	3,43	11,42
16	14,32	11,43	4,04	11,76
18	14,69	11,6	4,6	12
22	15,13	11,37	6,19	12,32
25	15,59	11,55	7,68	12,87
29	15,97	12,35	9,12	14,01
32	16,25	12,11	9,91	14,46
36	16,56	11,64	12,28	14,78
39	16,85	11,47	14,99	14,82
43	16,8	11,75	20,69	14,45
46	16,65	13,71	26,19	14,1
50	16,25	19,7	34,02	13,7
53	15,51	36,72	47,48	13,39
57	14,89	64,32	66,52	14,14
60	15,44	84,8	83,19	16,48
64	18,24	99,54	99,06	22,42
66	25,49	109,84	111,78	32,81

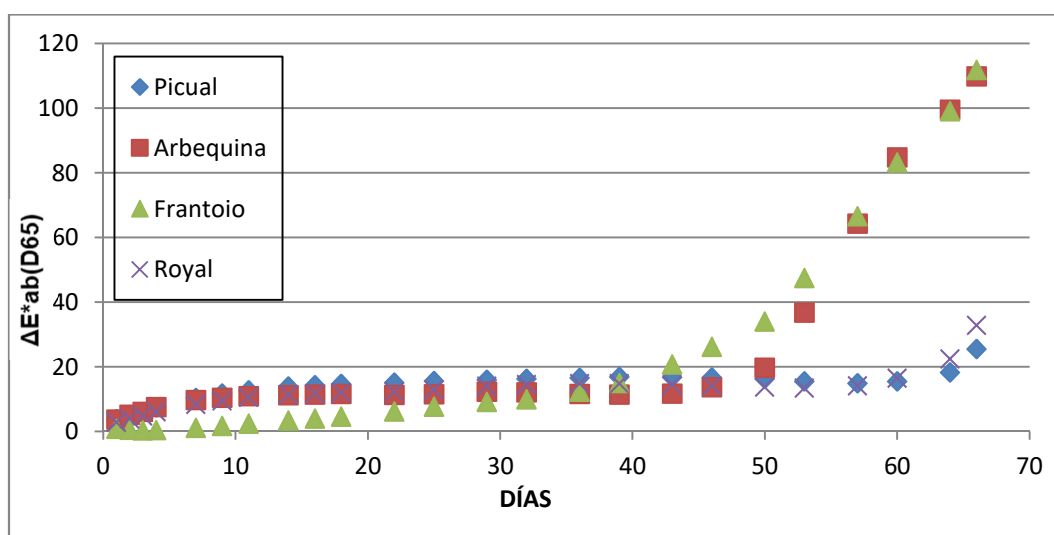


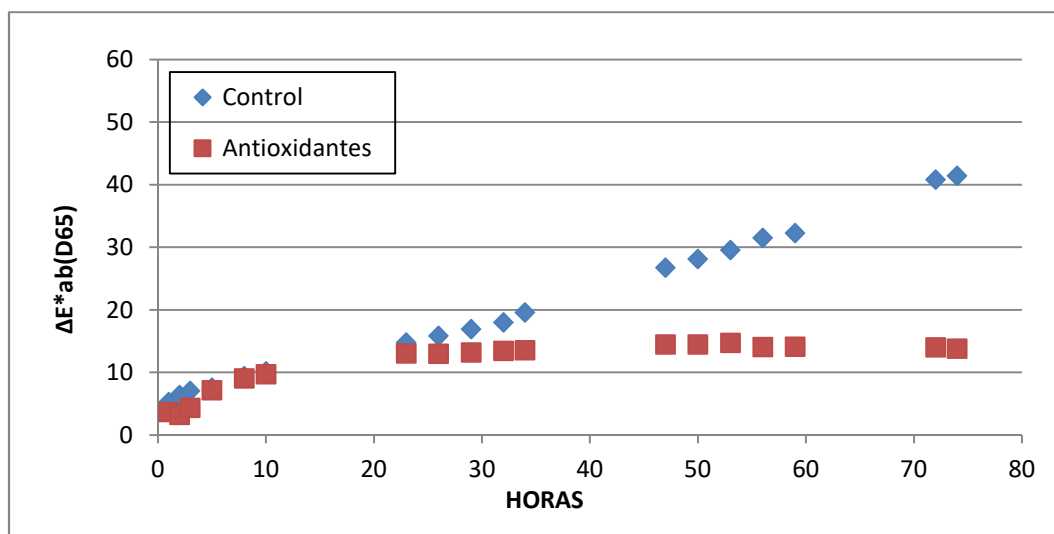
Figura 9.1.52

Foto-estabilidad de los AOVE's bajo condiciones de iluminaciones ultravioleta, procedentes de diferentes frutos, enriquecidos con antioxidantes (0,05 mg luteína/ml).

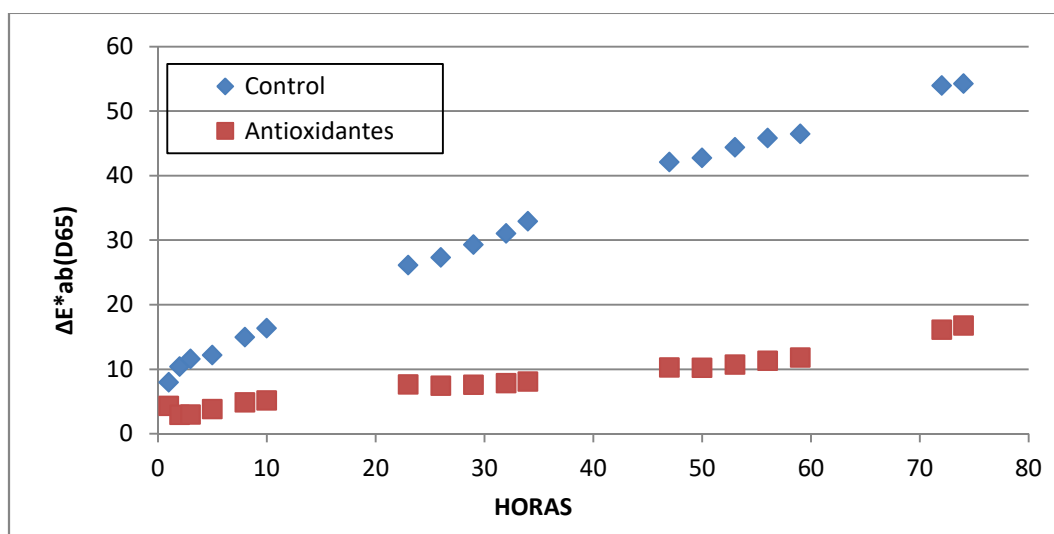
Tabla 9.1.30

Parámetros colorimétricos de los AOVE's con diferentes índices de madurez en los meses de Octubre, Noviembre y Diciembre tanto control como enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

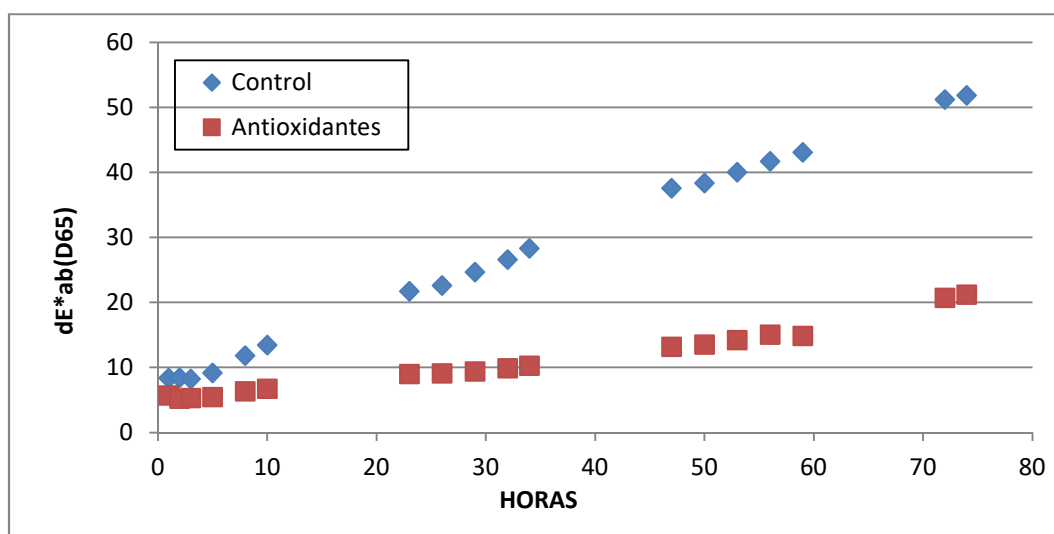
I.MADUREZ	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ OCTUBRE		$\Delta E^*_{ab}(D65)$ NOVIEMBRE		$\Delta E^*_{ab}(D65)$ DICIEMBRE	
	Control	Antioxidantes	Control	Antioxidantes	Control	Antioxidantes
1	5,31	3,69	7,95	4,28	8,38	5,72
2	6,42	3,24	10,4	2,92	8,41	5,22
3	7,1	4,38	11,6	2,98	8,23	5,33
5	7,61	7,19	12,17	3,79	9,15	5,46
8	9,43	9,09	14,97	4,84	11,82	6,37
10	10,2	9,76	16,35	5,14	13,44	6,73
23	14,79	13,09	26,11	7,62	21,71	9,01
26	15,88	12,99	27,34	7,43	22,6	9,1
29	16,95	13,22	29,32	7,57	24,65	9,4
32	18,04	13,45	31,02	7,84	26,59	9,9
34	19,6	13,57	32,93	8,06	28,33	10,31
47	26,75	14,49	42,11	10,24	37,57	13,19
50	28,15	14,5	42,73	10,18	38,33	13,53
53	29,58	14,76	44,41	10,7	40,03	14,22
56	31,55	14,11	45,82	11,28	41,69	15,05
59	32,29	14,14	46,46	11,78	43,09	14,87
72	40,82	14,03	53,95	16,11	51,2	20,74
74	41,44	13,82	54,24	16,77	51,84	21,21

**Figura 9.1.53**

Termo-estabilidad del AOVE "CCP" en función del tiempo de calentamiento a 120°C, procedentes de frutos con diferente grado de maduración. (Mes Octubre).

**Figura 9.1.54**

Termo-estabilidad del AOVE "CCP" en función del tiempo de calentamiento a 120°C, procedentes de frutos con diferente grado de maduración. (Mes Noviembre).

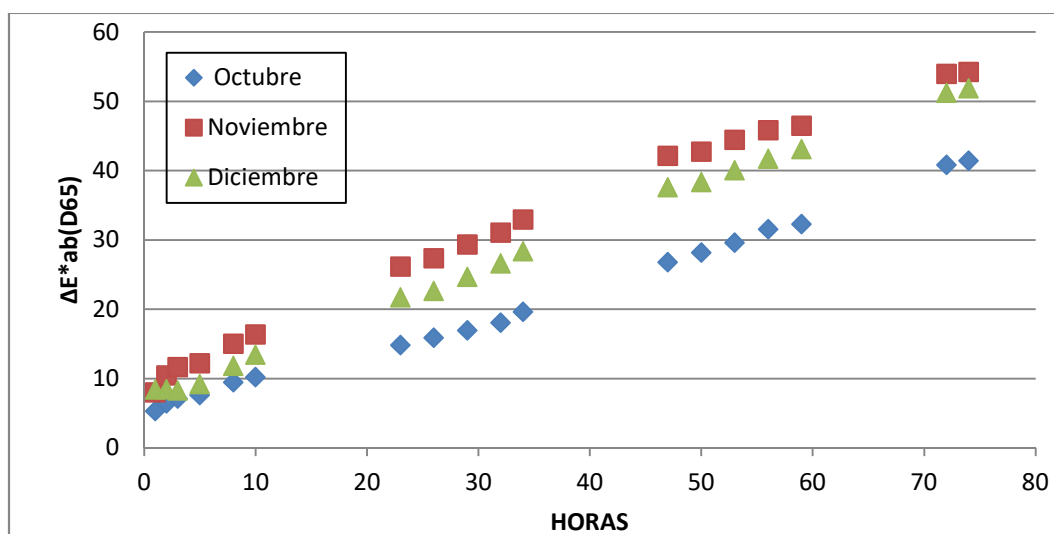
**Figura 9.1.55**

Termo-estabilidad del AOVE "CCP" en función del tiempo de calentamiento a 120°C, procedentes de frutos con diferente grado de maduración. (Mes Diciembre).

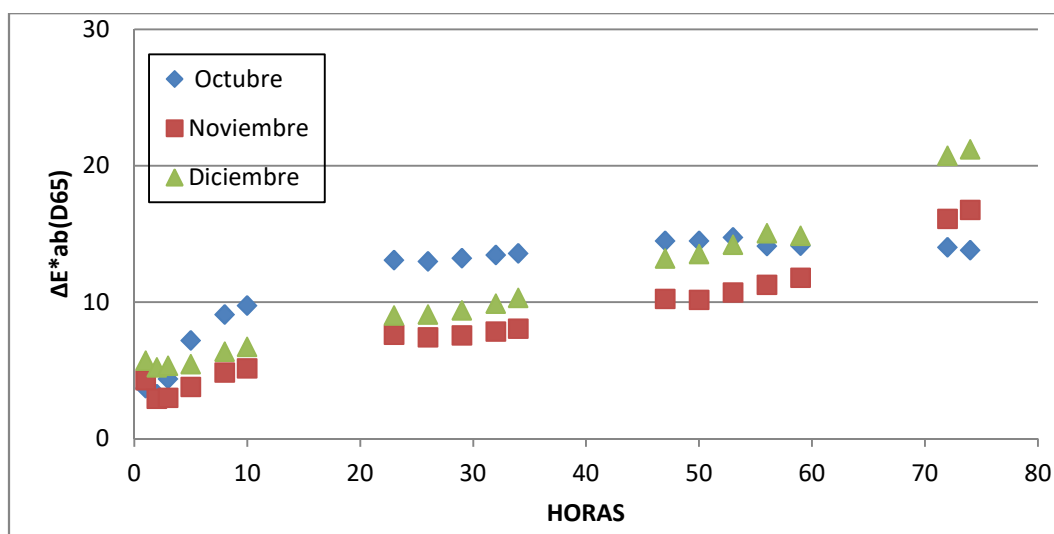
Tabla 9.1.31.

Parámetros colorimétricos de los AOVE's procedentes de fruto con distinto grado de maduración. Los datos de la izquierda corresponden a los AOVE's sin enriquecer, los de la derecha a los enriquecidos en 0,05 mg luteína/ml.

$\Delta E^*_{ab}(D65)$ (CONTROLES)				$\Delta E^*_{ab}(D65)$ (ANTIOXIDANTES)			
Horas	Octubre	Noviembre	Diciembre	Horas	Octubre	Noviembre	Diciembre
1	5,31	7,95	8,38	1	3,69	4,28	5,72
2	6,42	10,4	8,41	2	3,24	2,92	5,22
3	7,1	11,6	8,23	3	4,38	2,98	5,33
5	7,61	12,17	9,15	5	7,19	3,79	5,46
8	9,43	14,97	11,82	8	9,09	4,84	6,37
10	10,2	16,35	13,44	10	9,76	5,14	6,73
23	14,79	26,11	21,71	23	13,09	7,62	9,01
26	15,88	27,34	22,6	26	12,99	7,43	9,1
29	16,95	29,32	24,65	29	13,22	7,57	9,4
32	18,04	31,02	26,59	32	13,45	7,84	9,9
34	19,6	32,93	28,33	34	13,57	8,06	10,31
47	26,75	42,11	37,57	47	14,49	10,24	13,19
50	28,15	42,73	38,33	50	14,5	10,18	13,53
53	29,58	44,41	40,03	53	14,76	10,7	14,22
56	31,55	45,82	41,69	56	14,11	11,28	15,05
59	32,29	46,46	43,09	59	14,14	11,78	14,87
72	40,82	53,95	51,2	72	14,03	16,11	20,74
74	41,44	54,24	51,84	74	13,82	16,77	21,21

**Figura 9.1.56**

Termo-estabilidad del AOVE "CCP" en función del tiempo de calentamiento a 120°C, procedentes de frutos con diferente grado de maduración. Estos datos corresponden a los aceites sin enriquecer.

**Figura 9.1.57**

Termo-estabilidad del AOVE "CCP" en función del tiempo de calentamiento a 120°C, procedentes de frutos con diferente grado de maduración enriquecidos con antioxidantes (0,05 mg luteína/ml).

Tabla 9.1.32

Parámetros colorimétricos de los AOVE´s de las variedades "Picual", "Arbequina" y "Royal", enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

VARIEDAD	$\Delta E^*_{ab}(D65)$ PICUAL		$\Delta E^*_{ab}(D65)$ ARBEQUINA		$\Delta E^*_{ab}(D65)$ ROYAL	
	Control	Antioxidantes	Control	Antioxidantes	Control	Antioxidantes
1	8,07	2,91	10,77	4,64	7,71	3,79
2	9,12	3,17	11,13	3,92	8,2	3,98
3	9,47	4,65	11,65	3,56	8,42	4,22
5	10,8	5,43	12,34	3,79	8,89	5,3
8	12,15	7,39	14,74	5,41	12,07	6,69
10	13,26	7,72	15,13	5,72	12,59	6,98
23	18,96	9,87	23,61	7,76	20,53	8,94
26	20,67	10,01	25,23	7,93	22,43	9,41
29	22,36	10,1	26	7,98	24,06	9,01
32	23,21	10,2	28,78	8,48	25,14	9,21
34	24,19	10,36	29,99	8,9	25,99	9,69
47	33,07	10,85	39,11	11,48	37,09	11,3
50	33,9	10,81	39,83	11,73	38,7	11,36
53	35,98	11,13	42,16	12,58	40,69	11,79
56	37,42	10,89	43,43	13,7	42,69	12,97
59	39,26	11,19	45,6	14,83	44,53	13,96
72	46,59	14,16	52,5	20,78	51,88	19,48
74	47,05	14,28	53,4	21,63	53,33	20,54



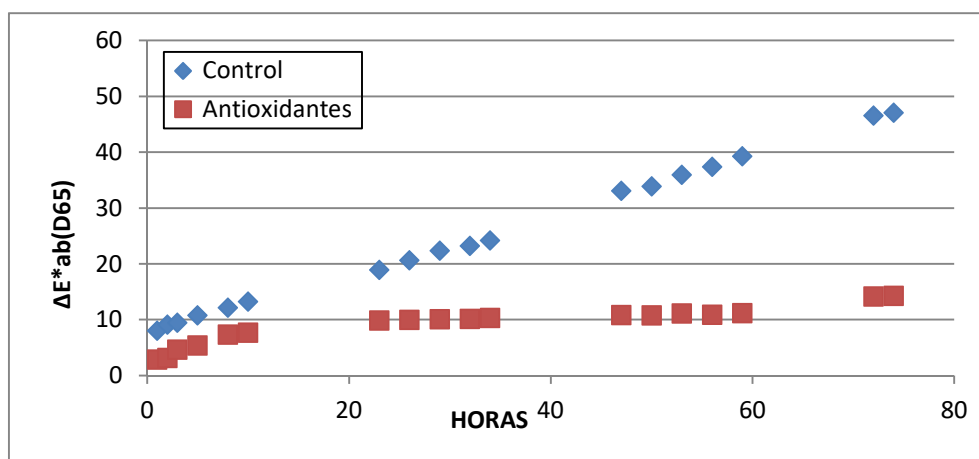


Figura 9.1.58

Termo-estabilidad del AOVE "CCP" en función del tiempo de calentamiento a 120°C, procedentes de diferentes frutos enriquecidos con antioxidantes (0,05 mg luteína/ml).

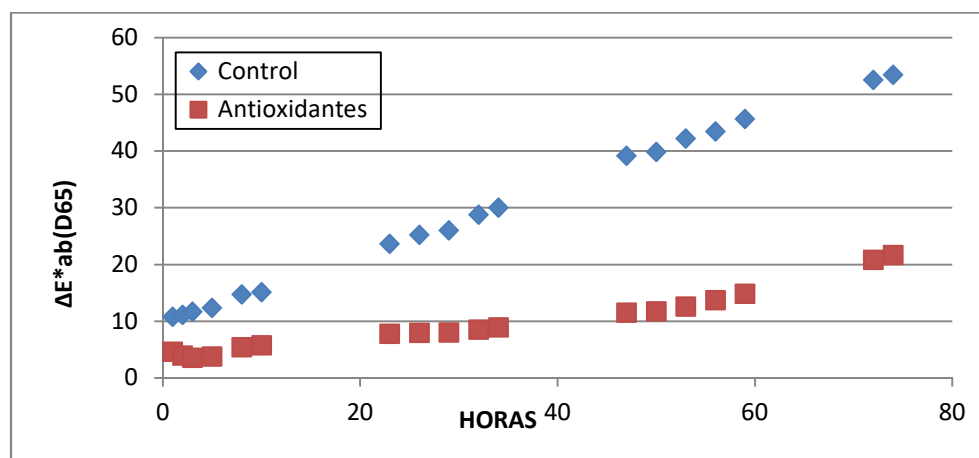


Figura 9.1.59

Termo-estabilidad del AOVE "CCA" en función del tiempo de calentamiento a 120°C, procedentes de diferentes frutos enriquecidos con antioxidantes (0,05 mg luteína/ml).

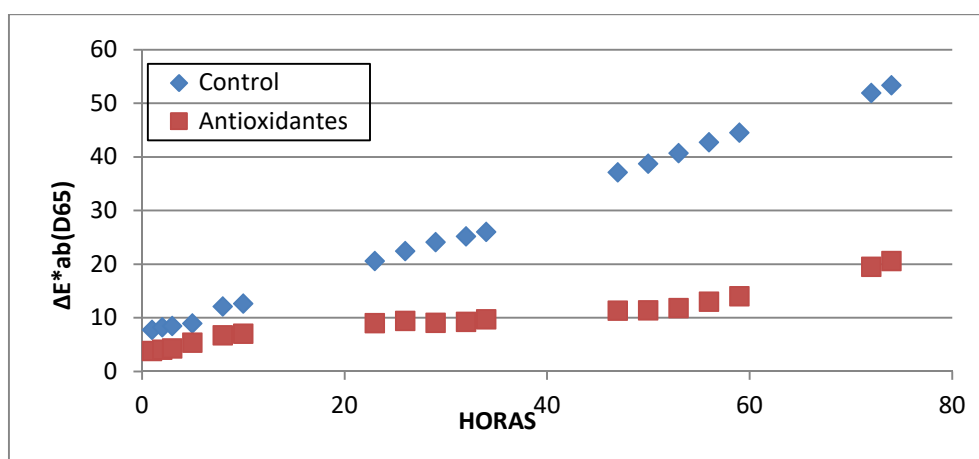


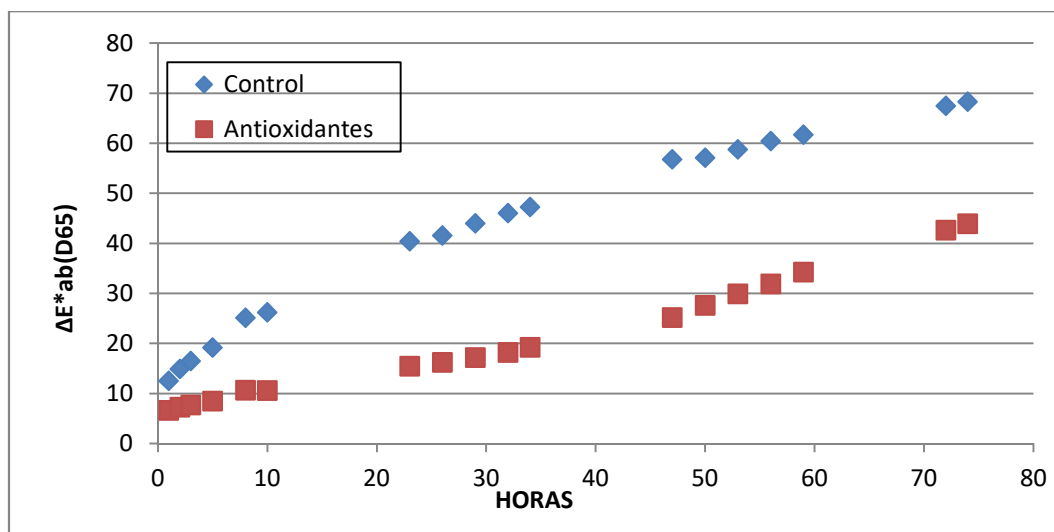
Figura 9.1.60

Termo-estabilidad del AOVE "CCR" en función del tiempo de calentamiento a 120°C, procedentes de diferentes frutos enriquecidos con antioxidantes (0,05 mg luteína/ml).

Tabla 9.1.33

Parámetros colorimétricos de los AOVE's de la variedad "Frantoio", enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml.

$\Delta E^*_{ab}(D65)$ FRANTOIO		
Horas	Control	Antioxidantes
1	12,48	6,61
2	14,87	7,26
3	16,46	7,73
5	19,15	8,51
8	25,14	10,68
10	26,2	10,61
23	40,38	15,43
26	41,58	16,21
29	43,96	17,15
32	46	18,21
34	47,22	19,21
47	56,79	25,16
50	57,11	27,63
53	58,74	29,92
56	60,4	31,89
59	61,71	34,28
72	67,46	42,61
74	68,27	43,89

**Figura 9.1.61**

Termo-estabilidad del AOVE "CCF" en función del tiempo de calentamiento a 120°C, procedentes de diferentes frutos enriquecidos con antioxidantes (0,05 mg luteína/ml).

Tabla 9.1.34

Parámetros colorimétricos de los AOVE's sin enriquecer procedentes de diferentes frutos.

$\Delta E^*_{ab}(D65)$ CONTROLES				
Horas	Picual	Arbequina	Frantoio	Royal
1	8,07	10,77	12,48	7,71
2	9,12	11,13	14,87	8,2
3	9,47	11,65	16,46	8,42
5	10,8	12,34	19,15	8,89
8	12,15	14,74	25,14	12,07
10	13,26	15,13	26,2	12,59
23	18,96	23,61	40,38	20,53
26	20,67	25,23	41,58	22,43
29	22,36	26	43,96	24,06
32	23,21	28,78	46	25,14
34	24,19	29,99	47,22	25,99
47	33,07	39,11	56,79	37,09
50	33,9	39,83	57,11	38,7
53	35,98	42,16	58,74	40,69
56	37,42	43,43	60,4	42,69
59	39,26	45,6	61,71	44,53
72	46,59	52,5	67,46	51,88
74	47,05	53,4	68,27	53,33

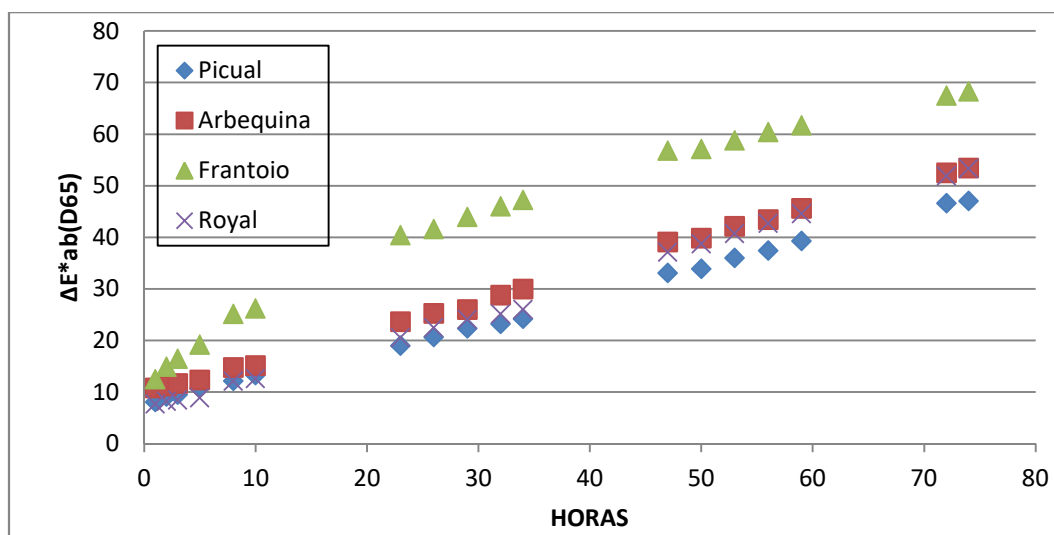


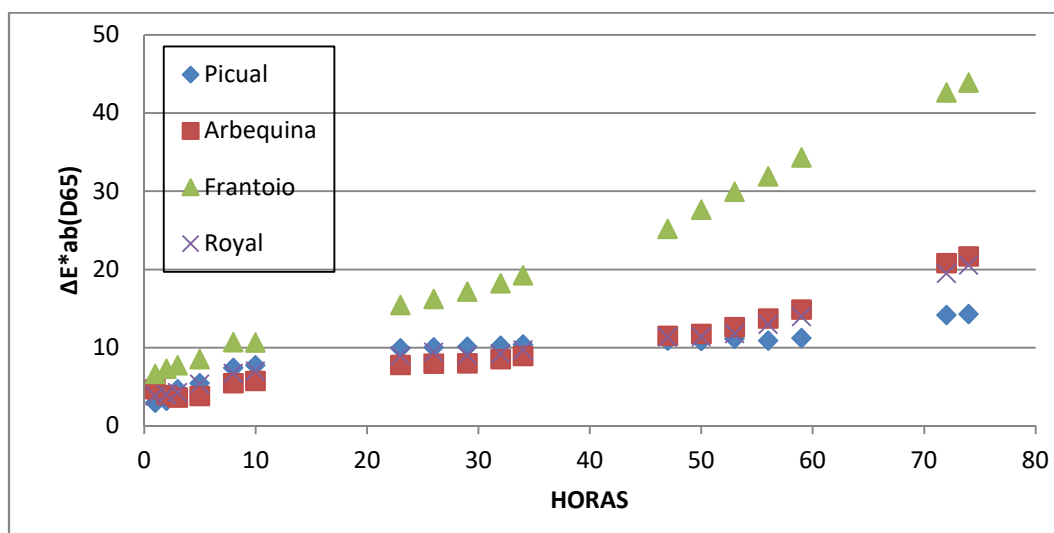
Figura 9.1.62

Termo-estabilidad de los AOVE's en función del tiempo de calentamiento a 120°C, procedentes de frutos con diferente grado de maduración. Estos datos corresponden a los aceites sin enriquecer.

Tabla 9.1.35

Parámetros colorimétricos de los AOVE's enriquecidos con antioxidantes a una concentración de 0,05 mg luteína/ml procedentes de diferentes frutos.

$\Delta E^*_{ab}(D65)$ ANTIOXIDANTES				
Horas	Picual	Arbequina	Frantoio	Royal
1	2,91	4,64	6,61	3,79
2	3,17	3,92	7,26	3,98
3	4,65	3,56	7,73	4,22
5	5,43	3,79	8,51	5,3
8	7,39	5,41	10,68	6,69
10	7,72	5,72	10,61	6,98
23	9,87	7,76	15,43	8,94
26	10,01	7,93	16,21	9,41
29	10,1	7,98	17,15	9,01
32	10,2	8,48	18,21	9,21
34	10,36	8,9	19,21	9,69
47	10,85	11,48	25,16	11,3
50	10,81	11,73	27,63	11,36
53	11,13	12,58	29,92	11,79
56	10,89	13,7	31,89	12,97
59	11,19	14,83	34,28	13,96
72	14,16	20,78	42,61	19,48
74	14,28	21,63	43,89	20,54

**Figura 9.1.63**

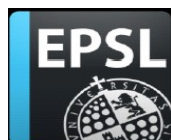
Termo-estabilidad los AOVE's en función del tiempo de calentamiento a 120°C, procedentes de frutos con diferente grado de maduración enriquecidos con antioxidantes (0,05 mg luteína/ml).



9. ANEXO II

Tabla 9.3.1

Detalle de las parejas de palabras y posibilidades de valoración de las mismas, en los test de apreciación visual de los aceites.



COLOR EMOTION TEST

Nombre y Apellidos:			
Edad:		Sexo:	
País de procedencia:			
Profesión:			
Tipo Aceite:			
Número de test:			

PAREJAS DE PARÁMETROS A VALORAR
--

AMARGO			DULCE		
Valoración			Valoración		
Un poco	Moderadamente	Mucho	Un poco	Moderadamente	Mucho
1	2	3	1	2	3
AROMÁTICO			INODORO		
Valoración			Valoración		
Un poco	Moderadamente	Mucho	Un poco	Moderadamente	Mucho
1	2	3	1	2	3
FRESCO			RANCIO		
Valoración			Valoración		
Un poco	Moderadamente	Mucho	Un poco	Moderadamente	Mucho
1	2	3	1	2	3
SALUDABLE			NO SALUDABLE		
Valoración			Valoración		
Un poco	Moderadamente	Mucho	Un poco	Moderadamente	Mucho
1	2	3	1	2	3
SABROSO			INSÍPIDO		
Valoración			Valoración		
Un poco	Moderadamente	Mucho	Un poco	Moderadamente	Mucho
1	2	3	1	2	3
ASPERO			SUAVE		
Valoración			Valoración		
Un poco	Moderadamente	Mucho	Un poco	Moderadamente	Mucho
1	2	3	1	2	3
PICANTE			NO PICANTE		
Valoración			Valoración		
Un poco	Moderadamente	Mucho	Un poco	Moderadamente	Mucho
1	2	3	1	2	3
NATURAL			ARTIFICIAL		
Valoración			Valoración		
Un poco	Moderadamente	Mucho	Un poco	Moderadamente	Mucho
1	2	3	1	2	3
GUSTA			NO GUSTA		
Valoración			Valoración		
Un poco	Moderadamente	Mucho	Un poco	Moderadamente	Mucho
1	2	3	1	2	3



Imagen 9.3.1

Detalle de los 18 AOVE's utilizados para los test de valoración visual por potenciales consumidores.



a

b

c

Imagen 9.3.2

Variación del color en AOVE tipo "B": (a) control; (b) enriquecido en luteína hasta 0,05 mg/ml y (c) enriquecido hasta 0,1 mg/ml.

9.3.1.- RESULTADOS CON POBLACIÓN ACOSTUMBRADA AL CONSUMO DE ACEITE DE OLIVA

COLOR EMOTION TEST																		
Nombre	Yolanda												Fecha	27/01/2014	Telfno			
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo																		
Dulce	x	x		x		x		x		x		x		x		x		x
Aromático	x		x		x		x		x		x		x				x	
Inodoro		x												x		x		
Fresco	x	x		x		x		x		x		x		x		x		x
Rancio			x					x							x			
Saludable	x		x		x		x		x		x		x		x		x	
No saludable		x		x		x		x		x		x		x		x		x
Sabroso	x	x	x		x				x				x		x		x	
Insípido							x		x		x		x		x			
Aspero		x		x		x		x						x				
Suave	x			x					x		x		x		x		x	
Picante		x				x				x				x			x	
No picante	x		x		x		x		x		x		x			x		x
Natural		x		x		x			x		x		x		x		x	
Artificial	x		x				x		x					x		x		x
Gusta		x							x		x		x		x		x	
No gusta	x			x		x		x		x				x		x		x

COLOR EMOTION TEST																		
Nombre	Yolanda												Fecha	05/02/2014	Telfno			
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo																		
Dulce	x	x		x		x		x		x		x		x		x		x
Aromático	x	x		x		x		x		x		x		x		x		x
Inodoro																		
Fresco	x	x		x		x		x		x		x		x		x		x
Rancio																		
Saludable	x		x		x		x		x		x		x		x		x	
No saludable		x		x		x		x		x		x		x		x		x
Sabroso	x	x	x		x				x				x		x		x	
Insípido							x		x		x		x		x			
Aspero		x		x					x					x				
Suave	x			x					x		x		x		x		x	
Picante		x				x				x				x			x	
No picante	x	x		x		x		x		x		x		x		x		x
Natural	x								x					x				
Artificial							x		x		x		x		x		x	
Gusta		x							x		x		x		x		x	
No gusta	x			x					x		x				x		x	

COLOR EMOTION TEST																		
Nombre	Yolanda												Fecha	12/02/2014	Telfno			
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo																		
Dulce	x			x		x		x		x		x		x		x		x
Aromático	x	x		x		x		x		x		x		x		x		x
Inodoro																		
Fresco	x	x		x		x		x		x		x		x		x		x
Rancio																		
Saludable	x		x		x		x		x		x		x		x		x	
No saludable		x		x		x		x		x		x		x		x		x
Sabroso	x	x	x		x				x				x		x		x	
Insípido							x		x		x		x		x			
Aspero		x		x					x					x				
Suave	x			x					x		x		x		x		x	
Picante		x																
No picante	x			x		x		x		x		x		x		x		x
Natural		x							x					x				
Artificial	x						x		x		x		x		x		x	
Gusta		x							x		x		x		x		x	
No gusta	x			x					x		x				x		x	



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Laura María												Fecha	29/01/2014	Telfno				
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x																		
Dulce		x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Aromático		x	x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Inodoro	x																		
Fresco	x		x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Rancio			x			x													
Saludable	x		x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
No saludable						x													
Sabroso	x		x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Insípido																			
Aspero			x					x						x		x	x		
Suave	x	x		x		x	x		x		x	x	x		x			x	
Picante	x			x			x		x					x		x	x		
No picante		x			x			x			x			x				x	
Natural					x	x		x	x	x	x			x	x	x	x	x	
Artificial	x		x			x					x							x	
Gusta		x	x		x	x		x	x	x	x			x	x	x	x	x	
No gusta	x					x													

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Laura María												Fecha	07/02/2014	Telfno				
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x	x		x	x		x	x	x	x		x	x	x		x	x	x	
Dulce																			
Aromático	x	x	x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Inodoro																			
Fresco	x		x		x	x		x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	
Rancio											x								
Saludable	x		x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
No saludable																			
Sabroso	x		x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Insípido																			
Aspero	x		x				x		x			x		x		x	x		
Suave		x		x	x		x			x		x	x		x			x	
Picante	x			x		x		x	x		x			x		x	x		
No picante		x			x			x				x	x					x	
Natural	x		x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Artificial																			
Gusta	x		x		x	x		x		x	x			x	x	x	x	x	
No gusta			x			x		x			x			x					

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Laura María												Fecha	26/02/2014	Telfno				
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x	x		x	x		x	x	x		x	x	x	x		x	x	x	
Dulce																			
Aromático	x		x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Inodoro																			
Fresco	x		x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Rancio																			
Saludable	x		x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
No saludable																			
Sabroso	x		x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Insípido																			
Aspero	x		x				x		x			x		x		x	x		
Suave		x		x		x		x		x		x	x		x			x	
Picante	x			x		x		x	x		x			x		x	x		
No picante		x			x			x				x	x					x	
Natural	x		x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Artificial																			
Gusta	x		x		x	x		x		x	x			x	x	x	x	x	
No gusta			x			x		x			x					x			



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Ildefonso												Fecha	29/01/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo																			
Dulce	x	x		x	x		x		x		x		x		x	x	x	x	
Aromático	x			x	x		x		x		x		x		x		x		
Inodoro		x																x	
Fresco		x		x				x	x		x		x					x	
Rancio	x			x			x		x		x				x		x	x	
Saludable		x		x			x		x		x		x		x		x	x	
No saludable	x			x											x				
Sabroso	x	x			x		x		x		x		x					x	
Insípido			x						x						x		x	x	
Aspero			x				x		x		x				x				
Suave	x	x		x			x		x				x		x		x	x	
Picante		x		x									x		x				
No picante	x			x			x		x		x		x				x	x	
Natural		x			x						x		x				x		
Artificial	x			x			x		x		x				x		x	x	
Gusta		x		x			x		x		x		x		x		x	x	
No gusta	x			x			x		x		x				x		x		

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Ildefonso												Fecha	06/03/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo		x																	
Dulce	x			x			x		x		x		x		x		x	x	
Aromático		x																	
Inodoro	x			x			x		x		x				x				
Fresco		x		x			x		x		x		x					x	
Rancio	x																		
Saludable		x																	
No saludable	x			x															
Sabroso																			
Insípido	x			x			x		x		x		x		x		x	x	
Aspero	x			x			x		x		x		x		x		x		
Suave		x																	
Picante		x																	
No picante	x			x			x		x		x		x		x		x	x	
Natural		x																	
Artificial	x			x			x		x		x				x		x	x	
Gusta		x		x			x		x		x		x		x		x	x	
No gusta	x						x		x		x				x		x		

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Ildefonso												Fecha	11/03/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo		x																	
Dulce	x			x			x		x		x		x		x		x	x	
Aromático		x																	
Inodoro	x			x					x		x		x		x			x	
Fresco		x																	
Rancio	x			x					x		x				x		x	x	
Saludable		x																	
No saludable	x			x					x		x		x		x		x	x	
Sabroso																			
Insípido	x																		
Aspero	x			x					x						x		x	x	
Suave		x																	
Picante		x																	
No picante	x			x			x		x		x		x		x		x	x	
Natural		x																	
Artificial		x																	
Gusta		x																	
No gusta	x			x			x		x		x		x		x		x	x	



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Juan Antonio												Fecha	29/01/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo																			
Dulce	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Aromático	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Inodoro			x		x		x		x		x		x		x		x		
Fresco			x		x		x		x		x		x		x		x		
Rancio	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Saludable	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
No saludable			x		x		x		x		x		x		x		x		
Sabroso	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Insípido		x		x		x		x		x		x		x		x		x	
Aspero		x		x		x		x		x		x		x		x		x	
Suave		x		x		x		x		x		x		x		x		x	
Picante																			
No picante	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Natural	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Artificial			x		x		x		x		x		x		x		x		
Gusta	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
No gusta			x		x		x		x		x		x		x		x		

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Juan Antonio												Fecha	06/03/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Dulce		x		x		x		x		x		x		x		x		x	
Aromático		x		x		x		x		x		x		x		x		x	
Inodoro	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Fresco	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Rancio			x		x		x		x		x		x		x		x		
Saludable	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
No saludable			x		x		x		x		x		x		x		x		
Sabroso	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Insípido		x		x		x		x		x		x		x		x		x	
Aspero	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Suave		x		x		x		x		x		x		x		x		x	
Picante		x		x		x		x		x		x		x		x		x	
No picante	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Natural			x		x		x		x		x		x		x		x		
Artificial	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Gusta	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
No gusta			x		x		x		x		x		x		x		x		

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Juan Antonio												Fecha	08/05/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo																			
Dulce	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Aromático	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Inodoro			x		x		x		x		x		x		x		x		
Fresco	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Rancio			x		x		x		x		x		x		x		x		
Saludable	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
No saludable			x		x		x		x		x		x		x		x		
Sabroso	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Insípido			x		x		x		x		x		x		x		x		
Aspero			x		x		x		x		x		x		x		x		
Suave	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Picante	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
No picante		x		x		x		x		x		x		x		x		x	
Natural	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Artificial			x		x		x		x		x		x		x		x		
Gusta	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
No gusta			x		x		x		x		x		x		x		x		



COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Eva												Fecha	30/01/2014			Telfno				
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo	x			x			x			x			x			x			x		
Dulce		x			x				x				x				x				x
Aromático	x			x			x						x				x				x
Inodoro		x			x				x				x				x				x
Fresco	x			x			x						x				x				x
Rancio		x			x				x				x				x				x
Saludable	x			x			x						x				x				x
No saludable		x			x				x				x				x				x
Sabroso	x			x			x						x				x				x
Insípido		x			x				x				x				x				x
Aspero	x			x			x						x				x				x
Suave		x			x				x				x				x				x
Picante				x			x						x				x				x
No picante	x			x			x						x				x				x
Natural	x			x			x						x				x				x
Artificial		x			x				x				x				x				x
Gusta	x			x			x						x				x				x
No gusta		x			x				x				x				x				x

COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Eva												Fecha	11/02/2014			Telfno				
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo				x			x			x			x			x			x		
Dulce	x				x				x				x				x				x
Aromático	x			x			x						x				x				x
Inodoro		x			x				x				x				x				x
Fresco	x			x			x						x				x				x
Rancio		x			x				x				x				x				x
Saludable		x			x				x				x				x				x
No saludable	x			x			x						x				x				x
Sabroso	x			x			x						x				x				x
Insípido		x			x				x				x				x				x
Aspero		x			x				x					x			x				x
Suave	x			x			x						x				x				x
Picante				x			x						x				x				x
No picante	x			x			x						x				x				x
Natural	x			x			x						x				x				x
Artificial		x			x				x				x				x				x
Gusta	x			x			x						x				x				x
No gusta		x			x				x				x				x				x

COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Eva												Fecha	25/02/2014			Telfno				
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo	x			x			x			x			x			x			x		
Dulce		x			x				x				x				x				x
Aromático	x			x			x						x				x				x
Inodoro		x			x				x				x				x				x
Fresco				x			x						x				x				x
Rancio	x			x			x						x				x				x
Saludable	x			x			x						x				x				x
No saludable		x			x				x				x				x				x
Sabroso	x			x			x						x				x				x
Insípido		x			x				x				x				x				x
Aspero	x			x			x						x				x				x
Suave		x			x				x				x				x				x
Picante				x			x						x				x				x
No picante	x			x			x						x				x				x
Natural		x			x				x				x				x				x
Artificial	x			x			x						x				x				x
Gusta		x			x				x				x				x				x
No gusta	x			x			x						x				x				x



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	José Antonio												Fecha	30/01/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo																			
Dulce	x		x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Aromático			x	x	x			x		x			x	x			x	x	
Inodoro	x						x		x		x			x			x	x	
Fresco		x		x	x			x		x			x	x			x	x	
Rancio		x		x				x	x		x			x			x	x	
Saludable			x	x	x			x	x	x			x	x			x	x	
No saludable	x						x		x		x			x			x	x	
Sabroso		x			x	x				x			x	x				x	
Insípido	x		x				x		x		x			x			x	x	
Aspero				x	x			x		x			x	x					
Suave	x	x	x		x	x		x	x		x			x	x	x	x	x	
Picante		x		x	x			x		x			x	x	x			x	
No picante		x					x		x		x			x			x	x	
Natural	x	x		x	x			x	x		x			x	x		x	x	
Artificial			x				x		x		x			x			x	x	
Gusta		x		x	x			x	x		x			x	x		x	x	
No gusta		x		x			x		x		x			x			x	x	

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	José Antonio												Fecha	07/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x																		
Dulce		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Aromático		x			x	x			x				x	x				x	
Inodoro	x			x				x		x				x			x	x	
Fresco		x			x	x			x				x	x				x	
Rancio		x		x				x	x		x			x			x	x	
Saludable		x			x	x			x				x	x				x	
No saludable	x			x				x	x		x			x			x	x	
Sabroso		x			x	x				x			x	x				x	
Insípido	x			x				x	x		x			x			x	x	
Aspero				x									x	x				x	
Suave	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	x	x	
Picante		x		x	x			x		x			x	x				x	
No picante	x			x				x	x		x			x			x	x	
Natural		x			x	x				x			x	x				x	
Artificial		x		x				x	x		x			x			x	x	
Gusta		x			x	x				x			x	x				x	
No gusta	x			x				x	x		x			x			x	x	

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	José Antonio												Fecha	21/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo																			
Dulce	x		x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Aromático		x			x	x			x				x	x				x	
Inodoro	x			x				x		x				x			x	x	
Fresco		x			x	x			x				x	x				x	
Rancio		x		x				x		x				x			x	x	
Saludable		x			x	x			x				x	x				x	
No saludable	x			x				x	x		x			x			x	x	
Sabroso					x				x				x	x				x	
Insípido	x	x			x	x			x		x			x			x	x	
Aspero				x									x	x				x	
Suave	x	x	x		x	x			x	x	x	x		x	x	x	x	x	
Picante		x			x				x				x	x				x	
No picante	x			x				x	x		x			x			x	x	
Natural		x			x	x				x			x	x				x	
Artificial		x		x				x	x	x	x			x			x	x	
Gusta		x			x	x				x			x	x				x	
No gusta	x			x				x	x	x			x	x			x	x	



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Jorge												Fecha	30/01/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x		x			x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	
Dulce		x		x	x									x					
Aromático	x	x	x		x	x		x	x	x		x		x		x	x	x	
Inodoro																			
Fresco		x		x	x	x		x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	
Rancio	x		x					x	x	x	x		x		x				
Saludable		x		x	x	x		x	x	x	x	x	x	x		x		x	
No saludable	x		x					x							x			x	
Sabroso	x	x	x		x	x		x		x	x	x		x		x	x	x	
Insípido									x					x					
Aspero	x		x			x	x	x			x			x					
Suave		x		x	x				x	x		x	x		x	x	x	x	
Picante		x	x						x		x			x		x	x	x	
No picante	x			x	x	x		x		x	x		x						
Natural		x	x		x	x		x		x	x		x		x	x	x	x	
Artificial	x							x					x		x				
Gusta		x		x	x	x		x		x	x		x		x	x	x	x	
No gusta	x		x					x					x		x				

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Jorge												Fecha	05/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x		x			x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	
Dulce		x		x	x									x					
Aromático	x	x	x		x	x		x	x	x		x	x		x	x	x	x	
Inodoro																			
Fresco		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x	x	x	x	
Rancio	x							x						x					
Saludable	x	x	x		x	x		x			x	x	x			x	x	x	
No saludable								x		x	x			x					
Sabroso	x	x	x		x	x		x	x		x	x		x		x	x	x	
Insípido														x					
Aspero	x		x			x		x	x		x		x	x		x	x	x	
Suave		x	x		x			x		x		x			x				
Picante	x		x					x	x		x			x		x	x	x	
No picante		x		x	x						x			x					
Natural	x	x		x	x			x			x		x		x	x	x	x	
Artificial			x					x	x		x			x					
Gusta	x	x		x	x			x			x		x		x	x	x	x	
No gusta			x					x	x		x			x					

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Jorge												Fecha	05/03/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x		x			x	x	x	x	x	x	x	x			x	x	x	
Dulce		x		x	x									x					
Aromático	x	x	x		x	x		x	x	x		x	x	x		x	x	x	
Inodoro																			
Fresco		x		x	x			x	x	x		x	x		x	x	x	x	
Rancio	x		x					x		x				x		x			
Saludable	x	x		x	x			x	x		x	x	x		x		x	x	
No saludable			x					x		x				x					
Sabroso	x	x	x		x	x		x			x	x		x		x	x	x	
Insípido															x				
Aspero	x		x			x		x	x		x		x	x		x	x	x	
Suave		x		x	x			x	x		x				x				
Picante	x	x	x	x	x	x		x	x		x		x	x		x	x	x	
No picante															x				
Natural		x		x	x			x		x		x	x			x	x		
Artificial	x		x					x		x				x					
Gusta		x		x	x			x		x		x	x		x	x	x	x	
No gusta	x		x					x			x			x		x			



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Pedro Javier												Fecha	03/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo																			
Dulce	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Aromático	x				x		x		x		x				x		x		
Inodoro		x																	
Fresco	x				x		x												
Rancio		x			x		x												
Saludable	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
No saludable																			
Sabroso	x				x		x		x						x				
Insípido		x																	
Aspero		x			x		x												
Suave	x				x		x												
Picante		x			x														
No picante	x																		
Natural					x														
Artificial	x				x														
Gusta	x				x														
No gusta		x																	

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Pedro Javier												Fecha	16/05/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo																			
Dulce	x				x		x		x		x		x		x		x		
Aromático	x				x														
Inodoro		x																	
Fresco					x		x												
Rancio	x				x		x												
Saludable	x				x		x												
No saludable		x																	
Sabroso																			
Insípido	x				x		x												
Aspero		x			x		x												
Suave	x																		
Picante		x			x														
No picante	x																		
Natural		x			x														
Artificial	x				x														
Gusta					x														
No gusta	x																		

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Pedro Javier												Fecha	23/05/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x				x		x		x		x		x		x		x		
Dulce																			
Aromático	x				x		x		x		x		x		x		x		
Inodoro																			
Fresco		x																	
Rancio	x				x		x												
Saludable		x																	
No saludable	x				x		x												
Sabroso																			
Insípido	x				x		x												
Aspero																			
Suave	x				x		x												
Picante		x			x														
No picante	x																		
Natural	x				x														
Artificial																			
Gusta					x														
No gusta	x																		



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Francisco Miguel												Fecha	03/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo																			
Dulce	x																		
Aromático	x																		
Inodoro																			
Fresco																			
Rancio	x																		
Saludable																			
No saludable	x																		
Sabroso	x																		
Insípido																			
Aspero	x																		
Suave																			
Picante	x																		
No picante																			
Natural																			
Artificial	x																		
Gusta																			
No gusta	x																		

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Francisco Miguel												Fecha	20/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x																		
Dulce																			
Aromático	x																		
Inodoro																			
Fresco																			
Rancio	x																		
Saludable																			
No saludable	x																		
Sabroso	x																		
Insípido																			
Aspero	x																		
Suave																			
Picante	x																		
No picante																			
Natural																			
Artificial	x																		
Gusta																			
No gusta	x																		

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Francisco Miguel												Fecha	23/05/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x																		
Dulce																			
Aromático	x																		
Inodoro																			
Fresco																			
Rancio	x																		
Saludable																			
No saludable	x																		
Sabroso	x																		
Insípido																			
Aspero	x																		
Suave																			
Picante	x																		
No picante																			
Natural																			
Artificial	x																		
Gusta																			
No gusta	x																		



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	José Miguel												Fecha	03/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x	x	x	x		x	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x	
Dulce					x				x						x			x	
Aromático	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	
Inodoro																		x	
Fresco		x		x	x			x			x				x			x	
Rancio	x		x					x	x		x		x	x		x	x		
Saludable		x		x				x			x		x	x		x		x	
No saludable	x		x		x			x	x		x			x		x		x	
Sabroso		x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	
Insípido																			
Aspero	x		x	x				x	x		x			x		x	x		
Suave		x			x					x			x					x	
Picante	x	x	x					x	x		x	x		x		x	x		
No picante				x	x		x			x			x		x			x	
Natural		x	x	x				x		x		x	x		x			x	
Artificial	x				x	x			x	x	x			x		x	x		
Gusta		x	x	x	x			x		x		x	x		x			x	
No gusta	x				x	x		x	x		x			x		x		x	

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	José Miguel												Fecha	20/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Dulce																			
Aromático	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Inodoro																			
Fresco		x		x	x			x	x	x		x	x		x			x	
Rancio	x		x					x			x			x		x	x		
Saludable		x		x	x			x	x	x		x	x		x			x	
No saludable	x		x					x			x			x		x	x		
Sabroso	x	x	x	x	x	x		x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	
Insípido											x								
Aspero	x	x	x	x	x	x		x	x		x		x	x	x		x	x	
Suave										x									
Picante	x		x					x			x			x		x	x		
No picante		x		x	x			x	x	x		x	x		x			x	
Natural		x		x	x			x	x	x		x	x		x			x	
Artificial	x		x					x			x			x		x	x		
Gusta		x		x	x			x	x	x		x	x		x			x	
No gusta	x		x					x			x			x		x		x	

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	José Miguel												Fecha	15/05/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x		x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x		x	x	x	
Dulce		x		x					x		x				x			x	
Aromático	x	x	x		x	x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	
Inodoro				x						x			x						
Fresco		x						x			x				x			x	
Rancio	x		x	x	x	x		x	x		x		x	x		x	x		
Saludable		x						x			x		x		x			x	
No saludable	x		x	x	x			x	x		x		x	x		x	x		
Sabroso	x	x	x		x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Insípido				x										x					
Aspero	x		x	x	x	x		x	x		x			x		x	x		
Suave		x								x			x					x	
Picante	x		x		x	x	x	x			x			x		x	x		
No picante		x		x					x	x		x	x		x			x	
Natural		x		x				x	x	x		x			x			x	
Artificial	x		x		x	x		x			x			x		x	x		
Gusta		x		x	x			x		x		x		x		x		x	
No gusta	x		x	x	x	x		x	x		x		x	x		x		x	



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Gala												Fecha	03/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x	x		x			x	x			x		x	x		x	x		
Dulce				x	x			x		x					x		x	x	
Aromático		x			x	x		x		x			x		x				
Inodoro	x		x					x			x			x		x	x		
Fresco		x			x			x		x			x			x			
Rancio	x			x				x		x			x		x	x	x		
Saludable			x		x			x		x			x		x		x	x	
No saludable	x			x				x		x			x		x				
Sabroso	x	x			x			x		x			x		x		x	x	
Insípido			x			x		x							x				
Aspero	x		x	x			x	x					x		x		x		
Suave		x				x				x					x			x	
Picante								x					x						
No picante	x	x		x	x			x	x				x		x		x	x	
Natural		x			x			x					x		x				
Artificial	x			x				x	x						x		x	x	
Gusta		x			x			x		x			x	x		x		x	
No gusta	x			x				x					x		x				

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Gala												Fecha	20/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo		x			x			x	x			x		x		x	x		
Dulce		x				x		x			x			x		x		x	
Aromático			x		x			x			x			x		x			
Inodoro	x					x		x			x			x				x	
Fresco				x		x		x			x			x				x	
Rancio		x	x		x			x	x				x		x		x		
Saludable			x			x		x			x			x		x			
No saludable	x			x				x	x				x		x		x	x	
Sabroso	x	x			x			x			x			x				x	
Insípido			x			x		x						x		x			
Aspero	x	x		x			x	x					x		x		x		
Suave						x					x					x		x	
Picante	x			x				x					x		x		x		
No picante		x			x			x					x			x		x	
Natural		x			x			x					x		x				
Artificial	x			x				x							x		x	x	
Gusta		x			x			x					x	x		x		x	
No gusta	x			x				x	x				x		x		x		

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Gala												Fecha	15/05/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x			x	x			x			x			x		x			
Dulce		x				x			x				x	x		x		x	
Aromático	x			x	x			x			x			x				x	
Inodoro		x				x			x				x		x				
Fresco		x				x			x				x			x		x	
Rancio		x			x			x					x			x			
Saludable			x			x			x				x		x				
No saludable	x			x	x			x							x		x	x	
Sabroso		x			x			x					x		x			x	
Insípido	x			x		x					x				x		x		
Aspero	x			x	x			x					x		x		x		
Suave			x								x					x		x	
Picante				x				x					x					x	
No picante	x					x			x						x		x		
Natural		x			x			x					x			x			
Artificial	x				x			x							x		x		
Gusta		x			x			x					x			x		x	
No gusta	x				x			x					x			x			



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Tomás Javier												Fecha	05/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x		x	x		x	x	x		x		x	x	x		x	x		
Dulce		x			x				x		x				x			x	
Aromático			x		x		x		x		x		x		x			x	
Inodoro	x					x		x			x			x		x			
Fresco			x		x			x		x			x		x			x	
Rancio	x		x				x		x		x			x		x			
Saludable		x			x		x		x		x		x		x		x		
No saludable	x		x				x		x			x			x			x	
Sabroso		x			x			x		x			x		x		x		
Insípido	x		x			x		x			x			x		x			
Aspero	x		x		x		x		x			x		x		x			
Suave		x				x			x		x			x		x		x	
Picante	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
No picante		x					x		x		x			x		x		x	
Natural			x		x			x		x			x		x		x		
Artificial	x		x			x		x			x			x			x		
Gusta		x			x			x		x			x		x		x		
No gusta	x		x				x		x			x		x			x		

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Tomás Javier												Fecha	07/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Dulce		x			x				x		x				x			x	
Aromático			x		x			x		x			x		x			x	
Inodoro	x					x		x			x			x		x			
Fresco			x		x			x		x			x		x			x	
Rancio	x						x		x		x			x		x			
Saludable		x			x			x		x			x		x			x	
No saludable	x						x		x			x			x		x		
Sabroso		x			x			x		x			x		x		x		
Insípido	x		x			x		x			x			x		x			
Aspero	x		x		x			x		x			x		x		x		
Suave		x					x			x			x		x		x		
Picante	x		x		x			x		x			x		x		x		
No picante		x					x		x		x			x		x		x	
Natural			x		x			x		x			x		x		x		
Artificial	x					x		x			x			x			x		
Gusta		x			x			x		x			x		x		x		
No gusta	x						x		x			x			x		x		

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Tomás Javier												Fecha	18/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Dulce		x								x					x			x	
Aromático			x		x			x					x		x			x	
Inodoro	x						x		x			x			x		x		
Fresco			x		x			x		x			x		x			x	
Rancio	x							x		x				x		x			
Saludable			x							x			x					x	
No saludable	x						x		x			x			x		x		
Sabroso		x								x			x					x	
Insípido	x		x		x			x		x				x		x			
Aspero	x		x					x		x			x		x		x		
Suave		x					x						x		x			x	
Picante	x							x		x				x		x			
No picante		x			x			x				x			x			x	
Natural			x		x					x			x		x			x	
Artificial	x						x		x					x			x		
Gusta		x			x					x			x		x			x	
No gusta	x						x		x			x			x		x		



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	José												Fecha	05/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x	x																	
Dulce			x		x		x		x		x		x		x		x		
Aromático	x			x	x		x		x		x		x		x		x		
Inodoro		x																	
Fresco				x		x		x											
Rancio	x		x						x	x		x				x		x	
Saludable	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
No saludable									x						x		x		
Sabroso		x	x		x		x		x		x		x		x		x		
Insípido																	x		
Aspero	x			x			x		x		x				x		x		
Suave		x				x		x						x		x		x	
Picante	x	x	x	x	x														
No picante							x		x										
Natural					x	x		x							x		x		
Artificial	x	x	x						x	x		x			x		x		
Gusta	x		x		x	x		x	x		x		x		x		x		
No gusta																	x		

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	José												Fecha	12/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x			x	x		x		x		x								
Dulce		x																	
Aromático	x		x		x		x												
Inodoro		x			x				x		x								
Fresco																			
Rancio	x		x						x	x		x							
Saludable			x		x				x		x								
No saludable	x			x					x										
Sabroso		x	x		x														
Insípido	x								x	x		x							
Aspero	x			x			x		x		x								
Suave		x																	
Picante	x			x					x	x		x							
No picante			x																
Natural			x		x														
Artificial	x								x	x		x							
Gusta			x		x														
No gusta	x								x	x		x							

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	José												Fecha	19/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x																		
Dulce			x		x				x		x		x		x		x		
Aromático				x	x														
Inodoro	x								x		x								
Fresco																			
Rancio	x																		
Saludable																			
No saludable	x								x	x		x							
Sabroso																			
Insípido	x								x	x		x							
Aspero	x								x	x		x							
Suave																			
Picante																			
No picante	x								x										
Natural																			
Artificial	x																		
Gusta																			
No gusta	x								x	x		x							



COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Juan												Fecha			Telfno					
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo				x																	
Dulce	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Aromático	x		x	x	x		x		x	x	x		x	x	x		x		x		x
Inodoro		x				x					x				x		x				
Fresco		x		x	x			x		x	x		x	x		x					x
Rancio	x		x			x		x		x	x			x		x		x		x	
Saludable		x		x	x			x		x	x		x	x		x		x		x	
No saludable	x		x			x		x			x			x			x				
Sabroso				x				x		x	x		x	x		x					x
Insípido	x	x	x		x	x		x		x				x		x		x		x	
Aspero				x	x			x		x	x				x		x		x		
Suave	x	x	x			x	x						x	x							x
Picante				x	x		x		x	x	x				x		x		x		
No picante	x	x		x		x		x		x	x			x		x		x		x	
Natural		x		x	x			x		x	x			x		x					x
Artificial		x		x		x		x			x			x		x		x		x	
Gusta		x		x	x			x		x	x			x		x		x		x	
No gusta	x		x			x		x		x	x			x		x		x		x	

COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Juan												Fecha			19/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo	x	x		x			x														
Dulce			x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Aromático		x		x			x	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x	x
Inodoro	x		x		x	x					x							x			
Fresco		x		x	x			x		x	x		x	x		x					x
Rancio	x		x			x		x			x				x		x		x		
Saludable		x		x	x			x		x	x		x	x		x		x		x	
No saludable	x		x			x		x			x			x			x				
Sabroso		x		x				x		x	x		x	x		x					x
Insípido	x		x		x	x		x		x	x				x		x		x		
Aspero	x		x			x				x	x				x		x		x		
Suave		x		x	x		x						x	x							x
Picante	x	x	x	x		x	x		x		x				x		x		x		
No picante				x				x		x			x	x							
Natural		x		x	x			x		x	x			x		x					x
Artificial	x		x			x		x			x				x			x		x	
Gusta		x		x	x			x		x	x			x		x		x		x	
No gusta	x		x			x		x		x	x			x		x		x		x	

COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Juan												Fecha			27/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo	x					x															
Dulce		x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Aromático	x	x	x		x	x		x		x			x	x		x		x		x	
Inodoro									x		x				x						
Fresco		x		x	x			x		x	x		x	x		x					x
Rancio	x		x			x		x			x				x		x		x		
Saludable		x		x				x		x	x		x	x		x		x		x	
No saludable	x		x		x			x			x				x			x		x	
Sabroso		x		x				x		x	x		x	x		x					x
Insípido	x		x		x	x		x		x	x				x		x		x		
Aspero	x	x		x	x					x	x				x		x		x		
Suave				x				x						x							
Picante	x	x	x		x	x		x	x		x	x	x	x		x	x	x	x	x	x
No picante				x				x						x							
Natural		x		x				x		x	x			x		x					x
Artificial	x		x		x	x		x	x		x				x			x		x	
Gusta		x		x				x		x	x			x		x		x		x	
No gusta	x		x		x			x	x		x			x		x		x		x	



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Francisco José												Fecha	12/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x	x		x	x	x	x												
Dulce								x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Aromático	x	x		x	x	x	x	x	x										
Inodoro										x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Fresco		x		x	x		x												
Rancio		x		x				x	x		x								
Saludable		x		x	x		x												
No saludable	x							x	x										
Sabroso	x	x	x	x	x	x	x												
Insípido								x	x										
Aspero	x			x	x	x	x												
Suave		x		x				x	x										
Picante	x			x	x		x												
No picante								x	x										
Natural		x		x	x		x												
Artificial	x			x				x	x										
Gusta		x		x			x												
No gusta	x			x	x		x												

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Francisco José												Fecha	19/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo		x		x	x		x												
Dulce	x				x			x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Aromático		x		x															
Inodoro	x				x					x	x								
Fresco																			
Rancio	x			x				x	x		x								
Saludable																			
No saludable	x			x															
Sabroso	x	x	x		x	x		x	x										
Insípido																			
Aspero	x	x	x		x														
Suave																			
Picante	x	x	x		x			x											
No picante																			
Natural																			
Artificial	x			x															
Gusta		x		x															
No gusta		x		x															

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Francisco José												Fecha	26/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo																			
Dulce	x		x		x	x	x	x											
Aromático		x			x														
Inodoro	x				x														
Fresco																			
Rancio		x																	
Saludable																			
No saludable	x																		
Sabroso	x																		
Insípido																			
Aspero		x			x	x													
Suave	x																		
Picante	x	x	x		x														
No picante																			
Natural																			
Artificial		x			x														
Gusta																			
No gusta		x			x														



COLOR EMOTION TEST																						
Nombre	María												Fecha	12/07/2014			Telfno					
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a				
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor				
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x																					
Dulce		x																				
Aromático			x																			
Inodoro	x																					
Fresco				x																		
Rancio	x																					
Saludable			x																			
No saludable	x																					
Sabroso	x	x																				
Insípido			x																			
Aspero	x																					
Suave		x																				
Picante	x																					
No picante			x																			
Natural		x																				
Artificial	x																					
Gusta			x																			
No gusta	x																					

COLOR EMOTION TEST																						
Nombre	María												Fecha	18/02/2014			Telfno					
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a				
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor				
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x																					
Dulce		x																				
Aromático	x																					
Inodoro		x																				
Fresco	x																					
Rancio																						
Saludable																						
No saludable	x																					
Sabroso	x	x																				
Insípido																						
Aspero																						
Suave	x	x																				
Picante	x																					
No picante																						
Natural																						
Artificial		x																				
Gusta																						
No gusta	x																					

COLOR EMOTION TEST																						
Nombre	María												Fecha	26/02/2014			Telfno					
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a				
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor				
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x																					
Dulce		x																				
Aromático																						
Inodoro	x																					
Fresco																						
Rancio	x																					
Saludable																						
No saludable	x																					
Sabroso	x	x																				
Insípido	x																					
Aspero																						
Suave																						
Picante	x																					
No picante																						
Natural																						
Artificial		x																				
Gusta																						
No gusta	x																					



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Julia												Fecha	12/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x			x		x		x		x		x		x		x		x	
Dulce		x			x		x			x			x			x			
Aromático	x	x		x	x		x			x		x	x	x			x	x	
Inodoro							x		x		x				x		x	x	
Fresco		x			x		x		x		x		x		x			x	
Rancio	x			x			x								x		x	x	
Saludable			x		x		x		x		x		x		x		x	x	
No saludable	x			x		x								x			x		
Sabroso			x		x						x			x				x	
Insípido	x			x		x			x				x			x		x	
Aspero	x			x							x						x	x	
Suave			x		x		x		x		x		x		x		x	x	
Picante			x								x				x		x	x	
No picante	x	x		x		x		x		x			x		x		x	x	
Natural			x		x		x				x		x		x		x	x	
Artificial	x								x		x				x		x		
Gusta		x		x					x				x		x		x	x	
No gusta	x			x		x			x		x			x		x		x	

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Julia												Fecha	27/03/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x			x		x		x		x		x		x		x		x	
Dulce		x			x					x			x			x			
Aromático	x	x		x	x		x			x		x	x	x			x	x	
Inodoro							x		x		x				x		x	x	
Fresco		x			x		x				x		x		x			x	
Rancio	x			x			x		x		x			x		x	x	x	
Saludable	x				x		x				x		x		x			x	
No saludable			x						x		x				x		x	x	
Sabroso	x				x		x				x			x				x	
Insípido			x				x		x				x			x		x	
Aspero	x			x							x			x			x	x	
Suave			x		x		x				x		x		x			x	
Picante	x			x					x				x		x			x	
No picante		x			x				x		x			x		x		x	
Natural			x		x		x				x		x		x		x	x	
Artificial	x						x		x		x				x		x		
Gusta	x				x		x				x		x		x		x	x	
No gusta			x				x		x		x			x		x		x	

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Julia												Fecha	07/05/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x			x		x		x		x		x		x		x		x	
Dulce		x			x					x			x			x			
Aromático	x	x		x	x		x			x		x	x	x			x	x	
Inodoro									x		x				x		x	x	
Fresco		x			x						x		x		x			x	
Rancio	x			x					x		x				x		x	x	
Saludable	x				x				x		x		x		x			x	
No saludable			x						x		x				x		x	x	
Sabroso	x				x						x			x				x	
Insípido			x				x				x			x		x		x	
Aspero	x			x							x			x			x	x	
Suave			x		x						x		x		x			x	
Picante	x			x					x				x		x			x	
No picante		x			x				x		x			x		x		x	
Natural			x		x						x		x		x			x	
Artificial	x						x		x						x		x		
Gusta	x				x				x		x		x		x		x	x	
No gusta			x				x		x		x			x		x		x	



COLOR EMOTION TEST																		
Nombre	Pablo Antonio												Fecha	18/02/2014			Telfno	
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo																		
Dulce	x		x		x		x		x		x		x		x		x	
Aromático		x		x			x	x			x			x	x			
Inodoro	x			x		x		x			x				x		x	
Fresco	x	x		x			x	x				x	x		x		x	x
Rancio				x		x		x	x		x				x		x	
Saludable	x	x		x			x	x			x				x		x	
No saludable				x		x			x	x			x					
Sabroso	x		x		x		x	x			x		x		x		x	
Insípido		x				x			x	x					x			
Aspero		x			x	x				x	x				x		x	
Suave	x		x		x		x	x				x	x		x		x	
Picante		x		x		x			x				x				x	
No picante		x		x		x		x		x	x				x		x	x
Natural	x			x		x			x			x				x	x	
Artificial		x		x		x	x		x		x			x				
Gusta	x			x		x	x		x		x			x		x	x	
No gusta		x		x					x		x			x				

COLOR EMOTION TEST																		
Nombre	Pablo Antonio												Fecha	26/02/2014			Telfno	
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo	x		x		x		x		x		x		x		x		x	
Dulce		x		x		x		x		x		x		x		x		x
Aromático																		
Inodoro	x	x		x		x	x				x			x				
Fresco	x		x		x		x			x		x		x			x	
Rancio									x									
Saludable	x		x		x		x			x		x			x		x	
No saludable				x			x		x				x					
Sabroso		x			x					x		x			x			
Insípido	x		x		x		x		x				x					
Aspero	x		x		x		x		x				x				x	
Suave		x			x		x			x					x			
Picante	x	x		x		x								x				
No picante					x		x		x		x			x		x		x
Natural	x		x		x		x			x		x			x		x	
Artificial		x		x			x		x		x			x				
Gusta	x		x		x				x		x			x			x	
No gusta		x		x		x	x		x				x					

COLOR EMOTION TEST																		
Nombre	Pablo Antonio												Fecha	05/03/2014			Telfno	
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo	x		x		x		x		x		x		x		x		x	
Dulce		x		x		x		x		x		x		x		x		x
Aromático																		
Inodoro	x	x		x		x		x			x			x				
Fresco	x	x		x		x		x		x		x		x		x		x
Rancio									x									
Saludable	x		x		x		x			x		x			x		x	
No saludable									x				x					
Sabroso	x		x		x					x		x			x		x	
Insípido				x		x		x			x			x				
Aspero				x		x		x						x				
Suave	x		x		x		x			x				x			x	
Picante																		
No picante	x	x		x		x		x		x			x		x		x	
Natural	x		x		x		x			x		x		x		x		x
Artificial									x									
Gusta	x		x		x				x		x			x		x		x
No gusta				x			x		x				x					



COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Diego												Fecha	20/02/2014	Telfno						
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo																					
Dulce	x																				
Aromático	x																				
Inodoro		x																			
Fresco																					
Rancio	x	x																			
Saludable		x																			
No saludable	x																				
Sabroso		x																			
Insípido																					
Aspero		x																			
Suave	x																				
Picante		x																			
No picante																					
Natural		x																			
Artificial	x																				
Gusta		x																			
No gusta	x																				

COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Diego												Fecha	26/02/2014	Telfno						
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo																					
Dulce	x																				
Aromático		x																			
Inodoro	x																				
Fresco		x																			
Rancio	x																				
Saludable		x																			
No saludable	x																				
Sabroso		x																			
Insípido	x																				
Aspero		x																			
Suave	x																				
Picante		x																			
No picante	x																				
Natural		x																			
Artificial	x																				
Gusta		x																			
No gusta	x																				

COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Diego												Fecha	06/03/2014	Telfno						
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo																					
Dulce	x																				
Aromático		x																			
Inodoro	x																				
Fresco		x																			
Rancio	x																				
Saludable		x																			
No saludable	x																				
Sabroso		x																			
Insípido	x																				
Aspero		x																			
Suave	x																				
Picante		x																			
No picante	x																				
Natural		x																			
Artificial	x																				
Gusta		x																			
No gusta	x																				



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Vicente												Fecha	10/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo		x																	
Dulce	x			x		x		x		x		x		x		x		x	
Aromático		x		x		x		x		x		x		x		x		x	
Inodoro	x																		
Fresco		x			x		x												
Rancio	x			x				x				x			x		x		
Saludable		x			x		x												
No saludable	x			x				x				x			x		x		
Sabroso		x		x		x													
Insípido	x							x				x							
Aspero																			
Suave	x			x		x		x				x			x		x		
Picante																			
No picante		x		x				x				x			x		x		
Natural																			
Artificial	x			x		x						x			x		x		
Gusta		x		x		x						x			x				
No gusta	x							x				x					x		

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Vicente												Fecha	30/05/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo		x																	
Dulce	x			x		x		x		x		x		x		x		x	
Aromático		x		x		x		x		x		x		x		x		x	
Inodoro																			
Fresco		x																	
Rancio	x			x		x		x		x		x		x		x		x	
Saludable		x																	
No saludable	x			x				x				x			x		x		
Sabroso		x																	
Insípido	x			x		x						x			x		x		
Aspero																			
Suave	x			x		x		x				x			x		x		
Picante																			
No picante		x		x		x		x		x		x		x		x		x	
Natural																			
Artificial	x			x		x						x			x		x		
Gusta		x										x			x				
No gusta	x			x		x						x			x		x		

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Vicente												Fecha	06/11/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo		x																	
Dulce	x			x		x		x		x		x		x		x		x	
Aromático		x		x		x		x		x		x		x		x		x	
Inodoro																			
Fresco		x																	
Rancio	x			x				x				x			x		x		
Saludable		x																	
No saludable	x			x				x				x			x		x		
Sabroso		x																	
Insípido	x			x		x						x			x		x		
Aspero																			
Suave	x			x		x		x				x			x		x		
Picante																			
No picante		x		x		x		x		x		x		x		x		x	
Natural																			
Artificial	x			x		x						x			x		x		
Gusta		x		x		x						x			x				
No gusta	x			x				x				x			x		x		



9.3.2.- RESULTADOS CON POBLACIÓN NO ACOSTUMBRADA AL CONSUMO DE ACEITE DE OLIVA

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	José												Fecha	29/01/2014	Telfno				
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x			x			x			x			x			x			
Dulce		x			x			x			x			x			x		
Aromático	x	x		x			x			x			x			x			
Inodoro					x						x						x		
Fresco	x			x					x				x			x			
Rancio			x			x			x				x			x			
Saludable	x				x				x				x			x			
No saludable		x			x				x				x			x			
Sabroso		x			x				x				x			x			
Insípido	x			x			x			x			x			x			
Aspero			x			x					x			x			x		
Suave	x			x			x			x			x			x			
Picante			x			x			x				x			x			
No picante	x			x						x			x			x			
Natural			x			x			x				x			x			
Artificial	x			x			x			x			x			x			
Gusta			x			x			x				x			x			
No gusta	x			x			x			x			x			x			

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	José												Fecha	06/03/2014	Telfno				
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x			x			x			x			x			x			
Dulce		x			x			x			x			x			x		
Aromático		x		x			x			x			x			x			
Inodoro	x					x					x					x			
Fresco		x			x					x						x			
Rancio	x			x					x				x			x			
Saludable		x			x				x				x			x			
No saludable	x				x				x				x			x			
Sabroso		x			x				x				x			x			
Insípido	x				x				x				x			x			
Aspero	x			x							x			x			x		
Suave		x			x				x				x			x			
Picante	x			x					x				x			x			
No picante		x								x						x			
Natural	x			x					x				x			x			
Artificial		x									x							x	
Gusta			x						x				x			x			
No gusta	x								x				x			x			

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	José												Fecha	11/03/2014	Telfno				
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x			x			x			x			x			x			
Dulce		x			x			x			x			x			x		
Aromático		x			x			x			x			x			x		
Inodoro	x				x						x					x			
Fresco		x			x					x						x			
Rancio	x				x				x				x			x			
Saludable		x			x				x				x			x			
No saludable	x				x						x					x			
Sabroso		x			x				x				x			x			
Insípido	x				x				x				x			x			
Aspero	x				x				x				x			x			
Suave		x			x				x				x			x			
Picante	x				x				x				x			x			
No picante		x								x							x		
Natural									x				x			x			
Artificial	x								x				x					x	
Gusta			x						x				x			x			
No gusta	x								x				x			x			



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Amine												Fecha	05/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo			x			x		x			x		x		x		x		
Dulce	x		x		x		x		x		x		x		x		x		
Aromático	x				x		x		x		x		x		x		x		
Inodoro		x		x			x			x			x			x			
Fresco		x		x		x		x		x			x		x		x		
Rancio	x			x			x		x				x			x			
Saludable		x		x		x		x		x			x		x		x		
No saludable							x						x			x			
Sabroso		x			x		x			x			x					x	
Insípido			x			x			x					x		x			
Aspero	x			x			x		x				x		x		x		
Suave		x		x		x		x					x			x			
Picante	x			x		x		x		x			x		x		x		
No picante			x										x					x	
Natural			x						x				x					x	
Artificial		x			x			x						x			x		
Gusta		x		x		x			x				x		x			x	
No gusta		x			x			x					x			x			

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Amine												Fecha	19/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x			x		x		x			x		x		x		x		
Dulce		x					x		x				x		x		x		
Aromático		x			x		x				x		x		x		x		
Inodoro	x			x					x					x					
Fresco		x			x			x					x		x				
Rancio	x			x				x						x		x			
Saludable		x			x				x				x		x		x		
No saludable	x					x				x				x			x		
Sabroso		x			x			x					x		x		x		
Insípido	x			x			x			x				x			x		
Aspero	x				x			x						x		x			
Suave		x			x				x				x			x			
Picante	x			x					x				x		x		x		
No picante			x										x					x	
Natural			x										x		x			x	
Artificial	x					x			x							x			
Gusta		x			x				x				x		x			x	
No gusta	x					x			x						x				

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Amine												Fecha	27/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x			x		x		x			x		x		x		x		
Dulce		x					x		x				x			x			
Aromático		x				x		x					x			x			
Inodoro	x			x					x				x						
Fresco		x			x			x					x		x				
Rancio	x			x				x						x		x			
Saludable																			
No saludable		x							x						x		x		
Sabroso		x				x			x									x	
Insípido	x			x				x					x			x			
Aspero	x			x					x					x			x		
Suave		x				x							x			x			
Picante	x			x									x						
No picante			x						x						x				
Natural			x						x				x						
Artificial		x												x					
Gusta		x				x							x						
No gusta	x								x						x				



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Juan												Fecha	07/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x			x			x		x				x			x		x	
Dulce		x			x		x			x		x		x			x		x
Aromático			x			x			x		x					x		x	
Inodoro	x			x			x						x	x			x		x
Fresco				x			x		x		x					x	x	x	
Rancio	x	x			x			x					x	x					
Saludable		x		x		x			x		x					x		x	
No saludable	x							x		x				x	x				
Sabroso		x			x		x			x		x				x		x	
Insípido	x				x			x					x	x			x		x
Aspero	x			x				x						x		x			
Suave		x				x			x		x				x		x		x
Picante	x			x			x						x			x		x	
No picante		x			x			x		x				x			x		x
Natural			x		x						x					x			x
Artificial	x						x		x				x			x		x	
Gusta		x			x		x			x				x			x		x
No gusta	x				x			x			x			x	x				x

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Juan												Fecha	12/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x			x			x					x		x					x
Dulce			x			x		x	x		x				x	x		x	x
Aromático		x				x			x		x				x	x			x
Inodoro	x			x			x							x					x
Fresco		x			x			x		x						x	x		x
Rancio	x				x								x	x					
Saludable		x				x			x		x					x	x		x
No saludable	x		x					x						x					
Sabroso		x			x			x		x						x		x	
Insípido	x				x			x					x				x		x
Aspero	x			x				x						x					
Suave		x				x			x						x				x
Picante	x				x								x						
No picante		x		x			x						x						x
Natural			x		x						x								x
Artificial	x						x		x				x						x
Gusta		x			x		x						x						x
No gusta	x				x									x					

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Juan												Fecha	17/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x			x				x					x						x
Dulce		x			x				x		x					x			x
Aromático	x							x		x					x				x
Inodoro		x			x									x					x
Fresco	x							x		x						x			x
Rancio					x				x					x	x				x
Saludable	x					x			x		x					x			x
No saludable			x						x						x				
Sabroso					x				x		x					x			x
Insípido	x	x			x									x					x
Aspero	x				x				x						x				x
Suave		x																	x
Picante	x				x									x					x
No picante		x																	x
Natural			x		x														x
Artificial		x							x					x					x
Gusta	x				x				x					x					x
No gusta					x										x				



COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Cayetano												Fecha	07/02/2014			Telfno				
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo																					
Dulce	x	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Aromático																					
Inodoro	x	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Fresco	x				x	x		x			x	x		x	x	x		x	x		x
Rancio				x				x			x										
Saludable	x	x			x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
No saludable				x																	
Sabroso		x	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x	
Insípido																					
Aspero																					
Suave	x	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Picante																					
No picante	x	x			x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Natural	x				x	x		x			x			x	x	x		x	x		x
Artificial				x				x			x			x	x	x		x	x		x
Gusta	x				x	x		x			x			x	x	x		x	x		x
No gusta				x							x										

COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Cayetano												Fecha	18/02/2014			Telfno				
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo																					
Dulce	x		x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Aromático																					
Inodoro	x		x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Fresco	x		x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Rancio																					
Saludable	x		x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
No saludable																					
Sabroso	x		x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Insípido																					
Aspero																					
Suave	x		x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Picante																					
No picante	x		x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Natural					x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Artificial	x				x			x			x			x							
Gusta	x		x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
No gusta																					

COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Cayetano												Fecha	30/05/2014			Telfno				
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo																					
Dulce	x		x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Aromático																					
Inodoro	x		x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Fresco	x		x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Rancio																					
Saludable	x		x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
No saludable																					
Sabroso	x		x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Insípido																					
Aspero																					
Suave	x		x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Picante																					
No picante		x			x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Natural	x		x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
Artificial																					
Gusta	x		x		x	x		x	x		x	x		x	x	x		x	x		x
No gusta																					



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Gabino												Fecha	18/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x																		
Dulce		x																	
Aromático																			
Inodoro	x																		
Fresco	x																		
Rancio		x																	
Saludable	x																		
No saludable		x																	
Sabroso																			
Insípido	x																		
Aspero																			
Suave	x																		
Picante																			
No picante	x																		
Natural	x																		
Artificial																			
Gusta		x																	
No gusta	x																		

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Gabino												Fecha	07/03/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x																		
Dulce		x																	
Aromático	x																		
Inodoro		x																	
Fresco	x																		
Rancio																			
Saludable		x																	
No saludable	x																		
Sabroso																			
Insípido	x																		
Aspero	x																		
Suave		x																	
Picante	x																		
No picante		x																	
Natural																			
Artificial	x																		
Gusta		x																	
No gusta	x																		

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Gabino												Fecha	12/03/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x																		
Dulce		x																	
Aromático	x																		
Inodoro		x																	
Fresco	x																		
Rancio																			
Saludable	x																		
No saludable		x																	
Sabroso																			
Insípido	x																		
Aspero	x																		
Suave		x																	
Picante	x																		
No picante		x																	
Natural																			
Artificial	x																		
Gusta																			
No gusta	x																		



COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Georgiama												Fecha	18/02/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo																			
Dulce	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Aromático	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Inodoro																			
Fresco	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Rancio																			
Saludable																			
No saludable	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Sabroso	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Insípido																			
Aspero																			
Suave	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Picante	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
No picante																			
Natural	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Artificial																			
Gusta	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
No gusta																			

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Georgiama												Fecha	30/04/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo	x			x			x			x			x			x			
Dulce		x		x			x			x			x			x			
Aromático	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Inodoro																			
Fresco	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Rancio																			
Saludable																			
No saludable	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Sabroso	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Insípido																			
Aspero																			
Suave	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Picante	x			x	x		x			x			x			x			
No picante																			
Natural	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Artificial																			
Gusta	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
No gusta																			

COLOR EMOTION TEST																			
Nombre	Georgiama												Fecha	16/05/2014			Telfno		
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a	
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	
Amargo																			
Dulce	x			x			x			x			x			x			
Aromático	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Inodoro																			
Fresco	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Rancio																			
Saludable																			
No saludable	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Sabroso	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Insípido																			
Aspero																			
Suave	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Picante	x			x	x		x			x			x			x			
No picante																			
Natural	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
Artificial																			
Gusta	x	x		x	x		x	x		x	x		x	x		x	x	x	
No gusta																			



COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Monain												Fecha	18/02/2014			Telfno				
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo	x																				
Dulce		x																			
Aromático			x																		
Inodoro	x			x																	
Fresco	x																				
Rancio				x																	
Saludable	x																				
No saludable																					
Sabroso																					
Insípido	x																				
Aspero																					
Suave	x																				
Picante																					
No picante	x																				
Natural																					
Artificial																					
Gusta																					
No gusta	x																				

COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Monain												Fecha	24/02/2014			Telfno				
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo	x																				
Dulce		x																			
Aromático	x																				
Inodoro		x																			
Fresco																					
Rancio	x																				
Saludable																					
No saludable	x																				
Sabroso																					
Insípido	x																				
Aspero	x																				
Suave		x																			
Picante	x																				
No picante		x																			
Natural																					
Artificial	x																				
Gusta																					
No gusta	x																				

COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Monain												Fecha	04/03/2014			Telfno				
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo	x																				
Dulce		x																			
Aromático	x																				
Inodoro		x																			
Fresco																					
Rancio	x																				
Saludable																					
No saludable	x																				
Sabroso																					
Insípido	x																				
Aspero	x																				
Suave		x																			
Picante	x																				
No picante		x																			
Natural																					
Artificial	x																				
Gusta																					
No gusta	x																				



COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Anne Paola												Fecha	21/02/2014	Telfno						
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo			x		x	x	x	x		x	x			x	x	x					
Dulce	x		x		x				x		x		x				x	x			
Aromático	x		x				x		x		x		x			x	x	x			
Inodoro			x		x			x		x				x			x	x			
Fresco		x	x		x			x		x		x			x	x	x	x			
Rancio				x		x			x					x							
Saludable	x		x		x				x		x		x				x	x			
No saludable			x			x		x		x				x		x					
Sabroso	x			x							x		x				x				
Insípido		x		x		x		x		x				x		x		x			
Aspero			x						x		x					x					
Suave	x			x		x		x					x		x		x	x			
Picante										x											
No picante	x		x		x		x		x				x		x		x	x			
Natural	x		x		x		x		x			x		x				x			
Artificial				x				x		x				x		x	x				
Gusta	x		x		x				x		x		x			x		x			
No gusta					x		x			x				x		x					

COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Anne Paola												Fecha	27/02/2014	Telfno						
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo	x		x			x		x		x		x		x		x					
Dulce		x			x				x					x				x			
Aromático	x		x		x									x							
Inodoro			x		x			x		x		x		x		x		x			
Fresco			x		x			x		x		x			x		x	x			
Rancio	x								x					x		x					
Saludable	x				x									x			x	x			
No saludable		x				x		x		x		x		x		x					
Sabroso	x			x					x		x			x				x			
Insípido		x		x				x						x		x		x			
Aspero	x														x			x			
Suave		x		x		x		x		x		x		x		x		x			
Picante																					
No picante	x		x		x		x		x		x		x		x		x	x			
Natural			x		x									x		x		x			
Artificial	x							x		x		x									
Gusta		x			x													x			
No gusta	x							x		x		x									

COLOR EMOTION TEST																					
Nombre	Anne Paola												Fecha	07/03/2014	Telfno						
Tipo Aceite	4c	2a	5c	7c	6b	2c	7a	1c	2b	5a	4b	6a	7b	6c	1a	1b	5b	4a			
	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor	Valor			
Parámetros	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Amargo	x		x		x		x		x		x		x		x		x				
Dulce		x		x					x					x				x			
Aromático	x		x											x							
Inodoro			x					x		x		x		x		x		x			
Fresco				x				x		x		x		x				x			
Rancio	x				x												x				
Saludable																					
No saludable	x				x			x		x		x		x		x		x			
Sabroso		x																x			
Insípido	x				x			x		x		x		x		x		x			
Aspero	x																				
Suave		x			x			x						x		x		x			
Picante	x																				
No picante		x																			
Natural	x		x		x													x			
Artificial								x		x											
Gusta																					
No gusta	x				x			x		x		x		x		x					





10. SUMMARY

Thesis title:

EXTRA VIRGIN OLIVE OILS ENRICHED WITH NEW ANTIOXIDANTS FROM MICROALGAE. PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERIZATION, COLORIMETRIC AND STABILITY TEST.

1.- INTRODUCTION

2.- MATERIALS AND METHODS

- 2.1.- Production conditions of microalgae *S. almeriensis*
- 2.2.- Extraction methods
- 2.3.- Physicochemical characterization of lutein and oils. Stability measures
- 2.4.- Extra virgin olive oils
- 2.5.- Chemical characterization of oils enriched with antioxidants
- 2.6.- Color emotion studies

3.- RESULTS AND DISCUSSION

- 3.1.- Stability based on incident radiation: photo-stability
- 3.2.- Stability as a function of temperature: thermostability
- 3.3.- Stability as a function of time: preferential consumption
- 3.4.- Specific stability studies
 - 3.4.1.- Photo-stability according to the ripeness index of the fruit
 - 3.4.2.- Photo-stability depending on the variety of the fruit
 - 3.4.3.- Thermostability according to the ripeness index of the fruit
 - 3.4.4.- Thermostability depending on the variety of the fruit
- 3.5.- Studies of chemical quality parameters
- 3.6.- Studies of visual appreciation of oils. Color Emotion Studies

4.- CONCLUSIONS

5.- REFERENCES



1.- INTRODUCTION

There is a growing interest in the development of functional foods, which are those that are capable of providing health benefits, in addition to their nutritional or energy value. These products are usually traditional foods enriched in one or more components, which exert or promote a beneficial effect for human health.

Interest in carotenoids has recently increased based on studies suggesting the protective effect of an adequate intake of these compounds in the prevention and evolution of human degenerative diseases, such as ophthalmologic and dermatological diseases. At present, there are no drugs that can correct these diseases, so the only viable strategy to prevent them. However, the recommended dose of carotenoids for risk groups can hardly be covered by dietary modifications. For this reason, one of the prevention routes with better prospects is the intake of foods enriched in antioxidants.

On the other hand, it is well known that olive oil possesses due to its chemical composition important properties that make it a very healthy and recommended food, whilst presenting a high factor of digestibility, a very important parameter in food. There are many scientific works that support the importance of its incorporation into a balanced diet, showing very beneficial effects on health, among which we can mention: reduction of cholesterol level; decreased risk of arterial infarction and thrombosis; efficacy in the fight against ulcers, gastritis and acidity in general; regulation of intestinal transit and stimulation of bone growth and prevention of many human degenerative diseases.

Extra virgin olive oil is a very balanced food that consists of a large variety of molecules: hydrocarbon compounds, sterols, diterpene and triterpenic compounds, aliphatic alcohols, tocopherols, pigments, chlorophylls and carotenoids.

Within the family of carotenoids, lutein and β -carotene are found in very small amounts in olive oil in their original composition, being below recommended values for the prevention of human degenerative diseases (e.g., The Senile Macular Degeneration, AMD). However, it is important to note that olive oil may be an adequate means of transporting these carotenoids because of their characteristics and because they contain small amounts of these carotenoids. Increasing the concentration of previously existing components should not lead to severe stability problems, a fact that could occur when trying to add chemical compounds totally foreign to the receiving environment.



In the current state of research on the role of antioxidants such as lutein in the prevention of AMD, one of the main concerns is to determine the extent to which the lutein supplied by different dietary sources is digested and adsorbed (digestibility-bioaccessibility studies). This concern extends to commercial extracts currently used in nutritional supplements containing lutein. In this sense, only products of known and adequate digestibility are useful as a contribution of lutein in the human diet. Moreover, only products of known digestibility will be useful in future studies of the role of lutein in the prevention of diseases such as ocular diseases. Thus, there are in vitro studies, which show how fat-rich food matrices, such as olive oil and the like, can facilitate and/or benefit the bioassimilation process of this type of carotenoids (Rangaswamy et al., 2007; Granado et al., 2009, 2010; Nidhi and Baskaran, 2011). There are also studies of thermal degradation of carotenoids in olive oils and the like, which can affect the physicochemical and coloring properties of the oils and therefore their appearance and acceptability by the consumer (Aparicio et al., 2011). In a previous patent, it has been proposed to incorporate olive oil of different carotenoids in the use of Marigold flower (European Patent, 2006).

In this context, this Doctoral Thesis aims to obtain new functional foods based on extra virgin olive oils, enriched in antioxidants from marine microalgae, for the prevention of degenerative diseases associated with antioxidant deficiency.

Thus, the necessary methodology for obtaining extracts of carotenoids from the marine microalga *Scenedesmus almeriensis* (a species rich in lutein and β -carotene) has been developed, which have been used to enrich carotenoids in different types of virgin olive oils. These oils constitute a potential medium for the incorporation of carotenoids in the appropriate doses to the human organism, through a food so important and characteristic of the Mediterranean.

Therefore, it is sought to provide the oils with an added value superior to that already exists. This has been proven that the enrichment in antioxidants improves the stability characteristics of the oils against typical variables of degradation in food, such as the exposure to light, temperature and the passage of time.

The extra virgin olive oils enriched in carotenoids, have been characterized physicochemically, to know all their parameters and thus to be able to evaluate the effect of the improvement of the antioxidant fraction in them. Initially, the most suitable



concentration of carotenoids to be reached in the oils tested was carried out by performing different experiments in which the amount of extract was added progressively.

Subsequently, the oils enriched in the new antioxidants have been subjected to different characterizations of physicochemical type to compare them with the same oils without enriching them, which have been used as a method of control. Thus, a complete analysis of chemical parameters has been carried out: referring to the quality of the oils (free acidity, primary and secondary oxidation compounds, peroxide index, K_{232} , K_{270} , *p*-anisidine, composition (profile of fatty acids, tocopherols, pigments,...) and parameters related to bioactivity (total phenolic compounds, DPPH and ABTS). With respect to physical type studies, monitoring has been carried out by measuring the color of oils, which has allowed us to obtain information on the stability of the samples against the main degradation variables discussed: time, temperature and exposure to the light. In addition, the stability of the enriched oils has been studied as a function of the maturation index of the fruit and its variety.

Another part of this report has been dedicated to the studies of emotions provoked by the color of the samples and the changes of color that the oils undergo when enriched in antioxidants. Thus, it is sought to know if these color changes are accepted and to what extent, by potential consumers, a very important aspect if we want to address the industrial development of the business idea based on the procurement and marketing of these new functional foods based on olive oils.

These results support the idea of being able to use extra virgin olive oil as a means of incorporating the necessary quantities of carotenoids into the body. Thus, giving the olive oil an added value which is superior to the ones already available whilst at the same time offering an alternative solution from the current ones in the fight against certain degenerative human diseases.

Finally, it is important to highlight the applicability of the results obtained, which would produce a line of olive oils enriched in new antioxidants that would add to both strategies to fight human degenerative diseases, as well as in the development of the industrial and social fabric of our environment.



2.- MATERIALS AND METHODS

2.1.- Production conditions of microalgae *S. almeriensis*

The microalgae *S. almeriensis* (Figure 1) CCAP 276/24 was produced in an industrial size outdoor tubular photo bioreactor (3.000 L), in continuous mode at 0.30 L/day dilution rate, on Almería (Spain) at spring (Figure 2). Culture medium used was prepared on freshwater using fertilizers (NaNO_3 , KH_2PO_4 , micronutrients). To avoid contamination the culture medium was ozonized and passed by ultrafiltration up to 0.02 μm . The cultures were performed at $\text{pH}=8.0$ by on-demand injection of CO_2 , and below 30 °C by passing thermostated water through a heat exchanger located inside the reactor. The biomass was daily harvested by centrifugation, then being lyophilized and stored at -18 °C. Lyophilized biomass was used as raw material (Acién et al., 2012).

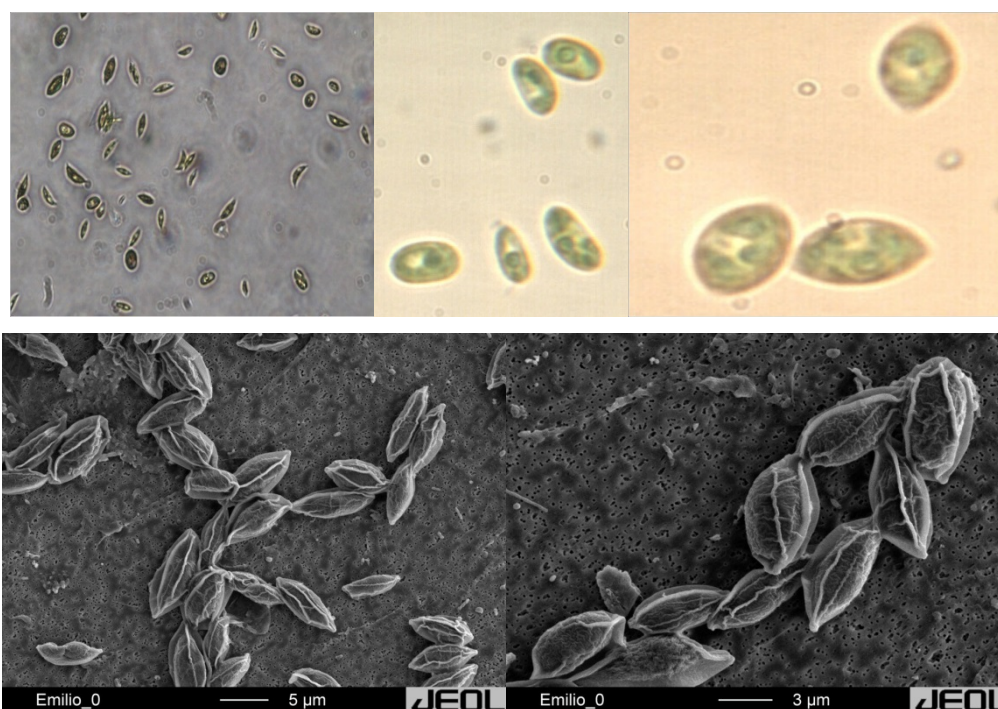


Figure 1
Images of *S. almeriensis* taken by optical and electronic microscope.



Figure 2

Tubular photo bioreactors used for biomass production of *S. almeriensis* microalgae.

2.2.- Extraction methods

Lutein is currently separated and purified from marigold flowers by saponification-extraction-recrystallization method (Morita et al., 2002). A modification of this method has been used to recover carotenoids from lyophilized biomass of *S. almeriensis* (Figure 3) (Cerón et al., 2008).



Figure 3

Lyophilized biomass of *Scenedesmus almeriensis*.

The Figure 4 shows the general outline of the process of extraction and purification. First step is a cell disruption process, with alumina in a 1:1 w/w proportion, using a beads mill (Staatlich Berlin Ku 4) at rotation speed of 120 rpm and with beads of 28 mm diameter for 5 min to remove fatty acids soaps. Second step is a saponification

performed using 4% w/v KOH with a biomass concentration of 100 g/L for 5 min. Longer alkaline treatments or the use of higher KOH concentrations reduced the yield of the process. Finally, extraction with hexane is performed using a 1:1 ratio hexane to sample volume, a total of three steps being performed to recover more than 90% of carotenoids contained in the processed biomass. In each step a volume of ethanol equal to 1% of the total volume was added for avoiding emulsion (Camacho et al., 2007). Hexane was removed from the extract by high vacuum distillation.

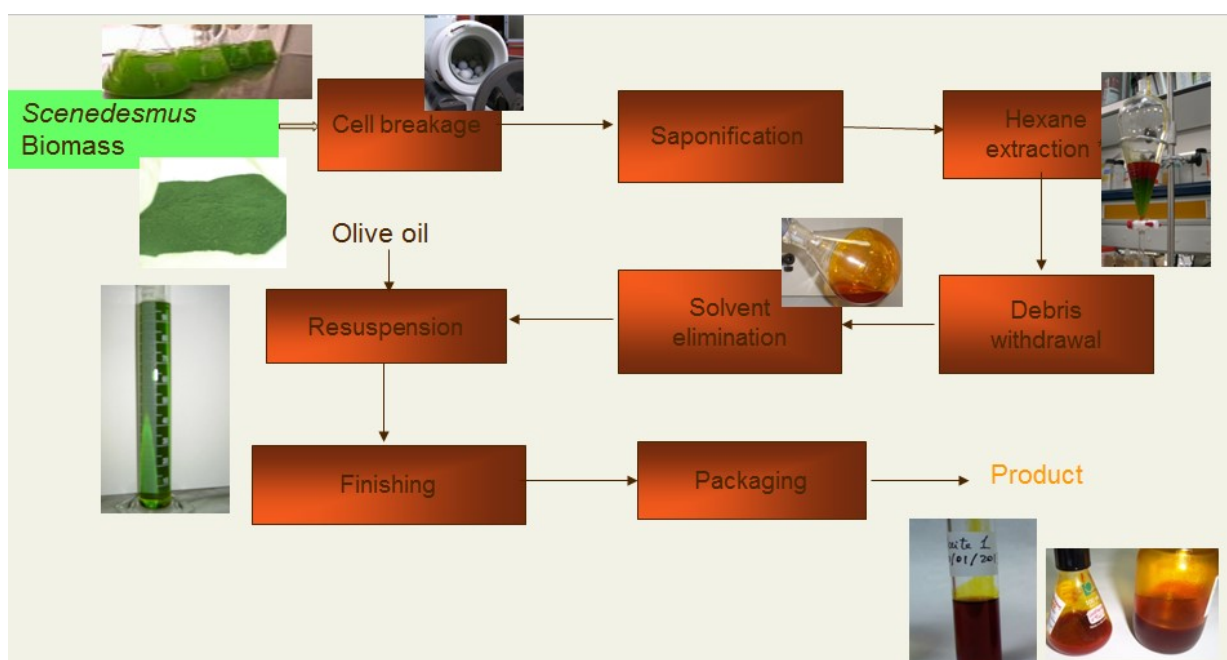


Figure 4

General process for the obtaining of antioxidant extract from microalgae biomass.

2.3.- Physicochemical characterization of lutein and oils. Stability measures.

With the idea of incorporating a quantity of lutein sufficient for the prevention of Age-related Macular Degeneration (AMD), which ranges from 3 to 6 mg/day (Jhonson-Down et al., 2002, Krinsky et al., 2003; Silva, 2004) , oils have been prepared with lutein concentrations of between 0.02 to 0, 16 mg/ml oil.

According to the IOC 2011, the average consumption of AOVE in Spain per day per inhabitant is 36 ml. With the oil samples prepared in this way would give the organism between 0.72 - 5.76 mg of lutein per day. In this sense, oils with two working concentrations, 0.05 and 0.1 mg lutein/ml of oil, have been chosen for the studies (photo-

stability and thermostability), which are within the range indicated above (0.02 - 0.16 mg/ml oil). At these concentrations, 1.8 and 3.6 mg of lutein were added to the body, respectively, with 36 ml of daily AOVE intake. These amounts added to those ingested with the rest of the foods in a Mediterranean diet, would allow reaching the amounts of lutein recommended for the prevention of diseases associated with their deficit (3-6 mg/day) (Krinsky et al., 2003; Silva, 2004).

To perform the stability measurements of lutein-enriched oils, they have been carried out using the color variations of said oils compared without adding them as a starting control (Figure 5).

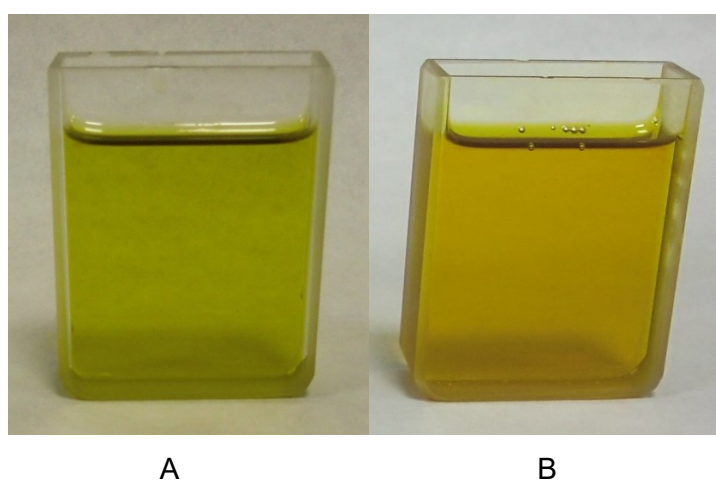


Figure 5
Some of the different oils tested.
Oil control (before addition) (A), oil enriched after addition (B).

Spectrophotometric determination of color has been used to characterize and monitor oil samples using a Konica Minolta CM-5 spectrophotometer connected to a computer equipped with Spectra Magic NX PRO USB software. The equipment provides measurements in the CIELAB color space using D65 illuminator and CIE 1931 colorimetric observer.

14 ml of oil was placed in a transparent quartz cuvette with dimensions of 4.2 x 3.2 x 1.0 cm and values of colorimetric parameters of each sample (L^* , a^* , b^*), as well as those corresponding to the variations thereof by comparison with the control oil (ΔL^* , Δa^* , Δb^* and ΔE^*_{ab}) were measured.

For the photo-stability measurements, the samples were exposed continuously to ultraviolet light in a control and color comparison booth CAC 60 Verivide (Figure 6). Control measures were taken at time intervals distributed over two months and they were performed at room temperature (20 ° C).



Figure 6

Samples of oils subjected to illumination in lighting control booth (right) and detail of ultraviolet light source (left).

In the case of thermo-stability measurements of the enriched oils, the samples were immersed in a Julabo precision thermostat, equipped with Thermal H5S liquid to be able to work at temperatures above 100°C (Figure 7). The color measurements of the samples were made at time intervals of about 2 to about 12 hours for a total period of time of 74 hours, with the samples being subjected to a constant temperature of 120°C.



Figure 7

EVOO's samples subjected to 120 °C in a thermostatic bath (left) and thermostat detail (right).

2.4.- Extra virgin olive oils

Extra virgin olive oils (EVOO's) from different olive varieties have been used: "Picual", "Arbequina", "Hojiblanca", "Frantoio" and "Royal". The oils have been obtained commercially and they come mainly from the province of Jaén, although oils from the provinces of Granada, Córdoba and Málaga have also been studied (Table 1).

In the experiments related to the influence of the index of maturation on the stability of the oils, the oil samples were obtained in the same oil mil with the same extraction process and the only thing that changed was the time of harvesting. Thus, olive oil from the "Picual" variety was used in the months of October, November and December 2013.

For the experience related to the stability according to the variety of the fruit, the oil samples were obtained in the same oil mil with the same extraction process, in the same period of the 2013-2014 season, but using different types of fruit: "Picual", "Arbequina", "Frantoio" and "Royal".

Table 1
EVOO's used in the enrichment experiments on lutein from the algae *S. almeriensis*.

Olive oil	Origin	Variety	L^*	a^*	b^*
A: Fuenroble (FR)	Jaén	Picual	78,8	6,9	123,1
B: Santuario de Mágina (SM)	Jaén	Picual	81,9	5,1	122,3
C: Oro Bailén (OB)	Jaén	Picual	83,7	1,8	119,2
D: Oro Génave (OG)	Jaén	Picual	86,4	2,6	120,5
E: Hojiblanca	Málaga	Hojiblanca	87,8	1,7	111,8
F: La Cántara	Jaén	Picual	87,5	0,3	107,9
G: Melgarejo	Jaén	Picual	88,8	1,3	109,0
H: Carbonell	Nacional	Picual	88,0	0,7	105,3
I: Garay	Córdoba	Arbequina	88,2	0,7	102,6
J: Baena	Córdoba	Picual	88,8	0,5	102,1
K: Abades	Granada	Picual	89,1	-0,03	102,7
L: Castillo Canena Picual (CCP)	Jaén	Picual	80,3	3,1	121,0
M: Castillo Canena Arbequina (CCA)	Jaén	Arbequina	81,7	-1,1	118,3
N: Castillo Canena Frantoio (CCF)	Jaén	Frantoio	86,2	3,3	116,3
P: Castillo Canena Royal (CCR)	Jaén	Royal	80,1	4,9	121,5



2.5.- Chemical characterization of oils enriched with antioxidants

To carry out the chemical study of oils, five commercial extra-virgin olive oil (EVOO's) representatives from Jaén region were selected for the present study (A, B, C, D and F). Three bottles of 750 ml of each olive oil were obtained (n=3). From each bottle, three samples of 50 ml were constituted: control (I - olive oils without extract); olive oil with 0.1 mg of extract per ml of oil (II); and olive oil with 0.21 mg of extract per ml of oil (III). All olive oils were filtrated in the presence of sulphate sodium anhydrous before use. Once prepared, samples were homogenized and kept under 4 °C prior to any analysis.

Free acidity (FA), peroxide value (PV) and coefficients of specific extinction at 232 and 270 nm (K_{232} and K_{270}) were determined according to European Union standard methods (Annexes II and IX in European Community Regulation EEC/2568/91 from 11th July). In addition, the following parameters have also been analyzed: *p*-anisidine value determination, oxidative stability, fatty acids composition, tocopherols composition and pigments composition.

Free acidity

It has been determined by titration of the sample of oil dissolved in ethanol: ether (1:1, v/v) using ethanolic solution from potassium hydroxide.

Peroxide value

The peroxide index value, expressed as milliequivalents of active oxygen per kilogram of oil (mequiv/kg), was determined as follows: 3:2 (v/v) a mixture of oil and chloroform/acetic acid was allowed to react with a saturated and dark potassium iodide solution; the free iodide was then titrated with a solution of sodium thiosulfate.

Determination coefficients of specific extinction K_{232} y K_{270}

For the determination of the extinction coefficients K_{232} y K_{270} , the absorbance at these two wavelengths of a 1% (m/v) solution in isooctane was measured using a 1 cm quartz cuvette in a Lambda 20 spectrophotometer (Perkin Elmer).



p-anisidine value determination

Unsaturated aldehydes, secondary oxidation products, were estimated by the anisidine value (*p*-AV), as detailed in ISO 6885 (2006). This measurement is based on the absorbance increase per g of oil, measured at 350 nm (Genesys 10UV), of an olive oil solution in iso-octane, before and after reaction with *p*-anisidine reagent in the dark.

Oxidative stability

The oxidative stability was estimated by measuring the oxidation induction time, on a Rancimat 743 apparatus (Metrohm CH, Switzerland). Filtered, cleaned, dried air (20 L/h) was bubbled through the oil (3.00 g) heated at 120 ± 1.6 °C, with the volatile compounds being collected in water, and the increasing water conductivity continuously measured. The time taken to reach the conductivity inflection was recorded.

Fatty acids composition

Fatty acids were evaluated as their methyl esters after cold alkaline transesterification with methanolic potassium hydroxide solution (European Community Regulation EEC/2568/91 from 11th July) and extraction with n-heptane. The fatty acid profile was determined with a Chrompack CP 9001 chromatograph.

Tocopherols composition

Tocols were evaluated following the international standard ISO 9936 (2006), with some modifications as described by Malheiro et al., (2013). Tocopherols standards (α , β , γ and δ) were purchased from Calbiochem (La Jolla, San Diego, CA) and Sigma (Spain), while the internal standard 2-methyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)chroman-6-ol (tocol) was from Matreya Inc. (Pleasant Gap, PA).

Pigments composition

The extracts were prepared in accordance with Achir et al., (2010). Briefly, olive oil samples (200 mg) were added with an appropriate amount of internal standard β -apo-carotenal (Sigma-Aldrich), mixed with 2 ml acetone, vortexed for 10 s, and left overnight at



-20 °C for triacylglycerol crystallization. Triacylglycerols were separated by rapid sampling followed by centrifugation at 13,000 rpm.

2.6.- Color emotion studies

The amounts of carotenoids that are found in human tissues are almost exclusively from dietary origin, mainly from fruits and vegetables, or from supplements. It has been reported that the uptake of β -carotene reduces the risk of age-related macular degeneration (Teikari, 1998). In addition, it has been shown that olive oil with extract from microalgae known as *Scenedesmus almeriensis* brought changes in olive oils, quality, composition, color and stability giving. Therefore, olive oil with an addition of microalgae extract could be a good convoy to improve and enhance the intake of carotenoids in a daily basis. Although this change in color may not change its taste or smell, the subjective perception of these factors can change (Zellner, 2003) and color emotion techniques help to quantify the expectation of a product when it is perceived by the human eye (Wei, 2014). As color is one of the critical factors influencing customers' satisfactory, an understanding of color sensations is thus important in selecting a product. Color sensations for single colors have long been studied (Sato, T. et al., 2000). It has been analyzed how the color of extra virgin olive oils changes when we add lutein and β -carotene enriched extract from the *Scenedesmus almeriensis* in order to find out how the human has perceived this change in color by using color semantic methods (Ou, 2004).

Six samples of different extra-virgin olive oils have been selected, five of them obtained in the same harvest season: "Fuenroble", "Santuario de Mágina", "Oro Bailén", "Castillo de Canena" and "Melgarejo 1"; and another one from the previous harvest season "Melgarejo 2". For each one of these samples we have prepared three different samples by adding different concentration of extract of microalgae: 0.00 mg/ml, 0.05mg/ml and 0.1 mg/ml.

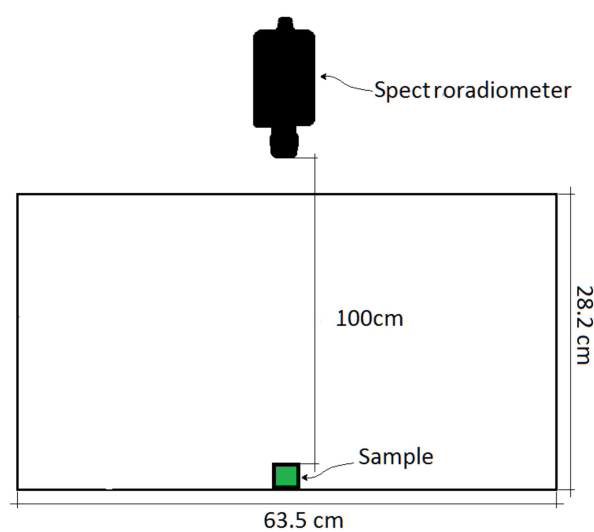
18 samples have been used, 6 oils \times 3 concentrations. Each one of the samples was poured into bottles with dimensions of 1.5 cm x 1.5cm x 6.0 cm and a capacity of about 20 ml (Figure 8). These bottles have rectangular prism shapes and their flat faces allow homogenous color of the oils, making it easier for their color measurement and color perception. All the samples were kept in a controlled environment during the entire experiment.



**Figure 8**

Detail of the 18 AOVE's used for visual assessment tests by potential consumers.

Color measurement of the samples has been made placing the samples in a Verivide Portable cabinet (Verivide, Leicester, United Kingdom) using a D65 light source simulator. The walls of the cabinets were covered by white non fluorescent paper in order to avoid shades in the samples and have a lighter background behind the samples. The color was measured using a Konica Minolta CS2000A spectroradiometer (Konica Minolta, Nieuwegein, Netherlands) in the same position that the observers performed the visual experiment (Figure 9). Tristimulus values were computed assuming CIE64 standard observer. Three replicas of the measurements were made. (Gómez-Robledo et al., 2015).

**Figure 9**

Geometry of the color measurement of the samples.

Different observers were asked to describe each of the samples following 9 pairs of opposite descriptors: Aromatic-Odourless, Bitter-Sweet, Fresh-Rancid, Healthy-Unhealthy, Like-Dislike, Natural-Artificial, Spicy-Non spicy, Tasty-Insipid and Textured-Smooth. These 9 descriptors were obtained from 15 interviews to olive oil tasters, trying to describe olive oil appearance in an appropriate way.

For each pair they had to choose one of the descriptors and after decide if that descriptor described the oil as “a little”, “moderately” or “very”. For example, oil can be described as: moderately aromatic, a little bitter, very rancid, moderately unhealthy, very dislike, very artificial, a little tasty and very textured. Each one of the samples was shown to each observer 3 times, in the same conditions as it was measured by the spectroradiometer, following a random order. Each person performed the test three times using different days and evaluating the same oils but in a different order of appearance (Table 2).

To perform the visual assessment, the oil sample was placed in a bottle and in a room without light. The bottle has been placed in controlled lighting cabin in front of the person who is going to carry out the assessment, which has been indicated to observe in the homogeneous region marked in the image shown in Figure 10.



Figure 10

Detail of the bottle used for the visual evaluation of the oils. The area that the respondent should look at is the one marked with the circle.

Table 2
Detail of the pairs of words and possibilities of evaluation of the same, in the tests of visual appreciation of the oils.

PARAMETERS					
BITTER			SWEET		
Appreciation			Appreciation		
A little	Moderately	A lot	A little	Moderately	A lot
1	2	3	1	2	3
AROMATIC			ODOURLESS		
Appreciation			Appreciation		
A little	Moderately	A lot	A little	Moderately	A lot
1	2	3	1	2	3
FRESH			RANCID		
Appreciation			Appreciation		
A little	Moderately	A lot	A little	Moderately	A lot
1	2	3	1	2	3
HEALTHY			UNHEALTHY		
Appreciation			Appreciation		
A little	Moderately	A lot	A little	Moderately	A lot
1	2	3	1	2	3
TASTY			INSÍPID		
Appreciation			Appreciation		
A little	Moderately	A lot	A little	Moderately	A lot
1	2	3	1	2	3
TEXTURED			SMOOTH		
Appreciation			Appreciation		
A little	Moderately	A lot	A little	Moderately	A lot
1	2	3	1	2	3
SPICY			NON SPICY		
Appreciation			Appreciation		
A little	Moderately	A lot	A little	Moderately	A lot
1	2	3	1	2	3
NATURAL			ARTIFICIAL		
Appreciation			Appreciation		
A little	Moderately	A lot	A little	Moderately	A lot
1	2	3	1	2	3
LIKE			DISLIKE		
Appreciation			Appreciation		
A little	Moderately	A lot	A little	Moderately	A lot
1	2	3	1	2	3

Torgerson's law of Categorical Judgement was applied to the mean of the answers of the observers. This law allow us to create psychophysical scales where each z score means the intensity in which a stimulus is perceived inside that emotional scale.



3.- RESULTS AND DISCUSSION

3.1.- Stability based on incident radiation: photo-stability

An important parameter to evaluate in virgin olive oils is the effect produced by exposure to electromagnetic radiation, which leads to their degradation. Photo-stability studies were carried out using five different olive oils: four “Picual” variety: “B”, “C”, “D” and “L”; and a fifth oil of variety “Arbequina” (oil “M”). Two different concentrations of lutein have been tested: 0.05 and 0.1 mg/ml. In all cases the measurements were performed at room temperature and the samples were subjected to continuous exposure to ultraviolet light in a controlled lighting booth. The use of ultraviolet light supposes to determine the photo stability in the less favorable conditions, since the set of radiations that come from the sun can affect the oils, this is the most energetic and therefore the most aggressive for the samples.

Thus, the value indicating the color variation (ΔE^*_{ab}) versus the time elapsed from the beginning to exposure to ultraviolet light has been represented.

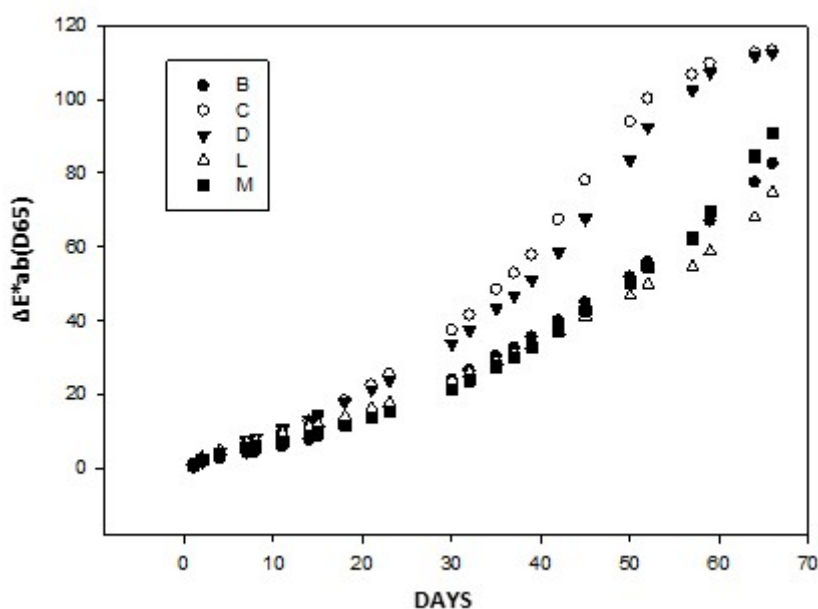


Figure 11

Variation of colorimetric parameters in EVOO's. These data correspond to control oils without enriching.

Figure 11 shows the evolution in the degradation of the different oils used in the control samples, that is, the oils without enriching in antioxidant extract. It can be seen that the sample that is most degraded by exposure to ultraviolet light is the one corresponding to oil "C", while the samples with the least degradation are the control samples corresponding to oils "L" and "M". By taking a reference value, after two months, oils "C" and "D", are the most degraded, generating a variation of color with respect to the initial (ΔE^*_{ab}) near 100 units (having become practically colorless). For the same period, oils "L" and "M" generate a color change value of no more than 60 CIELAB units.

Figures 12 and 13 show the color variation of lutein-enriched oils samples to a concentration of 0.05 and 0.1 mg/ml respectively. It can be seen that initially (first month) the oils withstand very well to the exposure to ultraviolet light and that is from the second month when they begin to degrade. If we compare concentrations of lutein, it is observed that when enriching up to 0.1 mg/ml, the samples are more stable and even after two months the degradation does not reach the 20 CIELAB units.

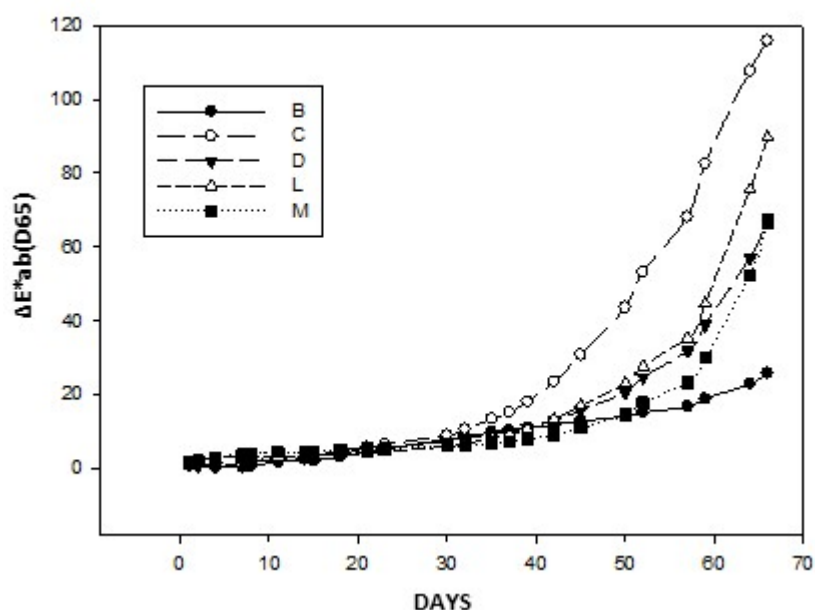


Figure 12

Variation of colorimetric parameters in EVOO's. These data correspond to oils enriched in lutein at 0.05 mg/ml.

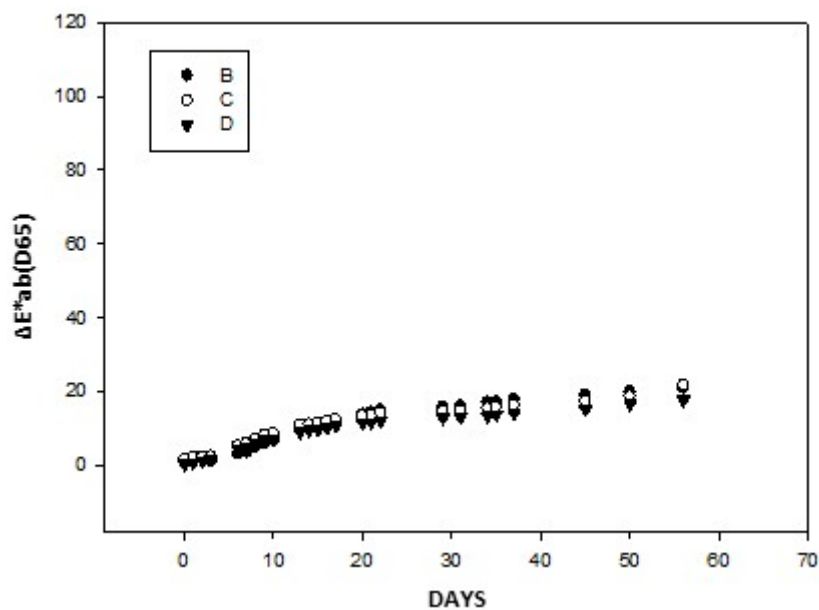


Figure 13

Variation of colorimetric parameters in EVOO's. These data correspond to oils enriched in lutein at 0.1 mg/ml.

As an example, Figures 14 and 15 show the photo-stability of the "B" and "C" oils enriched in lutein to 0.1 mg/ml. It can be clearly seen how oil "B", holds much better (both in the control sample and in the enriched sample) the exposure to ultraviolet light.

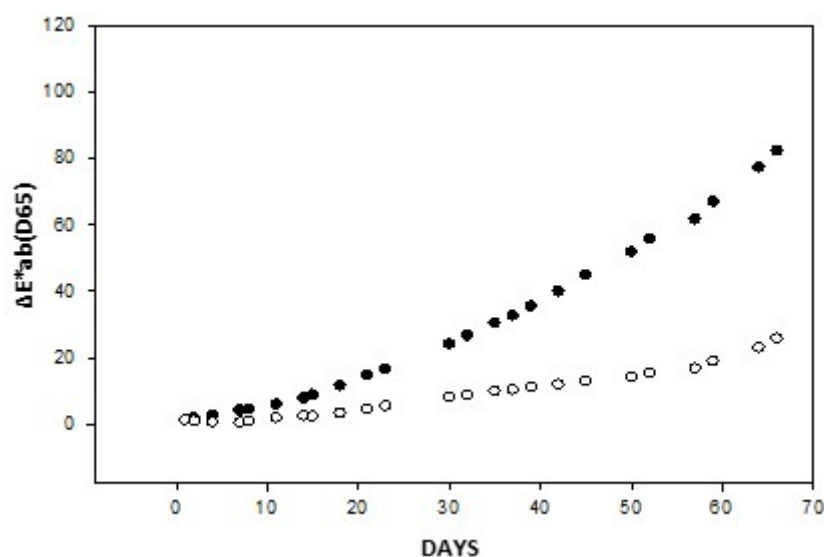


Figure 14

Photo-stability of virgin olive oil "B" under controlled lighting conditions with ultraviolet lamp enriched in lutein at 0.05 mg/ml.

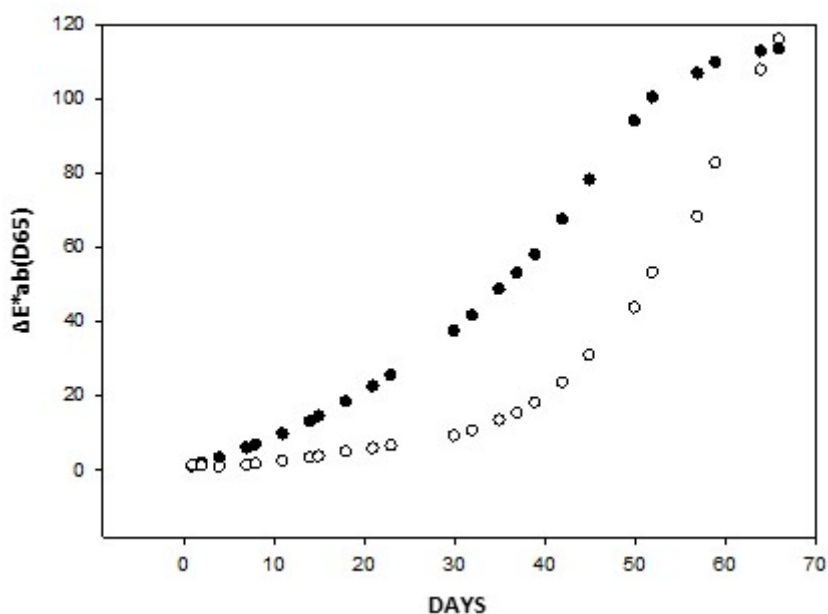


Figure 15

Photo-stability of virgin olive oil "C" under controlled lighting conditions with ultraviolet lamp enriched in lutein at 0.05 mg/ml.

In all cases tested, lutein-enriched oils are more stable and better withstand the degradation produced by exposure to ultraviolet radiation. Oils "C" and "D" degraded the most after 2 months of exposure, and both oils generate a color difference value ΔE^*_{ab} close to 100 units. However, in all cases, lutein-enriched oils up to a concentration of 0.1 mg/ml show color variations barely exceeding 15 units (we must remember that a value of 10 units indicates the human visual perception threshold of difference color). These results indicate that lutein-enriched oils are more protected than controls and therefore withstand the degradation caused by exposure to electromagnetic radiation much better.

3.2.- Stability as a function of temperature: thermostability

Another important property of virgin olive oils, which deserves to be studied, is their behaviour against temperature. It is well known that the temperature is another variable that produces degradation in the oils and for that reason the stability of the oils has been studied. Thus, a temperature of 120°C has been used and the oils have been analyzed at different times subjected to that temperature value. The same oils as in the previous photo stability section have been used and two different concentrations of lutein (0.05 and 0.1 mg/ml) have also been tested.

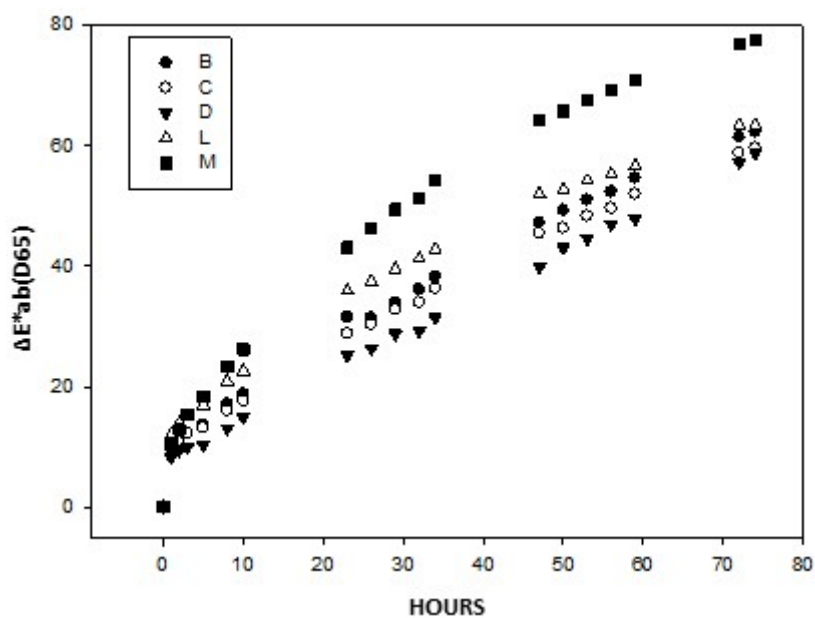


Figure 16

Variation of colorimetric parameters in EVOO's. These data correspond to the control oils without enriching.

Figure 16 shows the color variation of the different control oils and in it can be observed that oil "D" is the most stable, while the oil "M" is degraded.

Figures 17 and 18 show the color evolution for samples enriched in lutein and in it can be seen that there are no large differences between enrichments at 0.05 and 0.1 mg/ml respectively.

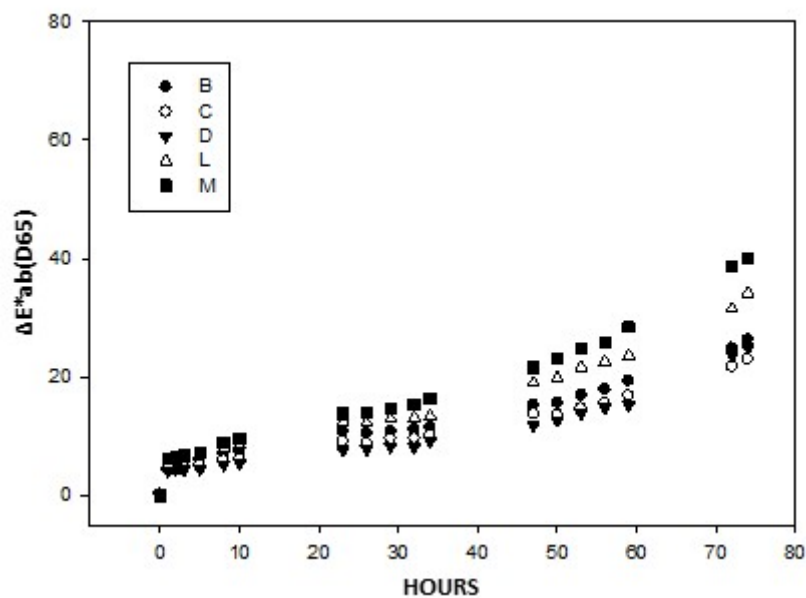


Figure 17

Variation of colorimetric parameters in EVOO's. These data correspond to oils enriched in lutein at 0.05 mg/ml.

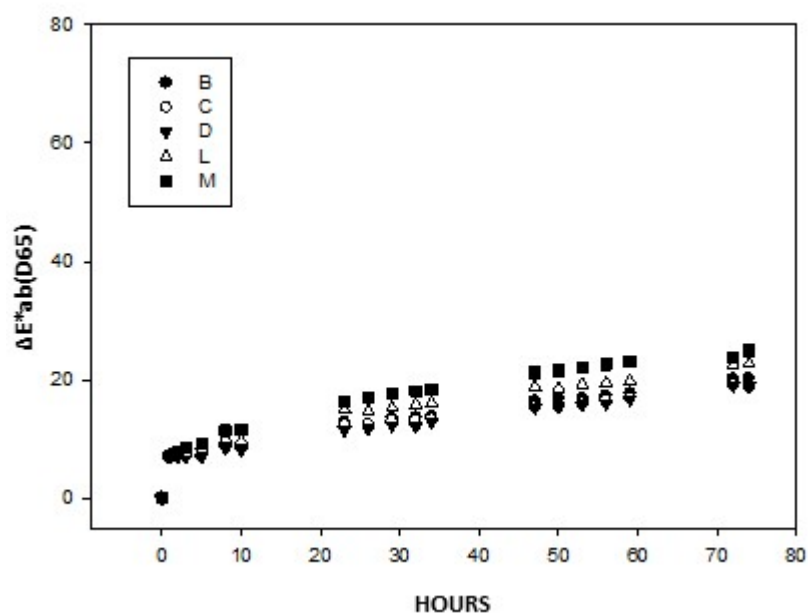


Figure 18

Variation of colorimetric parameters in EVOO's. These data correspond to oils enriched in lutein at 0.1 mg/ml.

If we look at the oil “L” as an example, Figures 19 and 20 show the effect of the two concentrations tested for the same type of oil. Although 0.1 mg/ml lutein is a concentration that protects a bit more, the color change value at 60 hours is very different from 18 to 23 units of CIELAB color variation when using 0.05 and 0.1 mg/ml respectively.

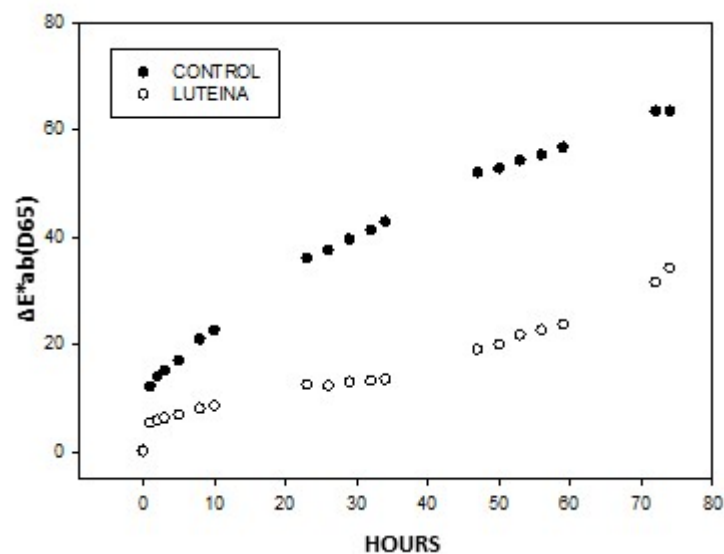


Figure 19

Variation of colorimetric parameters in extra virgin olive oil “L” enriched in lutein at 0.05 mg/ml.

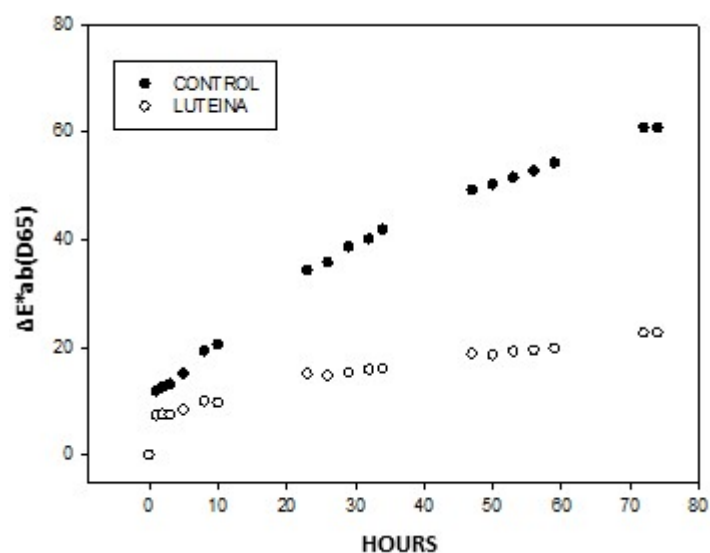


Figure 20

Variation of colorimetric parameters in extra virgin olive oil “L” enriched in lutein at 0.1 mg/ml.

The results show how the control oil is thermally degraded much faster than the same oil enriched in lutein. Thus, control oils after subjection to 120°C for 74 hours, generate color variation values between 55-75 units, while oils enriched under the same test conditions generate values of color variation between 18-40 units to 0.05 mg/ml and between 14-22 units to 0.1 mg/ml.

These results again prove the protective effect that lutein added to the oil has against exposure to high temperatures.

3.3.- Stability as a function of time: preferential consumption

Another desirable property in oils is the maintenance of their physicochemical properties as long as possible. It is well known that for oils harvested in a particular season, they are recommended to be consumed in the year after harvesting, because if this period is exceeded, the essential properties of the oils could be altered. In this sense, the stability of five different oils, without enriching and enriched in lutein at 0.05 mg/ml, has been studied, analyzing the effects over time. For this, the tests were performed at room temperature and under conditions of dark storage and dry environment. For example, Figure 21 shows the results obtained for virgin olive oil "L".

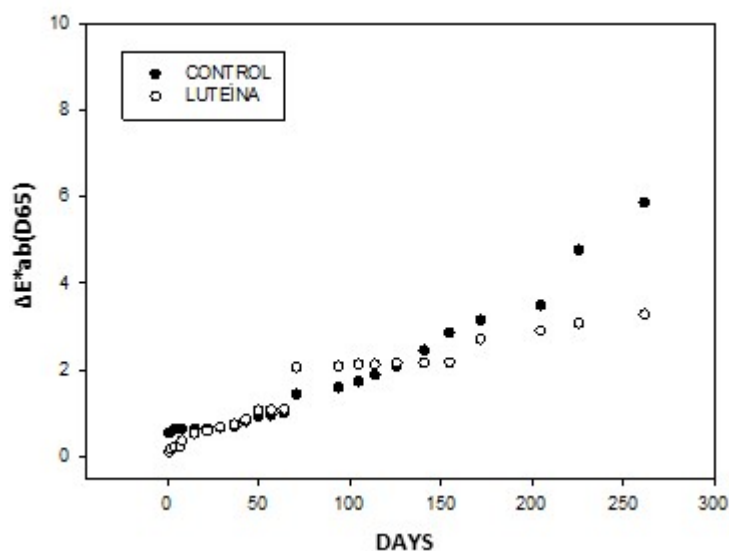


Figure 21

Temporal stability virgin olive oil "L" under dry storage conditions and in darkness at room temperature (20 °C).

This experience shows that for both, control and enriched samples, only color variations are observed. The values obtained for oils enriched in lutein always generate less units of color variation (ΔE^*_{ab}), which, again, shows the protector effect against the degradation in the samples with lutein. However, it is to be hoped that differences will appear when the time increases and the months elapsed since the elaboration begin to have importance.

3.4.- Specific stability studies

In this section of the work, attention has been paid to the influence that the enrichment of the new antioxidants can have on oils from different types of fruit and also for oils that come from the same variety of fruit but with different degree of maturity.

3.4.1.- Photo-stability according to the ripeness index of the fruit

In this experiment, we have tried to analyze the influence that enrichment can have on lutein, with oils that come from the same type of fruit and with exactly the same elaboration (manufacturing) process. But the difference has been the use of olives with different maturity index, that have been picked in different months, (months from October to December 2013). Figures 22 and 23 show the stability of three oil samples ("L" type), subjected to ultraviolet light in a lighting control booth, the difference being the month of fruit picking.

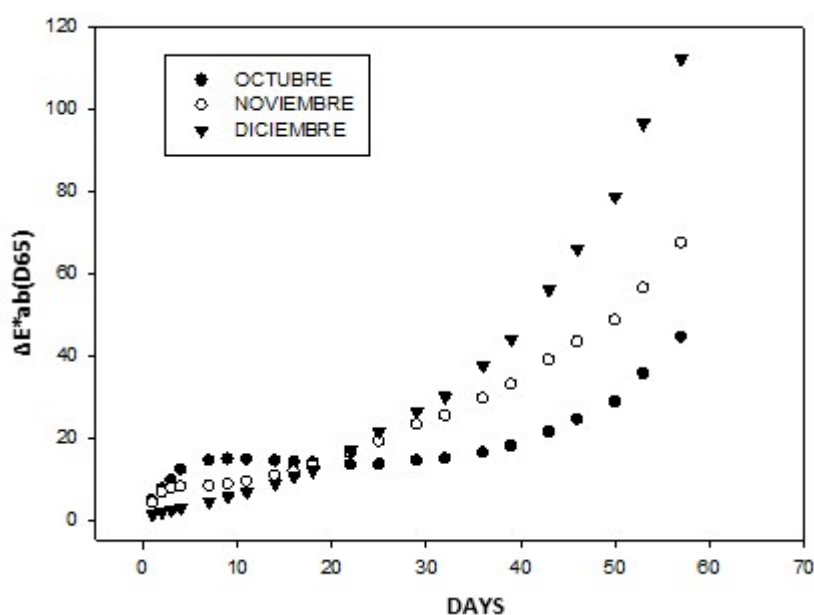


Figure 22

Photo-stability of virgin olive oil type "L" under conditions of ultraviolet illumination, coming from fruit with different degree of maturation.

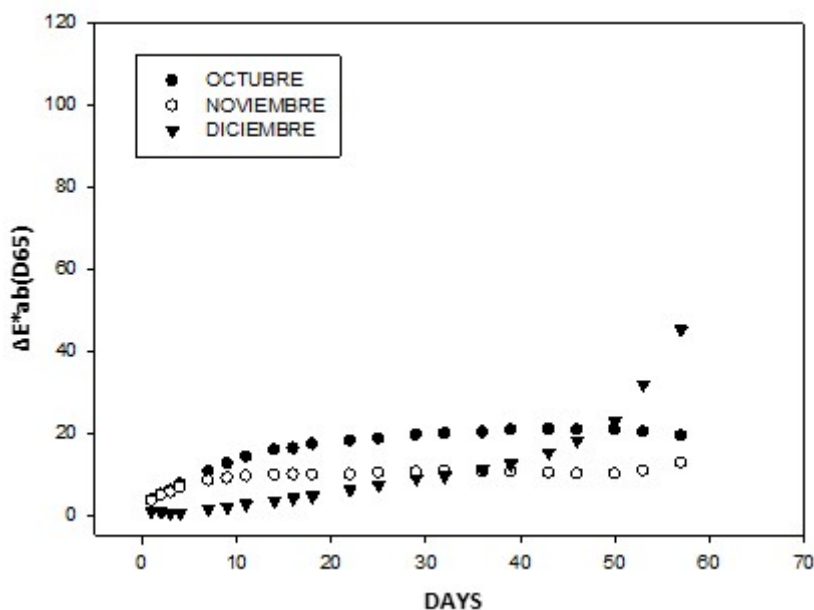


Figure 23

Photo-stability of virgin olive oil type "L" under conditions of ultraviolet illumination, from fruit with different degree of maturation and enriched in lutein at 0.05 mg/ml.

The results obtained through this experience show that the control oil less stable is the one corresponding to December and that the most stable oil corresponds to that elaborated in October. Observing the behaviour of oils enriched in lutein, it can be clearly deduced that they are much more stable than controls and that all stabilize in a similar way, maintaining colorimetric variations always lower than 20 CIELAB units after exposure to ultraviolet light for two months. Nevertheless, it seems that the enriched oil corresponding to the month of December begins to have an increase in the degradation from the first 50 days of test, compared to the other two oils used.

3.4.2.- Photo-stability depending on the variety of the fruit

Similarly, the influence of enrichment on lutein has been studied in the case of oils from different types of olives and in which the other processing variables have remained exactly the same. Thus, oils from four varieties of fruit have been used: "Picual", "Arbequina", "Frantoio" and "Royal".

Figures 24 and 25 show the stability of three "L" type oil samples, subjected to ultraviolet light in a lighting control booth, where the difference is in the fruit variety.

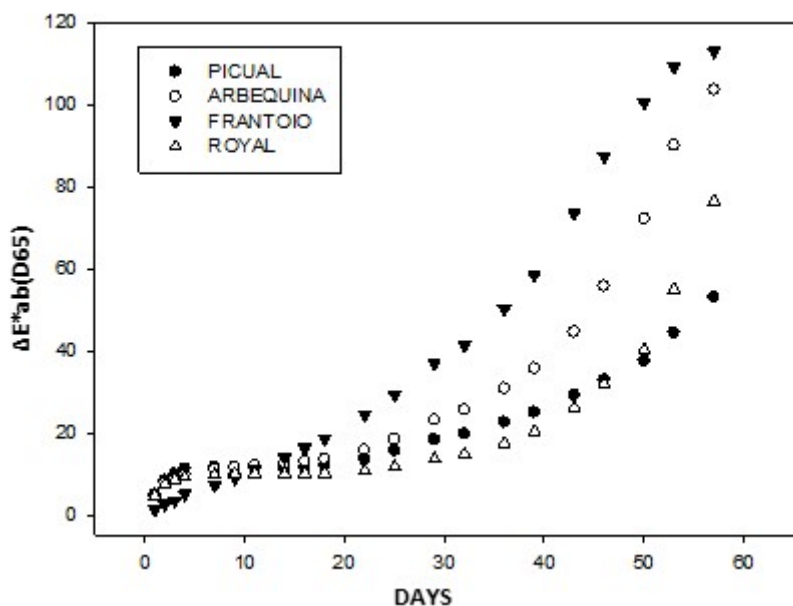


Figure 24

Photo-stability of oils (● L, ○ M, ▼ N and △P) under ultraviolet illumination conditions, from different fruits.

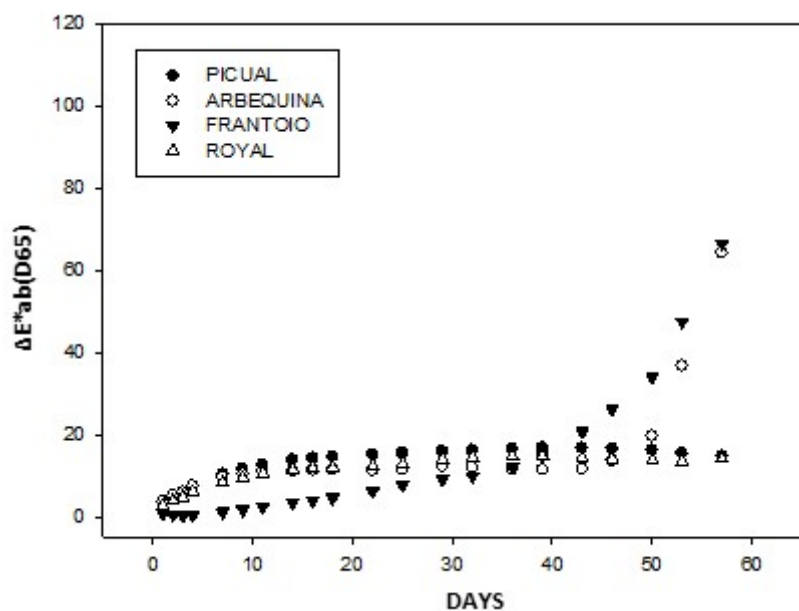


Figure 25

Photo-stability of oils (● L, ○ M, ▼ N and △P) under ultraviolet illumination conditions, from different fruits enriched in lutein at 0.05 mg/ml.

The graphs of stability of the control oils show that the “Frantoio” variety is the least stable of the tested ones and on the contrary, the most stable are “Picual” and “Royal”. The “Arbequina” variety shows an intermediate behaviour against exposure to ultraviolet light.

Figure 25 shows the performance of lutein-enriched oils up to 0.05 mg/ml, indicating a very appreciable increase in stability over the same control oils. Thus, the first 50 days show data indicating that they are very stable and only from this time on the varieties “Arbequina” and “Frantoio” initiate a slight increase in the degradation due to the action of light.

3.4.3.- Thermostability according to the ripeness index of the fruit

To carry out this study, it has been chosen an extra virgin olive oil of the Picual variety “L”. Three consignments of oil samples from the months of October, November and December have been enriched. The elaboration (manufacturing) process has been the same and therefore the only variable that makes oils different is the maturity index of the olive used for its elaboration.

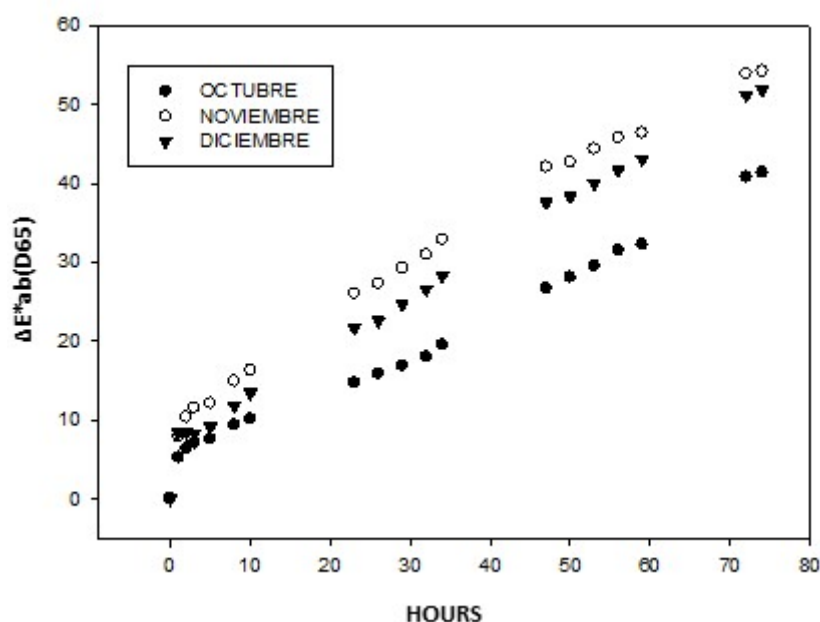


Figure 26

Variation of colorimetric parameters in Picual olive oil "L". These data correspond to control oils with different maturity indexes.

Figure 26 shows the evolution of the stability as a function of time elapsed for the control oils subjected to 120 °C in thermostatic bath. It can be seen that the most stable samples are oils from olive harvested in October and therefore with a lower maturity index. After 3 days of exposure to the temperature of 120 °C this October oil generates a color variation of 40 CIELAB units compared to the 53 and 55 units generated by the oils of December and November respectively.

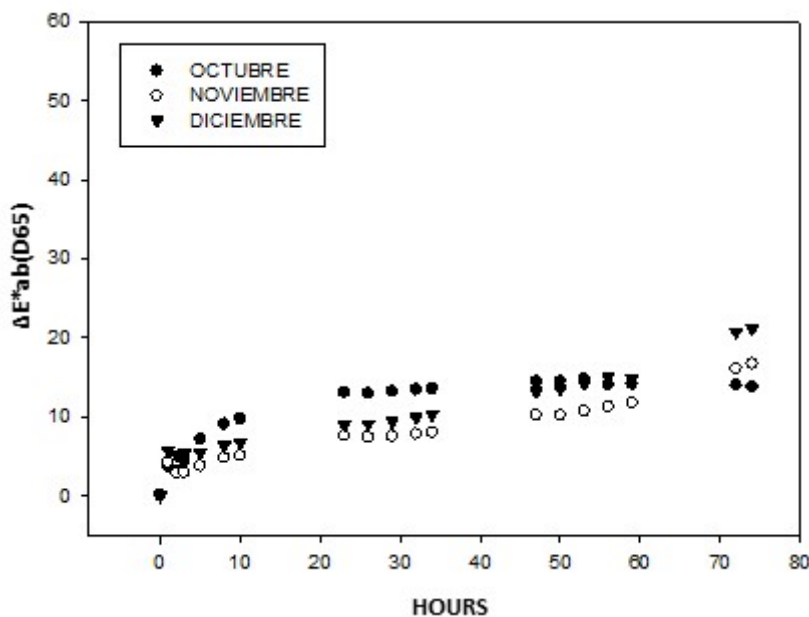


Figure 27

Variation of colorimetric parameters in extra virgin olive oil "L". These data correspond to oil enriched in lutein at 0.05 mg/ml.

Figure 27 shows the stability of the same oils enriched in lutein to 0.05 mg/ml. It can be seen that after 72 hours of thermal exposure, the values indicating the colorimetric variation are between 10 and 20 units, much lower values than the control oils. From these results it can be clearly deduced that antioxidant enriched oils are much more stable to the effect of temperature than unenriched oils and that the stability is very in spite of being the harvest month different. Therefore the index of maturity is also different.

3.4.4.- Thermostability depending on the variety of the fruit

As in the previous tests, a bath temperature of 120 °C has been used and the oils have been measured at different times from the moment they were put in the bath. In this case, the oils used have been “L”, “M”, “N” and “P”, all of the same denomination, elaborated following the same process and with the same treatment variables. The difference between them is the type of fruit used to make the oil: L: Picual; M: Arbequina; N: Frantoio and P: Royal.

Figures 28 and 29 show stability data as a function of temperature and elapsed time for control oils and those enriched with lutein to 0.05 mg/ml. Observing Figure 28 it can be seen that the oil less stable is N (variety “Frantoio”), while the other three varieties have a very similar stability. Similarly, Figure 29 shows that the enriched oils are more stable than the controls ones, although the “N” variety remains the least stable among all the enriched in lutein.

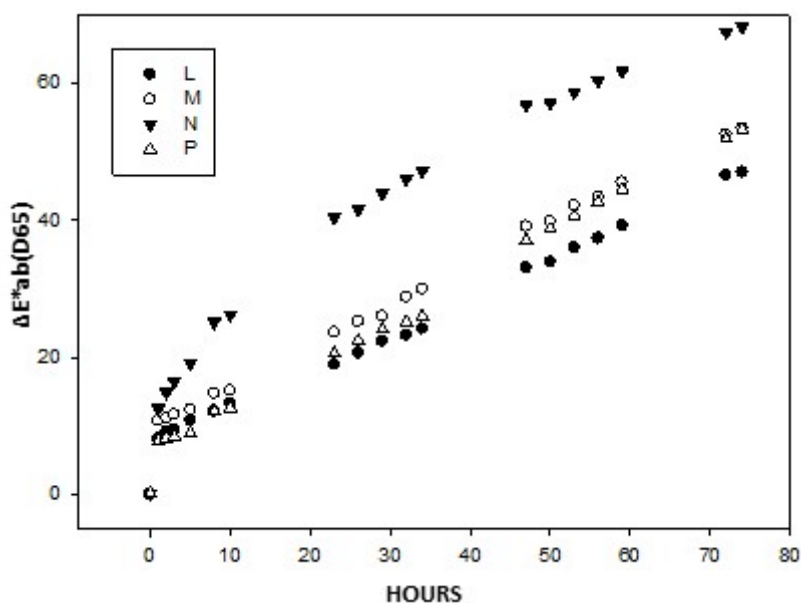


Figure 28

Variation of colorimetric parameters in EVOO's. These data correspond to control oils without enriching.

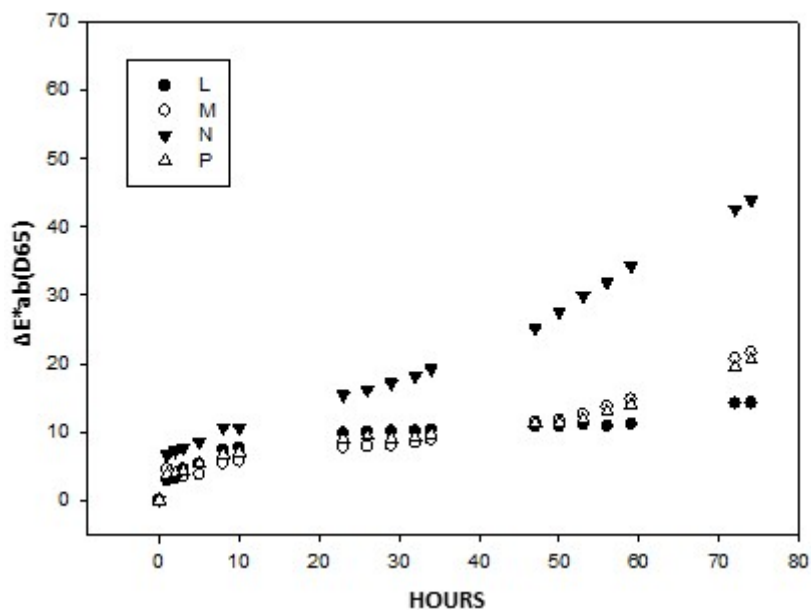


Figure 29

Variation of colorimetric parameters in EVOO's. These data correspond to enriched oils in lutein at 0.05 mg/ml.

It is important to point out that the other three varieties "L", "M" and "P" are very stable in comparison with the control oils, generating values of ΔE^*_{ab} four times inferior to those obtained by them. We can therefore say that the enrichment in lutein produces a very remarkable increase of stability irrespective of the variety of the fruit used in the elaboration of the oil.

3.5.- Studies of chemical quality parameters

The quality of the olive oils was assessed to verify if the addition of *S. almeriensis* extracts cause quality changes. The global observations clearly highlight that no quality degradation is undertaken by extract addition (Table 3). Regarding FA values in four of the five olive oils studied, no significant changes were observed. In one olive oil (olive oil "C"), extract addition reduces the levels of free fatty acids in them, but without significant changes between olive oils with extract. Such results are positive, since the addition of extracts doesn't trigger hydrolytic reactions in the olive oils, maintaining the levels of free fatty acids.

The possible occurrence of oxidative processes in the EVOO's was monitored by several quality parameters (PV, K_{232} , K_{270} , ΔK , and p -AV) reported in Table 3. The peroxidation of the EVOO's is reduced by *S. almeriensis* extracts, since in all olive oils,

except olive oil “F”, a significant decrease in PV was observed. Therefore the formation of primary oxidation products (mainly hydroperoxides) (Laguerre et al., 2007) is inhibited, acting the *S. almeriensis* extracts as antioxidants. Specific extinction coefficients at 232 and 270 nm (K_{232} and K_{270} respectively) also corroborate that extracts addition doesn't affect olive oils quality. In K_{232} and ΔK no significant changes were observed in the olive oils, however the addition of extracts to olive oil increase significantly K_{270} values. K_{270} is indicative of the formation of secondary products of oxidation, meanwhile, by evaluating the values obtained in *p*-AV, we clearly conclude that the addition of extracts doesn't inflict secondary oxidation in olive oils, and those results obtained in K_{270} could be related to the color conferred to olive oils by the extracts.

According to Malheiro et al., (2011) *p*-AV is an empirical determination used to assess advanced oxidative rancidity of vegetable oils. The analytical method is based on the reactivity of the aldehyde carbonyl bond on the *p*-anisidine amine groups, leading to the formation of Schiff base that absorbs at 350 nm. It allows the estimation of secondary products of oxidation of unsaturated fatty acids, mainly dienals and 2-alkenals (Labrinea et al., 2001). Therefore, by studying the data obtained in quality parameters (Table 3) of the EVOO's, it is clear that extracts addition inflicts neither primary (PV and K_{232}) nor secondary (*p*-AV) oxidative reactions.

Regarding all the values obtained in the quality parameters of the olive oils with and without *S. almeriensis* extracts, all oils could be classified as EVOO's according to the European Community legislation (Commission Implementing Regulation (EU), n° 299/2013).

Table 3
Quality parameters of oils: (FA, PV, ΔK , (ρ -AV), without enrichment (I) and enriched (II = 0.1 mg/ml, III=0.21 mg/ml).

EVOO's	FA (%)	PV (mEq. O ₂ /kg)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	ΔK	ρ -AV
A						
I	0.19±0.00	9±0	0.82±0.05	0.13±0.01	-0.003±0.001	15±1
II	0.19±0.00	6±1	0.84±0.04	0.15±0.02	-0.004±0.002	16±1
III	0.20±0.00	6±1	0.81±0.05	0.16±0.01	-0.002±0.001	16±1
B						
I	0.30±0.04	9±1	0.86±0.15	0.15±0.02	-0.003±0.002	17±1
II	0.31±0.05	6±1	0.83±0.09	0.15±0.01	-0.003±0.001	16±0
III	0.30±0.04	7±2	0.94±0.12	0.19±0.03	-0.001±0.002	16±1
C						
I	0.28±0.00	9±1	0.94±0.17	0.13±0.02	-0.002±0.005	12±0
II	0.19±0.00	6±1	0.86±0.18	0.12±0.01	-0.005±0.002	13±1
III	0.19±0.00	6±0	1.17±0.55	0.16±0.01	-0.003±0.004	13±1
D						
I	0.28±0.00	8±1	1.00±0.07	0.13±0.02	-0.003±0.001	14±1
II	0.24±0.05	5±1	0.93±0.08	0.13±0.02	-0.009±0.017	14±1
III	0.28±0.00	5±1	1.01±0.03	0.16±0.01	-0.002±0.002	14±1
F						
I	0.28±0.00	9±0	0.84±0.07	0.18±0.02	-0.001±0.003	13±1
II	0.28±0.00	8±0	0.88±0.03	0.21±0.02	-0.007±0.008	14±1
III	0.28±0.00	8±1	0.92±0.04	0.24±0.03	-0.003±0.002	13±1

According to the whole data obtained in the studied EVOO's, it is clear that the main changes inflicted are related to carotenoids concentration of the extracts, namely β -carotene and lutein, as expected. Carotenoids are important components of several biological processes in the human organism, having repercussions in human health (Granado et al., 2003).

3.6.- Studies of visual appreciation of oils. Color Emotion Studies

Figure 30 shows results corresponding to color measurements. In figure 30 we can see that adding lutein and β -carotene produced a decrease of lightness L^* and b^* coordinates and an increase of a^* coordinate. In Table 4 we have summarized color change of the oils from pure extra-virgin olive oil to oils with the 2 concentrations of microalgae extract. Second and third columns in Table 4 indicate a high color change, clearly perceptible by human observers with normal color vision. Last column indicates that the color change is mainly due to a hue change. Combining data from Figure 30 and Table 4 we can conclude that enriching the oils with lutein and β -carotene extract makes the oils become more reddish and darker. All the oils except “Melgarejo” (the greenest oil) undergo a color change from yellow to yellowish-orange hues.

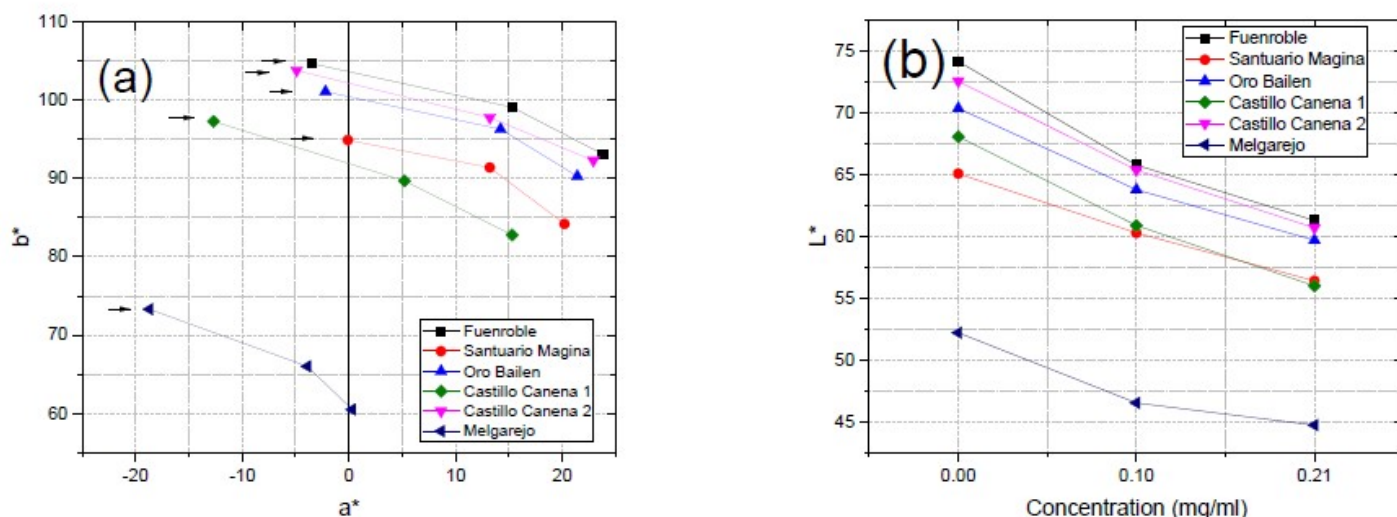


Figure 30

Color coordinates of the samples changing the concentration of microalgae extract. (a) Plane a^*b^* (black arrow indicates direction of color change when extract concentration is increased). (b) Lightness dependence with concentration.

Table 4

Mean color change from pure extra-virgin olive oils in CIELAB and CIEDE2000 units. Three last columns show percentage of change in Lightness, Chroma and Hue in CIELAB units.

Change	ΔE_{00}	ΔE_{ab}	% ΔL^*	% ΔC^*_{ab}	% ΔH^*_{ab}
From 0.00 mg/ml to 0.05 mg/ml	10.5	18.8	12.4	10.7	76.9
From 0.00 mg/ml to 0.1 mg/ml	16.4	29.2	13.2	15.3	71.6

Results from visual experiment are summarized in Table 5. In this table we have correlation coefficients between z scores of different emotions. We can see that there are a high correlation between Fresh-Rancid, Healthy-Unhealthy, Like-Dislike, Natural-Artificial and Tasty-Insipid. That means that when oil is perceived as Fresh it is perceived also as Healthy, Natural and it is liked. This result agrees with the meaning of these descriptors, all of them are related with preferences and can be interpreted as like-dislike. The remaining emotions are descriptors that are related to taste and smell but for observers who are not olive oils experts they do not give a value of preference to the oil.

Table 5

Correlation coefficient (r^2) of z scores obtained from color emotion experiment. Yellow cells show correlation coefficients greater than 0.8.

	Aromatic							
	Odourless							
Bitter	0.02	Bitter						
Sweet		Sweet						
Fresh	0.68	0.06	Fresh					
Rancid			Rancid					
Healthy	0.73	0.05	0.98	Healthy				
Unhealthy				Unhealthy				
Like	0.71	0.04	0.96	0.98	Like			
Dislike					Dislike			
Natural	0.73	0.03	0.98	0.99	0.98	Natural		
Artificial						Artificial		
Spicy	0.00	0.66	0.19	0.19	0.16	0.16	Spicy	
Non spicy							Non spicy	
Tasty	0.87	0.00	0.83	0.87	0.86	0.86	0.05	Tasty
Insipid								Insipid
Textured	0.05	0.43	0.43	0.40	0.39	0.39	0.78	0.19
Smooth								



Emotional responses corresponding to the pair of emotions Like-Dislike are plotted in Figure 31, in left axis we can check the z-score and in right axis we can see the linguistic meaning of the z-scores. The oils are perceived as less liked when the concentration of microalgae additive increases for most of the samples, and this trend is very similar for the emotions well correlated with Like-Dislike. If we add an additive that makes the oil more reddish, the olive oil is perceived as less natural and it is not like. There is only one exception, the oil “Melgarejo” follows an opposite trend to the other samples: when the concentration of lutein and β -carotene increases, the emotion “Like” increases. The explanation to this behaviour can be explained with color measurements (Figure 30). This sample is the only one in which its color turns from greenish to yellow. The rest of the samples turns into a reddish color.

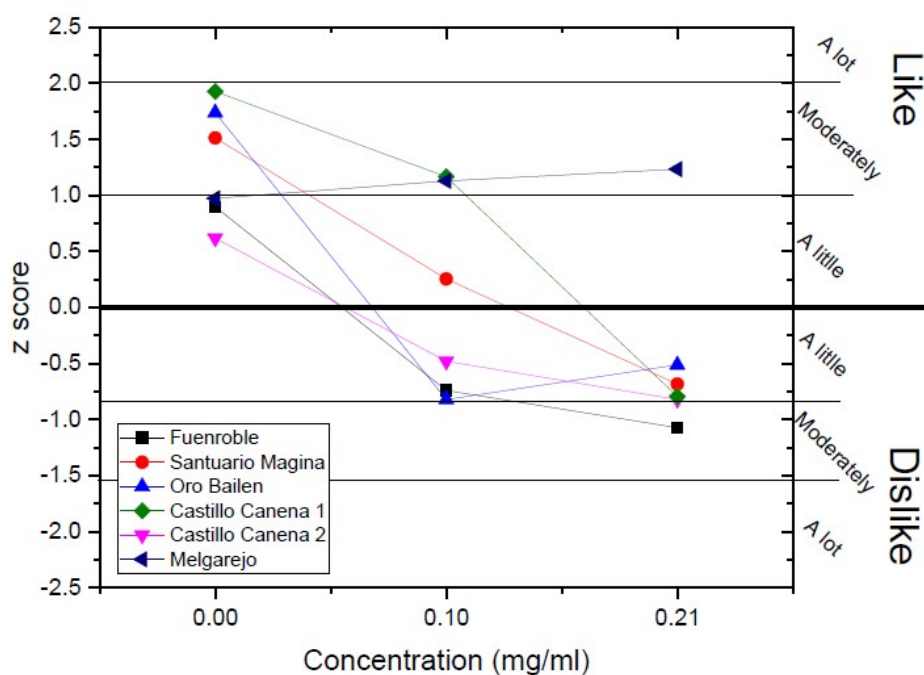


Figure 31

Emotional responses for each sample in scale “Like-Dislike”. Right axis and horizontal lines shows the linguistic term associated to each z score.

4.- CONCLUSIONS

In the present work an original methodology for the extraction of lutein from the microalgae *Scenedesmus almeriensis* has been developed. In addition, olive oil has been studied as a suitable means of incorporation to ingest the necessary amounts and to prevent the occurrence of certain degenerative human diseases, which have to do with the deficit in our organism of this antioxidant.

It has been possible to solubilize adequate amounts of antioxidant extract in the different EVOO's tested and the physical-chemical parameters of them which have been studied, paying special attention to the color changes produced by the addition of the antioxidant as a monitoring and study variable. It has proceeded to add extract of antioxidants to different EVOO's, studying how the colorimetric parameters vary as the concentration of lutein increases. In this sense, a lutein extract with a concentration of 2.3 mg/ml has been used, and successive additions of 100 μ l have been made up in oil concentrations of 0.16 mg/ml (174.3 mg lutein/kg oil), i.e. lutein concentrations between 22 and 87 times higher than those of olive oils not enriched in lutein (2-8 mg lutein/kg oil).

The addition of the antioxidant extract from *Scenedesmus almeriensis* microalgae carries significant changes in the color, quality, composition and stability of EVOO's.

The addition of extracts confers to the EVOO's more yellow-orange color, due to the concentration of the pigments, mainly to the β -carotene.

The results obtained show that enriching the oils to a concentration of 0.1 mg lutein/ml, obtain oils with very acceptable physicochemical and colorimetric properties. This allows the incorporation of a good part of the daily intake of lutein (6 mg) when taking into account the estimated average consumption of olive oil per inhabitant per day for our country is 36 ml. In this way, it is intended to provide the EVOO's with an added value superior to what it already has and offers a different alternative to the current ones, in the fight against some human degenerative diseases.

The addition of *S. almeriensis* extract leads to significant changes in the color, quality, composition and stability of EVOO's. The addition of extracts gives EVOO's a more yellow-orange color due to the concentration of pigments, mainly β -carotene. Oxidative stability has been greatly improved by the addition of the *S. almeriensis* extract



and the shelf life of the oils has also been improved, protecting them against oxidizing agents. The peroxidation of EVOO's is reduced as well as the formation of oxidation products, so an improvement in the quality of these EVOO's is produced. The fatty acid profile is not affected by the addition of extract, as well as the content of tocopherols. In general, the addition of antioxidant extract is beneficial in discriminating the different olive oils according to the amount of extract added. From all the results obtained, it is concluded that the addition of 0.21 mg/ml does not contribute decisively to the quality and composition of EVOO's compared to 0.1 mg/ml. Therefore, the concentration of 0.1 mg/ml of *S. almeriensis* extract would be an optimum concentration, since all the properties and characteristics of the original EVOO's are conserved, while providing important doses of bioactive compounds and one greater stability to oxidation.

The possible introduction of this type of antioxidant in olive oil would increase the daily intake of essential carotenoids in the diet, with improved properties for the health of consumers as it confers important nutritional assets. In addition, several tests have been carried out in this thesis to evaluate the stability of these types of EVOO's during storage, and stability has been studied as a function of three main variables of degradation: time, temperature and exposure to the light.

After analysis of three of the fundamental points that relate to the physicochemical degradation of an EVOO (stability against ultraviolet radiation, stability against temperature and stability against time), as well as the stability of EVOO's obtained with olives of different ripeness index and varieties, it is concluded that the addition of the antioxidant extract from the alga *Scenedesmus almeriensis* to oily matrices produces a significant improvement in its stability. That is, the stability of EVOO's enriched with antioxidant extracts are better than that of the original matrix without additive. After analysing the stability of EVOO's enriched with antioxidant extract against temperature, results are obtained that could be very beneficial, multiplying the useful life of EVOO's in some cases. In addition, one of the most suitable matrices to add extract to is the EVOO of the "Picual" variety, while the one of the variety "Frantoio" has shown a greater degradation. Although it increases the useful life of the oil control against the temperature, its degradation continues being superior in relation to other EVOO's.

The results obtained are very positive, since the addition of the antioxidant extract to the EVOO's would increase the useful life of the same ones, besides incorporating to our diet a great amount of antioxidants beneficial for our health (which allows the

prevention of the AMD, among other things) without having to alter our consumption habits. This is because they would be incorporated in the EVOO itself, both for consumption in crude oil (prolonging the shelf life of an EVOO so that it does not degrade), and for its use in kitchen.

Taking into account all pairs of emotions studied, the group of accustomed individuals has higher correlations than that of unaccustomed ones.

With regard to the pair of emotions "Aromatic-Odourless" and "Tasteless-Tasty", there is no significant variation in the opinions of both groups when adding the antioxidant, i.e. the trend in the two groups studied is similar.

It should also be noted that the pairs of "Rancid-Fresh", "Healthy-Unhealthy" and "Like-Do not like" tend to be perceived in the same way in the group of habitual observers. It is striking that observers enjoy what is considered less healthy.

The pair "Artificial-Natural" is also related to the "Like-Do not like", that is, the population seems to associate something natural with something beneficial, and therefore, like the consumers.

Color measurements show that adding lutein and β -carotene enriched extract from microalga *Scenedesmus almeriensis* to extra virgin olive oils produces a change in color of the oils. That makes them decrease slightly in their chroma and lightness, and produces a high decrease from greenish or yellow to reddish. The obtained color differences are far from a just-noticeable color difference, the change in color being clearly perceptible by human eye.

From the studied descriptors by a color-emotion experiment some of them are highly correlated. The meaning of these emotions can be related to the terms Like-Dislike. From the 6 studied oils there is only one that is liked more when we add extract from microalgae, because it changes from green to yellow.

Finally, highlighted in the case of the oil "Melgarejo", in which for most pairs of emotions, the trend is different from the rest of oils evaluated. As the antioxidant is added, it is perceived as fresher, healthier, more natural and granter liked by the group of people accustomed.

5.- REFERENCES

A

- Achir, N., Randrianatoandro, V.A., Bohuon, P., Laffargue, A. y Avallone, S. (2010). Kinetic study of β -carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 349-361.
- Ación, F.G, González-López, C.V., Fernández-Sevilla, J.M. y Molina, E. (2012). Conversion of CO₂ into biomass by microalgae: How realistic a contribution may it be to significant CO₂ removal? (Review). *Appl Microbiol Biotechnol*, 96, 577-586.
- Aparicio-Ruiz, R., Mínguez-Mosquera, M.I., Gandul-Rojas, B. (2011). Thermal degradation kinetics of lutein, β -carotene and β -cryptoxanthin. *Journal of food Composition and analysis*, 24 (6), 811-820.

C

- Camacho, F.G., Rodríguez, J.G., Mirón, A.S., García, M.C., Belarbi, E.H., Chisti, Y., et al. (2007). Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnology Advances*, 25, 176-194.
- Cerón, M.C., Campos, I., Sánchez, J.F., Ación, F.G., Molina, E. y Fernández-Sevilla, J.M. (2008). Recovery of lutein from microalgae biomass: Development of a process for *Scenedesmus almeriensis* biomass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 11761-11766.
- Commission Implementing Regulation (EU), nº 299/2013: amending Regulation (EEC) nº 2568/91 from 11th July on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. Official Journal of the European Union.

E

- European Patent. (2006). Composition comprising olive oil enriched and supplemented with lutein, WO 2006117826 (A2). Application number: WO2006IT00304 20060502.

G

- Granado, F., Olmedilla, B., y Blanco, I. (2003). Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *British Journal of Nutrition*, 90, 487-502.
- Granado, F., Herrero-Barbudo, C., Ación-Fernández, G., Molina-Grima, E., Fernández-Sevilla, J. M., Pérez-Sacristán, B., et al. (2009). In vitro bioaccessibility of lutein and zeaxanthin from the microalgae *Scenedesmus almeriensis*. *Food Chemistry*, 114, 747-752.



-
- Granado, F., López-López, I., Herrero-Barbudo, C., Blanco-Navarro, I., Cofrades, S., Pérez-Sacristán, B. y Delgado-Pando, G. (2010). Lutein-enriched frahkfurter-type products: physicochemical characteristics and lutein in vitro bioaccessibility, *Food Chemistry*, 120, 741-748.
 - Gómez-Robledo, L., Limón, P., Bermejo, R. y Melgosa, M. (2015). Colour Emotions for Antioxidant-Enriched Virgin Olive Oils. *Color Science Association of Japan (CSAJ)*. AIC2015 TOKYO.

I

- ISO 6885. (2006). Animal and vegetable fats and oils - Determination of Anisidine Value.

J

- Johnson-Down, L., Saudny, H. y Gray-Donald, K. (2002). Food habits of Canadians: Lutein and lycopene Intake in the Canadian Population. *Journal of the American Dietetic Association*, 102(7), 988-991.

K

- Krinsky, N.I., Landrum, J.T. y Bone, R.A. (2003). Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Ann. Rev. Nutr.*, 23, 171-201.

L

- Labrinea, E.P., Thomaidis, N.S. y Georgiou, C.A. (2001). Direct olive oil anisidine value determination by flow injection. *Analytica Chimica Acta*, 448, 201-206.
- Laguerre, M., Lecomte, J. y Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, 46, 244-282.

M

- Malheiro, R., Casal, S., Ramalhosa, E. y Pereira, J.A. (2011). Microwave heating: a time saving technology or a way to induce vegetable oils oxidation?. In: S. Grundas (Ed.), *Advances in Induction and Microwave Heating of Mineral and Organic Materials*, Rijeka: Croatia. 597-614.
- Malheiro, R., Rodrigues, N., Manzke, G., Bento, A., Pereira, J. A. y Casal, S. (2013). The use of olive leaves and tea extracts as effective antioxidants against the oxidation of soybean oil under microwave heating. *Industrial Crops and Products*, 44, 37-43.



- Morita, M., Watanabe, Y. y Saiki, H. (2002). Photosynthetic productivity of conical helical tubular photobioreactor incorporating *Chlorella sorokiniana* under field conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 77, 155-162.

N

- Nidhi, B. y Baskaran, V. (2011). Influence of vegetable oils on micellization of lutein in a simulated digestion model. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 88, 367-372.

O

- Ou, L.C. (2004). Quantification of Color Emotion and Color Harmony. Leeds, UK. University of Leeds.

R

- Rangaswamy, L., Raju, M., Parthasarathy, T. y Baskaran, V. (2007). Lutein Zeaxantin in leafy and their bioavailability: olive oil influences the absorption of dietary lutein and its accumulation in adult rats. *J. Agri. Food. Chem.*, 55, 6395-6400.

S

- Sato, T., Kajiwara, K., Hoshino, H. y Nakamura, T. (2000). Quantitative evaluation and categorizing of human emotion induced bet alour. *Adv Colour Sci Technol.*, 3, 53-59.
- Silva, S. (2004). Luteína, alimento para tu vista. *Food Ingredients*, 80-81.

T

- Teikari, J.M., Laatikainen, L., Virtamo, J., Haukka, J., Rautalahti, M., Liesto, K., et al. (1998). Six-year supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene and age-related maculopathy. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, 76, 224-229.

W

- Wei, S.T., Ou, L.C., Luo, M.R., and J.B. Hutchings. (2014). Package design: Color harmony and consumer expectations. *International Journal of Design* 8 (1), 109-26.

Z

- Zellner, D.A., and Durlach, P. (2003). Effect of color on expected and experienced refreshment, intensity, and liking of beverages. *American Journal of Psychology* 116 (4), 633-47.





11. PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES

11.- PUBLICACIONES Y COMUNICACIONES

PUBLICACIONES

AUTORES: P. M. Limón; R. Gavara; F. Pina.

TÍTULO: Thermodynamics and Kinetics of Cyanidin 3-Glucoside and Caffeine Copigments.

REF. REVISTA: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61 (22); 5245–5251 (2013)

AUTORES: P. Limón, R. Malheiro, F.G. Acién, J.M. Fernández, S. Casal., N. Rodrigues, R.Cruz, R. Bermejo and J. A. Pereira.

TÍTULO: Improvement of stability and carotenoids fraction of virgin olive oils by addition of microalgae *Scenedesmus almeriensis* extracts.

REF. REVISTA: Food Chemistry 174; 203-211(2015).

CAPÍTULOS DE LIBRO

AUTORES: Ruperto Bermejo, Piedad Limón, José M. Fernández y F. Gabriel Acién.

TÍTULO: Aceites de oliva virgen enriquecidos en nuevos antioxidantes procedentes de microalgas para la prevención de enfermedades degenerativas.

REF. LIBRO: (Eds. Castillo de Canena Olive Juice S.L.) Gráficas La Paz, Jaén-Spain (2014)

ISBN: 978-84-617-2115-3.



COMUNICACIONES EN CONGRESOS

Autores: R. Gavara, A. M. Diniz, Y. Leydet, J. C. Lima, P. M. Limón, A. J. Parola, V. Petrov, A. Quintas, F. Pina.

Título: Studies of self-aggregation and co-pigmentation involving anthocyanidin 3-glucosides.

Tipo de participación: Comunicación (Póster)

Congreso: Conference: European Winter School on Physical Organic Chemistry (e-WISPOC)

Lugar celebración: Bressanone (Italy)

Fecha: 2013

Autores: R. Bermejo, P. Limón, F. Gabriel Acién, J.M. Fernández- Sevilla y M. Melgosa.

Título: Aceites de oliva virgen enriquecidos con nuevos antioxidantes procedentes de microalgas para prevención de enfermedades degenerativas.

Tipo de participación: Comunicación (Oral)

Congreso: XVI Scientific-Technical Symposium of olive oil (Expoliva 2013).

Lugar celebración: Jaén

Fecha: 2013

Autores: R. Bermejo, P. Limón, F. Gabriel Acién, J.M. Fernández- Sevilla y M. Melgosa.

Título: Measuring color in virgin olive oils enriched with lutein from microalgae.

Tipo de participación: Comunicación (Oral)

Congreso: X Congreso Nacional del Color.

Lugar celebración: Valencia

Fecha: 2013



Autores: R. Bermejo, P. Limón, F. Gabriel Acién, J.M. Fernández- Sevilla y M. Melgosa.

Título: Using B-phycoerythrin from microalgae as a natural colorant to reproduce the color in commercial strawberry yogurts.

Tipo de participación: Comunicación (Póster)

Congreso: 12th International AIC Congress 2013 (Congreso Internacional de la Asociación Internacional del Color, AIC 2013).

Lugar celebración: Newcastle (England)

Fecha: 2013

Autores: R. Bermejo, P. Limón, A. Navarro, A. Ortiz, M.P. Fernández, F. Gabriel Acién, J.M. Fernández y M. Melgosa.

Título: Stability assesment of virgin olive oils enriched with new antioxidants using spectrophotometric color monitorization.

Tipo de participación: Comunicación (Póster)

Congreso: XXIV Reunión Nacional de Espectroscopía. VII Congreso Ibérico de Espectroscopía

Lugar celebración: Logroño-LaRioja (Spain)

Fecha: 2014

Autores: R. Bermejo, P. Limón, R. Malheiro, J.A. Pereira, M. Melgosa y F. Gabriel Acién.

Título: Mejora de la estabilidad y de la fracción antioxidante de aceites de oliva virgen extra mediante la adición de extractos de carotenoides procedentes de microalgas.

Tipo de participación: Comunicación (Póster). **ISBN:** 978-84-938900-5-6.

Congreso: XVII Scientific-Technical Symposium of olive oil (Expoliva 2015).

Lugar celebración: Jaén

Fecha: 2015



Autores: L. Gómez-Robledo, P. Limón, R. Bermejo y M. Melgosa.

Título: Colour emotions for antioxidant-enriched virgin olive oils

Tipo de participación: Comunicación (Oral)

Congreso: AIC2015 TOKYO Color and Image Congress (Midterm Meeting of the International Colour Association).

Lugar celebración: Tokyo (Japón)

Fecha: 2015





ARTÍCULO PUBLICADO

AUTORES: P. M. Limón, R. Gavara y F. Pina.

TÍTULO: Thermodynamics and Kinetics of Cyanidin 3-Glucoside and Caffeine Copigments.

REF. REVISTA: Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61 (22); 5245–5251 (2013)

Thermodynamics and Kinetics of Cyanidin 3-Glucoside and Caffeine Copigments

Piedad M. Limón,[†] Raquel Gavara,^{*,‡} and Fernando Pina^{*,‡}

[†]Department of Physical and Analytical Chemistry, Jaén University, EPS of Linares, Alfonso X El Sabio, n° 28, 23700 Linares, Jaén, Spain

[‡]REQUIMTE, Departamento de Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, 2829-516 Monte de Caparica, Portugal

ABSTRACT: The multiequilibrium system of reactions of cyanidin 3-glucoside at acidic and mildly acidic pH values was studied in the presence of caffeine as a copigment. The thermodynamic and kinetic constants were determined using the so-called direct and reverse pH jump experiments that were followed by conventional UV–vis spectroscopy or stopped flow coupled to a UV–vis detector, depending on the rate of the monitored process. Compared with that of free anthocyanin, the copigmentation with caffeine extends the domain of the flavylium cation up to less acidic pH values, while in a moderately acidic medium, the quinoidal base becomes more stabilized. As a consequence, the hydration to give the colorless hemiketal is difficult over the entire range of pH values. At pH 1, two adducts were found for the flavylium cation–caffeine interaction, with stoichiometries of 1:1 and 1:2 and association constants of 161 M⁻¹ (K_1) and 21 M⁻¹ (K_2), respectively.

KEYWORDS: anthocyanin, cyanidin 3-glucoside, caffeine, copigmentation, color stabilization, hydration

■ INTRODUCTION

Anthocyanins are the ubiquitous compounds responsible for most of the red and blue colors found in flowers and fruits.¹ Noncovalent interactions involving the colored species related to anthocyanins (namely, flavylium cation and quinoidal base) and other natural compounds are a matter of great importance with regard to color expression in plants. Noncovalent interactions have been extensively studied under the category of copigmentation.^{2–5}

Anthocyanins in acidic to moderately acidic solutions are involved in a pH-dependent network of reversible reactions (Figure 1).^{6–9} The flavylium cation (usually red colored) is the only stable species under very acidic conditions, and at higher pH values, the colorless hemiketal is the dominant species together with quinoidal base (blue color), with chalcones as minor components. A convenient way to study the network of chemical reactions involving anthocyanins and related compounds is to conduct pH jumps:¹⁰ a direct pH jump is here defined as a change in pH from equilibrated solutions at very low pH values (where flavylium cation is stable) to higher pH values. Conversely, reverse pH jumps¹¹ are defined as the addition of acid to equilibrated solutions at higher pH values (typically pH 4–6) to reach a very acidic pH where flavylium is stable.

When a direct pH jump is performed, the flavylium cation (AH⁺) transfers a proton to water, leading to a zwitterionic species that rearranges to the quinoidal base A [Figure 1, deprotonation (eq 1)].

The flavylium cation is also involved in a parallel reaction that is much slower than the previous one because of the addition of water at position 2, giving hemiketal species B2 (which will hereafter be termed B) [Figure 1, hydration (eq 2)].^a

On the other hand, the hemiketal (chromene) reacts via a tautomeric process that leads to a ring opening with formation of a *cis*-chalcone species (Cc). This reaction usually occurs on a subsecond to second time scale [Figure 1, tautomerization (eq 3)].

The hydration reaction is strongly dependent on the proton concentration, while the tautomerization is catalyzed at very acidic and basic pH values.¹² In Figure 2, a simulation of the rate constant of these two kinetic processes is given. Below pH 2, hydration is much faster than tautomerization and occurs on a millisecond to subsecond time scale. However, at pH >2.5, hydration is usually much slower than tautomerization.

In conclusion, after a pH jump from a very acidic solution containing the flavylium cation to a moderately acidic solution, quinoidal base is formed immediately and constitutes a kinetic product (because it is usually less stable thermodynamically) that slowly disappears to reach a pseudoequilibrium involving all the species except the *trans*-chalcone.

Finally, the thermodynamic equilibrium is attained from the *cis*-chalcone isomerization to give the *trans*-chalcone (Ct), in a process that in anthocyanins usually takes a few hours [Figure 1, isomerization (eq 4)].

The three kinetic processes are simulated in Figure 3 for the case of anthocyanins, and because of their clear separation in time, they can be studied separately, which simplifies the kinetic analysis of the system. Moreover, the change of regime in the case of the second kinetic process is also illustrated in the figure. Only at lower pH values is the tautomerization reaction slower than the hydration.

Received: February 9, 2013

Revised: May 1, 2013

Accepted: May 3, 2013

Published: May 23, 2013

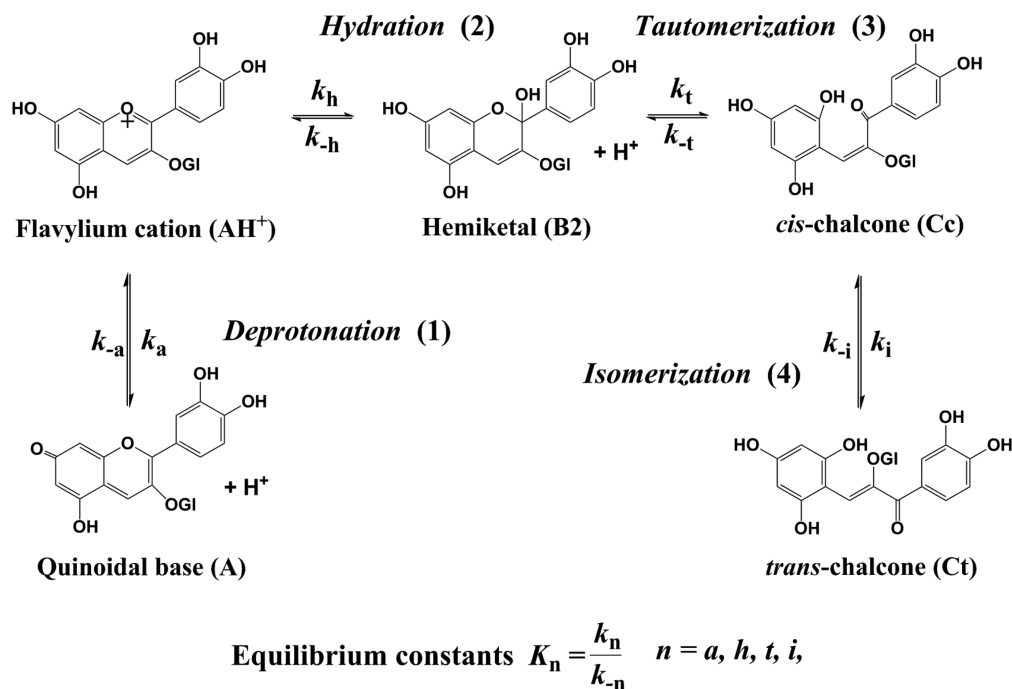


Figure 1. Network of chemical reactions of cyanidin 3-glucoside in acidic to moderately acidic solutions.

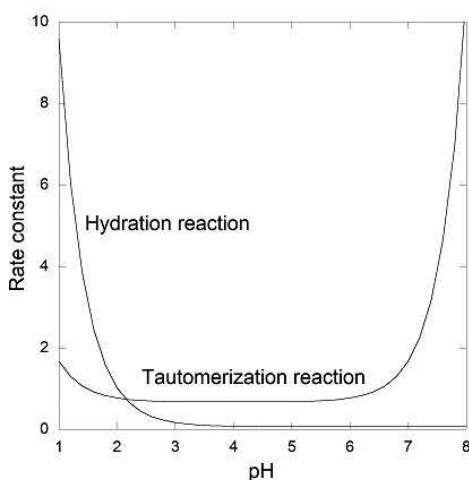


Figure 2. Simulation of the pH-dependent rate constants of hydration and tautomerization using the values reported in this paper: $k_h = 0.07 \text{ s}^{-1}$; $k_{-h} = 95 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$; $k_t = 0.07 \text{ s}^{-1}$; and $k_{-t} = 0.6 \text{ s}^{-1}$. Reliable acid and basic catalysis constants for the tautomerization reaction were estimated to be $k^H = 10$ and $k^{OH} = 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, respectively.

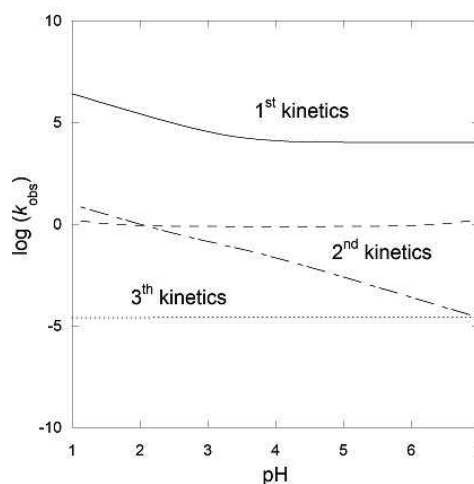


Figure 3. Simulation of the rate constants of the three well-separated kinetic processes taking place in anthocyanins, first kinetics (—), second kinetics (--- and - - -), and third kinetics (···): $k_a = 10^4 \text{ s}^{-1}$; $k_{-a} = 10^{7.4} \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$; $k_h = 0.07 \text{ s}^{-1}$; $k_{-h} = 95 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$; $K_a = 10^{-3.36}$; $K_t = 0.09$; $K_h = 7.3 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$; $k_i = 7.4 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$; $k_{-i} = 2.5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$; $k_t + k_{-t} = 0.7 \text{ s}^{-1}$; $k^H = 10 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$; and $k^{OH} = 10^7 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$.

In spite of numerous and well-documented works regarding the copigmentation with anthocyanins, the effect of copigmentation on the rate and equilibrium constants of the network described above has been less studied.^{13,14} For this purpose, the copigmentation involving cyanidin 3-glucoside and caffeine was selected (Figure 4). The copigmentation effect of caffeine has been studied for malvin^{13,15} and several synthetic flavylium compounds.^{16–18} The main driving force for the association seems to be π - π stacking between the chromophore and the copigment.¹⁵

Caffeine and derivatives of cyanidin 3-glucoside are found together in seeds of cacao¹⁹ and in the leaves of a line of red tea recently developed by natural crossing.²⁰ Additionally, caffeine is a common food additive, and from this point of view, it is

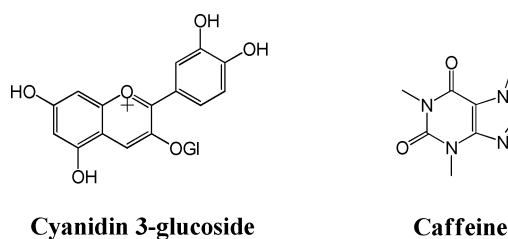


Figure 4. Chemical structures of cyanidin 3-glucoside and caffeine.

interesting to know how its presence can affect the reactivity of anthocyanins, usually employed as food colorants. Recently, we reported on the effect of self-aggregation on the thermody-

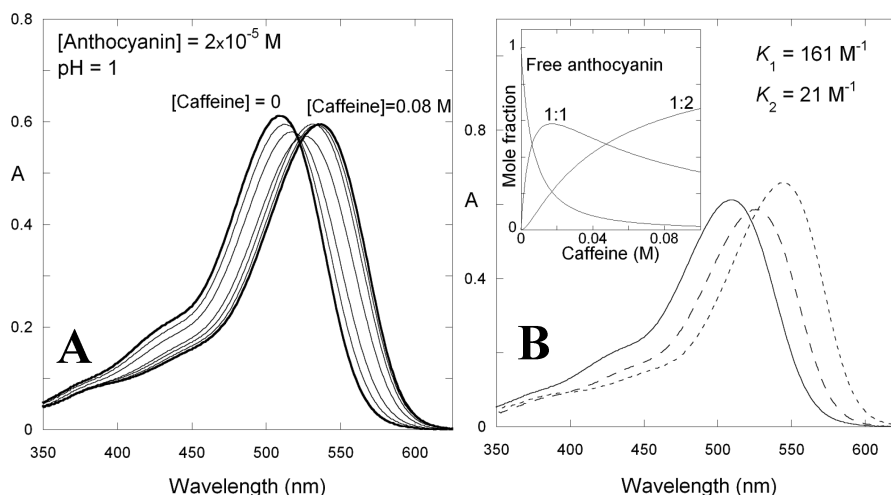


Figure 5. (A) Spectral variations upon addition of caffeine to cyanidin 3-glucoside (2.3×10^{-5} M) at pH 1.0. The spectra correspond to 0, 0.002, 0.006, 0.02, 0.04, 0.06, and 0.08 M caffeine. The spectra for 0 and 0.08 M caffeine are shown as bold lines. (B) Mathematical treatment of the data in panel A allowed us to obtain the pure spectra corresponding to the 1:1 (---) and 1:2 (···) flavylium cation–caffeine adducts. The spectrum of free anthocyanin is plotted as a solid line. The inset shows the molar fractions of the adducts and free anthocyanin as a function of caffeine concentration.

namics and kinetics of the six most common anthocyanidin 3-glucosides, including cyanidin 3-glucoside.¹¹ In this work, we report for the first time an extensive study of the effect of caffeine copigmentation on the thermodynamics and kinetics of the network of chemical reactions of cyanidin 3-glucoside in diluted solutions, where self-aggregation effects can be neglected.

MATERIALS AND METHODS

Cyanidin 3-glucoside chloride (Kuromanin chloride) was purchased from Extrasynthese; caffeine was purchased from Merck. All the reagents ($\geq 96\%$) were used without any further purification. The solutions were prepared in Millipore water. The pH of the solutions was adjusted by the addition of HCl, NaOH, and 8.3×10^{-3} M citrate buffer and was measured on a CRISON pH-Meter BASIC 20⁺ instrument. The ionic strength of the solutions was kept constant at 0.1 M by the addition of NaCl. UV–vis absorption spectra were recorded on Varian Cary 100 Bio and Varian Cary 5000 spectrophotometers. The stopped flow experiments were conducted in an Applied Photophysics SX20 stopped flow spectrometer provided with a PDA.1/UV photodiode array detector with a minimum scan time of 0.65 ms and a wavelength range of 200–735 nm.

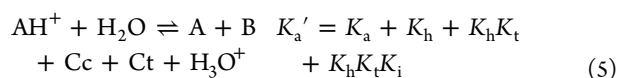
RESULTS AND DISCUSSION

In Figure 5A, the spectral variations observed upon addition of increasing concentrations of caffeine (up to 0.08 M) to a diluted solution of cyanidin 3-glucoside (2.3×10^{-5} M) at pH 1 are shown. For lower caffeine concentrations, the absorption red shifts and slightly decreases and an isosbestic point at 521 nm is observed; for higher caffeine concentrations, the absorption shifts to higher wavelengths and gives rise to a small absorption increase and the isosbestic point at 521 nm disappears, with a new one appearing at 534 nm. At pH 1, the flavylium cation is the only species present in solution in the case of the anthocyanin; thus, these spectral changes suggest the formation of two adducts involving the flavylium cation of cyanidin 3-glucoside and caffeine, probably with flavylium cation:caffeine stoichiometries of 1:1 and 1:2. Mathematical treatment of the system^{21,22} assuming these stoichiometries allowed us to obtain the absorption spectra of the two adducts, as well as the respective association constants, as shown in Figure 5B.

The 1:1 stoichiometry has been proposed for a number of flavylium cation–copigment complexes, usually resulting, like here, in a bathochromic shift and a small decrease in the molar extinction coefficient.^{18,23–25} The formation of a second complex with a 1:2 stoichiometry has been less reported. In this case, we have to take into account the possibility that the formation of this complex will vary, depending on the chemical structure of anthocyanin and copigment as well as the anthocyanin:copigment molar ratio, among other factors. Several years ago,¹⁸ the formation of the 1:2 complex was proposed for the 4-methyl-7-hydroxyflavylium–caffeine and 4'-hydroxyflavylium–caffeine systems at high copigment concentrations, but in both cases, the complexation to additional caffeine induced a greater decrease in the molar extinction coefficient. Here the effect is different; i.e., the formation of the second adduct provokes the increase in the molar extinction coefficient. For some reason (outside the scope of this work), the interaction with more caffeine increases the value of the oscillator strength related to the electronic transition (or transitions) responsible for the absorption band.

Inspection of the inset in Figure 5B shows that concentrations of caffeine higher than the respective solubility limit would be necessary to obtain the 1:2 adduct as the only species. However, for 0.08 M caffeine, practically all the anthocyanin interacts with the copigment through the 1:1 (36%) and 1:2 (61%) adducts, and we selected this ratio of concentrations, i.e., 0.08 M caffeine versus 2×10^{-5} M cyanidin 3-glucoside, to analyze the effect of copigmentation on the thermodynamics and kinetics related to the network of chemical reactions of the anthocyanin (Table 1).

The pH dependence of the absorption spectra of thermally equilibrated solutions of cyanidin 3-glucoside 1.7×10^{-5} M in the presence of caffeine 0.08 M is shown in Figure 6A. Here, K'_a is the global acid–base equilibrium constant that relates the flavylium cation with the other species in the network (eq 5):²⁶



When these spectra are compared with the absorption spectra of cyanidin 3-glucoside in the absence of caffeine (Figure 6B),¹¹

Table 1. Thermodynamic Constants of 1.7×10^{-5} M Cyanidin 3-Glucoside in the Presence and Absence of 0.08 M Caffeine

caffeine	pK_a	K_h (M^{-1})	K_t	K_i^b	pK_a'
0.08 M ^a	3.3(6)	7.4×10^{-4}	0.09	0.3	2.9
– ^c	3.8(0)	3.1×10^{-3}	0.12	–	2.5

^aEstimated error for all constants except K_t , 15%. ^bThe percentage of Ct is $\approx 2\%$, and the reported value is a rough estimate. ^cSee ref 11. There the reported concentration of anthocyanin was 2×10^{-5} M.

it is clear that the copigment stabilizes the flavylium cation, because its adduct becomes less acidic (pK_a' higher), as well as the quinoidal base, because a significant amount of this species is presented for less acidic solutions.

In Figure 7A, the kinetic process with a direct pH jump from 1 to 5.8 for 1.7×10^{-5} M cyanidin 3-glucoside and 0.08 M caffeine is shown. Immediately after the pH jump, the characteristic absorption spectrum of the quinoidal base appears. This process corresponds to the proton transfer reaction, and its rate that occurs on the microsecond time scale is too fast to be followed by the common techniques, including stopped flow⁶ (eq 6).

$$k_{1st} = k_a + k_{-a}[H^+] \quad (6)$$

The observed decrease in the quinoidal base absorption is biexponential, the faster process corresponding to the hydration control (eq 7).⁹ In other words, because we are in a range of pH values above 2.5, the hemiketal B equilibrates faster with *cis*-chalcone than flavylium cation and hemiketal (faster tautomerization) and the term $1/(1 + K_t)$ corresponds to the mole fraction of B in equilibrium with Cc. Moreover, as reported by Brouillard and Dubois,⁶ the quinoidal base does not give directly the hemiketal at moderately acidic and neutral pH values; in fact, only the fraction of flavylium cation available from the initial (faster) equilibrium with quinoidal base leads to hemiketal. This observation is included in eq 7 by the term $[H^+]/([H^+] + K_a)$, corresponding to the mole fraction of the flavylium cation.

$$k_{2nd(\text{hydration control})} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_a} k_h + \frac{1}{1 + K_t} k_{-h}[H^+] \quad (7)$$

The slower process in Figure 6A corresponds to the isomerization to give Ct, and its rate depends on the mole fraction of Cc in the pseudoequilibrium involving A, AH^+ , B, and Cc (eq 8).⁹

$$k_{3rd} = \frac{K_h K_t}{[H^+] + K_a + K_h(1 + K_t)} \times k_i + k_{-i} \quad (8)$$

Because the mole fraction of Ct is very small in anthocyanins (<5%), the latest process is difficult to observe and quantify precisely.

In Figure 7B, the absorption spectra of the quinoidal base (taken immediately after the direct pH jump to $pH \gg pK_a$) is compared with that corresponding to cyanidin 3-glucoside in the absence of caffeine.¹¹ As in the case of the flavylium cation, the copigmentation with caffeine gives rise to a red shift in the absorption spectra, indicating that the excited state of the anthocyanin is more stabilized than the ground state.

The data reported in the inset of Figure 7A allow us to estimate the equilibrium constant K_a from eq 9,²⁷ where the initial absorbance is due to the complete conversion of the total concentration of the anthocyanin (previously in the form of flavylium cation) to quinoidal base and the final absorbance is caused by the quinoidal base remaining at the equilibrium; from the inset of Figure 7A, 35% of quinoidal base remains at equilibrium (1.7×10^{-5} M cyanidin 3-glucoside and 0.08 M caffeine). From eq 9 and using a K_a' value of $10^{-2.9}$, a K_a value of $10^{-3.36}$ is obtained.

$$\frac{A_f}{A_i} = \frac{K_a}{K_a'} \quad (9)$$

Several pH jumps like that shown in Figure 7A were performed at different final pH values. The faster rate constant of the biexponential process (hydration) is plotted versus pH in Figure 8 (●) and was fit using eq 7 (---) (see below).

The reverse pH jumps give complementary information about the system. In Figure 9, acid was added to equilibrated solutions at pH 5.7 to yield a final pH of 1.3, and the spectral variations were followed by stopped flow (Figure 9A). In this

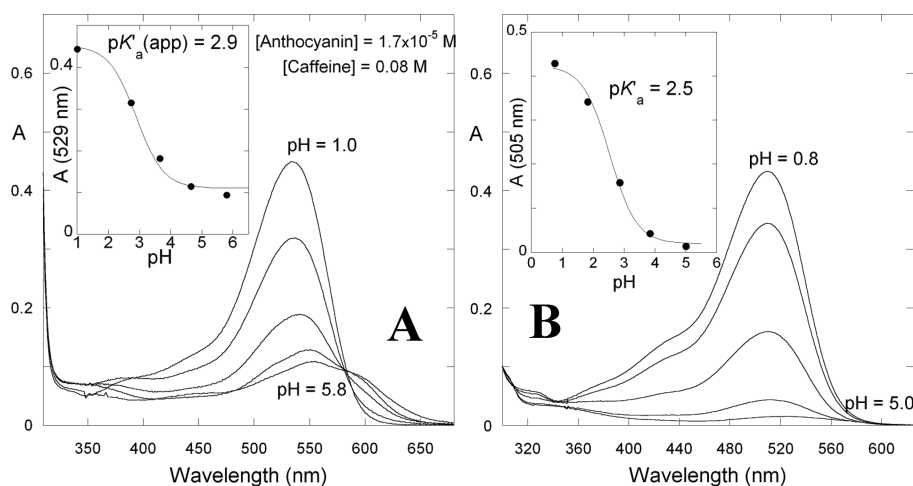


Figure 6. (A) pH-dependent absorption spectra of thermally equilibrated solutions of 1.7×10^{-5} M cyanidin 3-glucoside and 0.08 M caffeine. (B) Same in the absence of caffeine [2×10^{-5} M (see ref 11)].

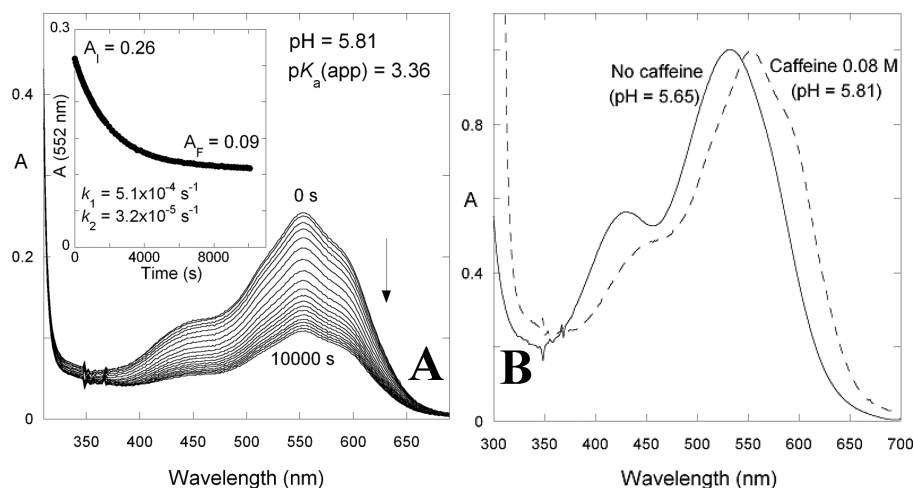


Figure 7. (A) Spectral variations upon a pH jump from 1.0 to 5.8, with 1.7×10^{-5} M cyanidin 3-glucoside and 0.08 M caffeine. (B) Normalized spectra of the cyanidin 3-glucoside quinoidal base in the presence of caffeine obtained immediately after the pH jump (---) and analogous spectra of cyanidin 3-glucoside in the absence of caffeine for comparison (see ref 11).

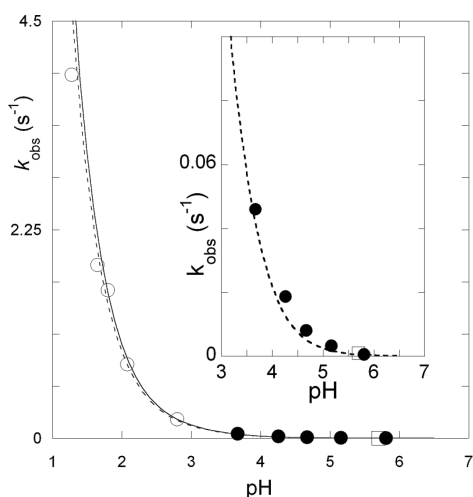


Figure 8. pH dependence of the direct (●) and reverse (○) pH jumps of 1.7×10^{-5} M cyanidin 3-glucoside, in the presence of 0.08 M caffeine. Fitting was achieved by eq 7 (---) and eq 10 (—); a point regarding the kinetics of the complexation of cyanidin 3-glucoside at pH 5.7 is included (□).

case (low pH value), hydration becomes faster than tautomerization. The quinoidal base present at pH 5.7 was immediately converted into flavylum cation, a process that took place during the mixing time of the stopped flow. This reaction was followed by the formation of more flavylum cation through a biexponential process: the first corresponding to the formation of flavylum cation from the hemiketal present in the equilibrium at pH 5.7 (eq 10) and the last to the conversion of Cc into flavylum cation via hemiketal (eq 11). In this kind of experiment, no reversibility is expected from B to give Cc.²⁸

$$k_{\text{obs1(SF)}} = \frac{[\text{H}^+]}{K_a + [\text{H}^+]} k_h + k_{-h} [\text{H}^+] \quad (10)$$

$$k_{\text{obs2(SF)}} = k_{-t} \quad (11)$$

In eq 11, neither acidic nor basic catalysis was considered for the reverse tautomerization reaction,¹² because at this pH the proton concentration was low for the observation of the first

and the hydroxyl concentration was very low for detection of the second.

The amplitudes of the three processes are reported in Figure 9B and give

$$K_t = \frac{\%C_c}{\%B} \quad (12)$$

and

$$\frac{K_a}{K_h} = \frac{\%A}{\%B} \quad (13)$$

From the percentages shown in Figure 9B, $K_t = 0.09$ and $K_h = 6.3 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$. The kinetic constants of the reverse pH jumps fit with eq 10 are shown in Figure 8 (○).

Knowing K_t and K_a , we can conduct a global fitting of the kinetic data reported in Figure 8 with eqs 7 and 10, leading to a k_h of 0.07 s^{-1} and a k_{-h} of $95 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. The ratio between the hydration and dehydration rate constants gives a K_h of $7.4 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1}$, in good agreement with the value calculated from the reverse pH jumps (see above). It is worth noting that the similarity of eq 7 with eq 10 results from the low value of K_t in this system. Finally, the slower kinetic process in Figure 9B corresponds to a rate constant k_{-t} of 0.7 s^{-1} , permitting us to calculate a k_t of 0.06 s^{-1} from the respective equilibrium constant.

To corroborate the interpretation of the copigmentation phenomenon, an equilibrated solution of cyanidin 3-glucoside at pH 5.7 was mixed with caffeine at the same pH value (final concentrations of 1.7×10^{-5} and 0.08 M, respectively) and the spectral variations were monitored (Figure 10). An increase in the level of the caffeine–quinoidal base adduct is clearly observed. It is worth noting the rate of the kinetic process shown in Figure 10, which fits with the hydration–dehydration kinetic process presented in the inset of Figure 8 (□).

In summary, the spectral changes upon addition of caffeine to cyanidin 3-glucoside show clearly the interaction of the copigment with the flavylum cation as well as with quinoidal base. The mole fraction distribution of the species of the flavylum network in the absence¹¹ and presence of caffeine 0.08 M is represented in Figure 11. The domain of the flavylum cation is extended by addition of caffeine as a result of the stabilization of this species, while at moderately acidic pH

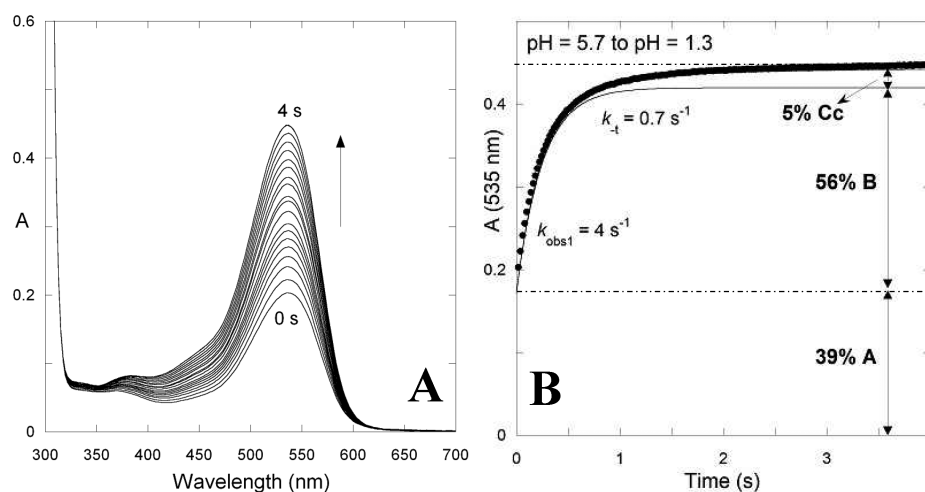


Figure 9. (A) Reverse pH jump from an equilibrated solution of 1.7×10^{-5} M cyanidin 3-glucoside at pH 5.7 in the presence of 0.08 M caffeine to a final pH of 1.3, followed by stopped flow. (B) Trace of the kinetics monitored at 535 nm.

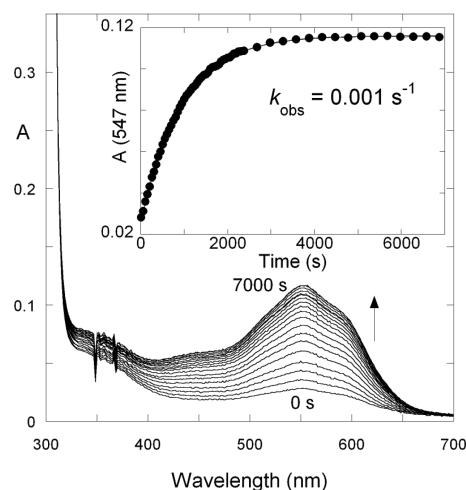


Figure 10. Spectral variations upon addition of caffeine to an equilibrated solution of cyanidin 3-glucoside at pH 5.7. Final concentrations of 0.08 M caffeine and 1.7×10^{-5} M cyanidin 3-glucoside.

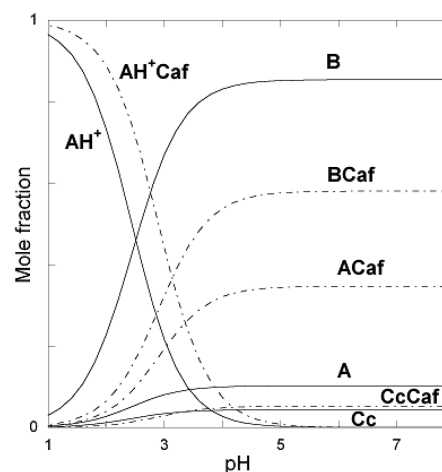


Figure 11. Comparison between the mole fraction distribution of cyanidin 3-glucoside in the absence¹¹ (—) and presence of 0.08 M caffeine (---). In this figure, the terms AH⁺Caf, BCaf, ACaf, and CcCaf refer to the molar fractions of AH⁺, B, A, and Cc, respectively, in the presence of caffeine.

values, the level of the quinoidal base–caffeine adduct increases at the expense of the hemiketal.

With regard to the kinetic constants, the most interesting result is the increase in the dehydration rate constant (k_{-h}) for the anthocyanin–caffeine system (Table 2). Somehow, the presence of the copigment facilitates the reaction of the hemiketal to give the flavylium cation. Analogous behavior was previously observed in the case of the self-aggregation of anthocyanins (i.e., dehydration is facilitated in more concentrated and/or aggregated solutions).¹¹

In conclusion, copigmentation results in the stabilization of the colored flavylium cation and quinoidal base species, making the hydration to give the colorless hemiketal more difficult. The interaction of the anthocyanin with caffeine mimics in some way what happens in Nature. The flavylium cation is only stable at very acidic pH values, and as a consequence, to achieve the red color inside the vacuoles of the plants (roughly in the pH interval of 3–6), it is necessary to increase the pH domain of the flavylium cation. On the other hand, at higher pH values, the quinoidal base is a very minor species, and thus, interactions

Table 2. Kinetic Constants of 1.7×10^{-5} M Cyanidin 3-Glucoside in the Presence and Absence of 0.08 M Caffeine

caffeine	k_h (s ⁻¹)	k_{-h} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_t (s ⁻¹)	k_{-t} (s ⁻¹)	k_i (s ⁻¹) ^b	k_{-i} (s ⁻¹) ^b
0.08 M ^a	0.07	95	0.06	0.7	7.4×10^{-6}	2.5×10^{-5}
— ^c	0.11	35	0.07	0.6	—	—

^aEstimated error for all constants except the isomerization constants, 15%. ^bThe percentage of Ct is $\approx 2\%$, and the reported value is a rough estimate. ^cSee ref 11. There the reported concentration of anthocyanin was 2×10^{-5} M.

with suitable species are needed to stabilize the quinoidal base and obtain blue colors.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*R.G.: phone, +351212948300, ext. 10946; fax, +351212948550; e-mail, r.castell@fct.unl.pt. F.P.: phone, +351212948355; fax, +351212948550; e-mail, fp@fct.unl.pt.

Funding

This work was supported by Fundação para a Ciência e Tecnologia through Projects PEst-C/EQB/LA0006/2011 and PTDC/QUI-QUI/117996/2010. Postdoctoral Grant SFRH/BPD/44639/2008 (R.G.) is also acknowledged.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ADDITIONAL NOTE

^aThis nomenclature is due to the fact that in several systems it is possible to observe the formation of a second hemiketal, from the addition of water to position 4, which is termed B4. However, this reaction is negligible for the system being studied here.

■ REFERENCES

- (1) Andersen, Ø. M.; Jordheim, M. The Anthocyanins. In *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*; Andersen, Ø. M., Markham, K. R., Eds.; CRC Taylor & Francis: Boca Raton, FL, 2006; pp 471–551.
- (2) Asen, S.; Steward, R. N.; Norris, K. H. Copigmentation of anthocyanins in plant-tissues and its effect on color. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 1139–1144.
- (3) Asen, S.; Steward, R. N.; Norris, K. H. Anthocyanin, flavonol copigments and pH responsible for larkspur flower color. *Phytochemistry* **1975**, *14*, 2677–2682.
- (4) Liao, H.; Cai, Y.; Haslam, E. Polyphenol Interactions. 6. Anthocyanins copigmentation and color changes in red wines. *J. Sci. Food Agric.* **1992**, *59*, 299–305.
- (5) Gonnet, J. F. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited. 1. A colorimetric definition using the CIELAB scale. *Food Chem.* **1998**, *63*, 409–415.
- (6) Brouillard, R.; Dubois, J.-E. Mechanism of structural transformations of anthocyanins in acidic media. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 1359–1364.
- (7) Brouillard, R.; Delaporte, B. Chemistry of anthocyanins pigments. 2. Kinetic and thermodynamic study of proton transfer, hydration and tautomerization reactions of malvidin-3-glucoside. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 8461–8468.
- (8) Brouillard, R.; Lang, J. The hemiacetal-cis-chalcone equilibrium of malvin, a natural anthocyanin. *Can. J. Chem.* **1990**, *68*, 755–761.
- (9) Pina, F.; Melo, M. J.; Laia, C. A. T.; Parola, A. J.; Lima, J. C. Chemistry and applications of flavylium compounds: A handful of colours. *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 869–908.
- (10) Brouillard, R.; Delaporte, B.; Dubois, J.-E. Chemistry of anthocyanin pigments. 3. Relaxation amplitudes in pH-jumps experiments. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 6202–6205.
- (11) Leydet, Y.; Gavara, R.; Petrov, V.; Diniz, A. M.; Parola, A. J.; Lima, J. C.; Pina, F. The effect of self-aggregation on the determination of the kinetic and thermodynamic constants of the network of chemical reactions in 3-glucoside anthocyanins. *Phytochemistry* **2012**, *83*, 125–135.
- (12) McClelland, R. A.; Gedge, S. Hydration of the flavylium ion. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, *102*, 5838–5848.
- (13) Dangles, O.; Brouillard, R. Polyphenol interactions. The copigmentation case: Thermodynamic data from temperature variation and relaxation kinetics. Medium effect. *Can. J. Chem.* **1992**, *70*, 2174–2189.
- (14) Dangles, O.; Saito, N.; Brouillard, R. Kinetic and thermodynamic control of flavylium hydration in pelargonidin cinnamic acid complexation: Origin of the extraordinary flower color diversity of *pharbitis-nil*. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 3125–3132.
- (15) Mistry, T. V.; Cai, Y.; Lilley, T. H.; Haslam, E. Polyphenol Interactions. 5. Anthocyanins copigmentation. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1991**, 1287–1296.
- (16) Wigand, M. C.; Dangles, O.; Brouillard, R. Complexation of a fluorescent anthocyanin with purines and polyphenols. *Phytochemistry* **1992**, *31*, 4317–4324.
- (17) El Hajji, H.; Dangles, O.; Figueiredo, P.; Brouillard, R. 3'-(β -D-Glycopyranosyloxy)flavylium ions: Synthesis and investigation of their properties in aqueous solution. Hydrogen bonding as a mean of colour variation. *Helv. Chim. Acta* **1997**, *80*, 398–413.
- (18) Pina, F. Caffeine interaction with synthetic flavylium salts. A flash photolysis study for the adduct involving 4',7'-dihydroxyflavylium. *J. Photochem. Photobiol., A* **1998**, *115*, 51–59.
- (19) Pereira-Caro, G.; Borges, G.; Nagai, C.; Jackson, M. C.; Yokota, T.; Crozier, A.; Ashihara, H. Profiles of Phenolic Compounds and Purine Alkaloids during the Development of Seeds of *Theobroma cacao* cv. *Trinitario*. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 427–434.
- (20) Maeda-Yamamoto, M.; Saito, T.; Nesumi, A.; Tokuda, Y.; Ema, K.; Honma, D.; Ogino, A.; Monobe, M.; Murakami, A.; Murakami, A.; Tachibana, H. Chemical analysis and acetylcholinesterase inhibitory effect of anthocyanin-rich red leaf tea (cv. Sunrouge). *J. Sci. Food Agric.* **2012**, *92*, 2379–2386.
- (21) Antonov, L.; Gergov, G.; Petrov, V.; Kubista, M.; Nygren, J. UV-Vis spectroscopic and chemometric study on the aggregation of ionic dyes in water. *Talanta* **1999**, *49*, 99–106.
- (22) Antonov, L.; Petrov, V. Quantitative analysis of undefined mixtures: “Fishing net” algorithm. *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *374*, 1312–1317.
- (23) Brouillard, R.; Wigand, M.-C.; Dangles, O.; Cheminat, A. pH and Solvent Effects on the Copigmentation Reaction of Malvin with Polyphenols, Purine and Pyrimidine Derivatives. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1991**, 1235–1241.
- (24) Ferreira da Silva, P.; Lima, J. C.; Freitas, A. A.; Shimizu, K.; Maçanita, A. L.; Quina, F. H. Charge-Transfer Complexation as a General Phenomenon in the Copigmentation of Anthocyanins. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109*, 7329–7338.
- (25) França Rodrigues, R.; Ferreira da Silva, P.; Shimizu, K.; Freitas, A. A.; Kovalenko, S. A.; Ernsting, N. P. Ultrafast Internal Conversion in a Model Anthocyanin–Polyphenol Complex: Implications for the Biological Role of Anthocyanins in Vegetative Tissues of Plants. *Chem.—Eur. J.* **2009**, *15*, 1397–1402.
- (26) Pina, F.; Petrov, V.; Laia, C. A. T. Photochromism of flavylium systems. An overview of a versatile multistate system. *Dyes Pigm.* **2012**, *92*, 877–889.
- (27) Pina, F. Thermodynamics and kinetics of flavylium salts: Malvin revisited. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1998**, *94*, 2109–2116, 3781 (correction in Scheme 1, whereby the Ct and Cc structures should be exchanged).
- (28) Gavara, R.; Yoann Leydet, Y.; Petrov, V.; Pina, F. Photochemistry of 2-(4-hydroxystyryl)-1-naphthopyrylium. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2012**, *11*, 1691–1699.



ARTÍCULO PUBLICADO

AUTORES: P. Limón, R. Malheiro, F.G. Acién, J.M. Fernández, S. Casal., N. Rodrigues, R.Cruz, R. Bermejo and J. A. Pereira.

TÍTULO: Improvement of stability and carotenoids fraction of virgin olive oils by addition of microalgae *Scenedesmus almeriensis* extracts.

REF. REVISTA: Food Chemistry 174; 203-211(2015).



Improvement of stability and carotenoids fraction of virgin olive oils by addition of microalgae *Scenedesmus almeriensis* extracts



Piedad Limón^a, Ricardo Malheiro^{b,c}, Susana Casal^c, F. Gabriel Acién-Fernández^d, José M^a Fernández-Sevilla^d, Nuno Rodrigues^b, Rebeca Cruz^c, Ruperto Bermejo^{a,*}, José Alberto Pereira^{b,*}

^a Department of Physical and Analytical Chemistry, Jaén University, Linares High Polytechnic School (EPSL), 23700 Linares, Spain

^b Mountain Research Centre (CIMO), School of Agriculture, Polytechnic Institute of Braganca, Campus de Santa Apolónia, Braganca, Portugal

^c REQUIMTE/Laboratório de Bromatologia e Hidrologia, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Rua de Jorge Viterbo Ferreira, 228, 4050-313 Porto, Portugal

^d Department of Chemical Engineering, Almería University, E-04071 Almería, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 May 2014

Received in revised form 25 October 2014

Accepted 29 October 2014

Available online 28 November 2014

Keywords:

Carotenoids

Virgin olive oil

Microalgae

Scenedesmus almeriensis

Nutrition

ABSTRACT

Humans are not capable of synthesizing carotenoids *de novo* and thus, their presence in human tissues is entirely of dietary origin. Consumption of essential carotenoids is reduced due to the lower intake of fruits and vegetables. Microalgae are a good source of carotenoids that can be exploited. In the present work, carotenoids rich extracts from *Scenedesmus almeriensis* were added to extra-virgin olive oils at different concentrations (0.1 and 0.21 mg/mL) in order to enhance the consumption of these bioactives.

Extracts brought changes in olive oils color, turning them orange-reddish. Quality of olive oils was improved, since peroxidation was inhibited. Olive oils fatty acids and tocopherols were not affected. β -carotene and lutein contents increase considerably, as well as oxidative stability, improving olive oils shelf-life and nutritional value.

Inclusion of *S. almeriensis* extracts is a good strategy to improve and enhance the consumption of carotenoids, since olive oil consumption is increasing.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays fruits and vegetables consumption worldwide is a pressing concern. According to Pomerleau, Lock, Knai, and McKee (2004), in 2000 2.7 million deaths occurred worldwide in 2000 and 1.8% of total global disease burden were attributed to the low fruit and vegetable consumption. Furthermore, low intake of fruits and vegetables is estimated to cause around 14% of gastrointestinal cancer deaths, about 11% of ischaemic heart disease deaths and about 9% of stroke deaths worldwide (World Health organization, 2014). Around the world the intake of fruits and vegetables is not sufficient, with a particular attention to adolescents and children, specially boys and adult males, being this point highlighted by several international organisms and authorities: Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 2013); European Food Information Council (EUFIC, 2012); Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2013).

With a reduced consumption of fruits and vegetables several bioactive food components are not ingested in a correct dose, having repercussions at human organism (Duyn & Pivonka, 2000). Fruits and vegetable consumption reduce the prevalence of cancer (Block, Patterson, & Subar, 1992) and the risk of cardiovascular diseases (Veer, Jansen, Klerk, & Kok, 2000). Among the most important bioactive components are the carotenoids (Gaziano et al., 1995). Carotenoids are important components of several biological processes in the human organism, having repercussions in human health (Granado, Olmedilla, & Blanco, 2003). The amounts of carotenoids that are found in human tissues are almost exclusively from dietary origin, mainly from fruits and vegetables, or from supplements.

Two of more relevant carotenoids are β -carotene and lutein. β -carotene is a carotenoid that has been used both as a food coloring agent and as a source of vitamin A in animal feed. In addition β -carotene has been used to treat disorders such as asthma and erythropoietic protoporphyria, and to reduce the risk of several cancers as breast and lung cancer in addition to cardiovascular disease (Omenn et al., 1996). It has been also reported that the uptake of β -carotene reduce the risk of age-related macular

* Corresponding authors. Tel.: +34 953 64 8513; fax: +34 953 64 85 06 (R. Bermejo). Tel.: +351 273 30 3277; fax: +351 273 325405 (J.A. Pereira).

E-mail addresses: rbermejo@ujaen.es (R. Bermejo), jpereira@ipb.pt (J.A. Pereira).

degeneration (AMD) (Teikari et al., 1998). β -carotene can be found in vegetables as carrots, pumpkins and sweet potatoes that colors them orange, although it can be also produced from *Dunaliella* sp., a hypersaline microalgae produced in open raceways.

Lutein is a xanthophyll compound with antioxidant activity and recommended to prevent some types of cancer (Nishino, 1998), as well as cardiovascular (Peterson, Dwyer, Jacques, & McCullough, 2012) and retinal diseases (Ozawa et al., 2012). The estimated lutein daily uptake of 1.5 mg day⁻¹ by eating fruits and vegetables is not enough to reach the recommended daily uptake of 6 mg day⁻¹ (Seddon et al., 1994), then the recommendation to consume lutein supplements. Lutein is commercially produced from marigold (*Tagetes erecta* L.), but the lutein content of marigold flowers is very low, of 0.03% (dry weight; d.w.), whereas microalgae as *Muriellopsis* sp., *Chlorella* sp. and *Scenedesmus* sp. can contain large amounts of this compound, up to 0.90% d.w. (García-González, Moreno, Manzano, Florencio, & Guerrero, 2005; Yen, Sun, & Ma, 2011). The production of lutein from a new lutein-rich microalgae strain, *Scenedesmus almeriensis*, has been already patented.

S. almeriensis can contain up to 1.5% d.w. of lutein together with other carotenoids as β -carotene and can be produced with high productivity in closed tubular photobioreactors, in continuous mode at large scale, thus being a continuous and reliable source of lutein (Fernández-Sevilla, Ación Fernández, & Molina-Grima, 2010; Sánchez et al., 2008a,b).

Contrasting with the reduced consumption of fruits and vegetables is the olive oil consumption. This premium vegetable oil is steadily increasing production and consumption worldwide over the last years (IOC, 2013a,b). Therefore, olive oil could be a good convoy to improve and enhance the intake of carotenoids in a daily basis. In this sense, in the present work, the main goals were to study the effects of the addition of different concentrations of *S. almeriensis* carotenoids rich extracts to extra-virgin olive oils. The olive oils were evaluated for color and quality attributes, composition (fatty acids profile, tocopherols, pigments), and oxidative stability in order to support their efficiency as antioxidants while characterizing the changes induced in the olive oil legislated parameters.

2. Materials and methods

2.1. Production conditions of microalgae *S. almeriensis*

The microalgae *S. almeriensis* CCAP 276/24 was produced in an industrial size outdoor tubular photobioreactor (3,000 L), in continuous mode at 0.30 L/day dilution rate, on Almería (Spain) at spring. Culture medium used was prepared on freshwater using fertilizers (NaNO₃, KH₂PO₄, micronutrients). To avoid contamination the culture medium was ozonised and passed by ultrafiltration up to 0.02 μ m. The cultures were performed at pH = 8.0 by on-demand injection of CO₂, and below 30 °C by passing thermostated water through a heat exchanger located inside the reactor. The biomass was daily harvested by centrifugation, then being lyophilised and stored at -18 °C. Lyophilised biomass was used as raw material (Ación, Fernández-Sevilla, Magán, & Molina-Grima, 2012).

2.2. Extraction methods

Lutein is currently separated and purified from marigold flowers by saponification-extraction-recrystallization method (Morita, Watanabe, & Saiki, 2002). A modification of this method has been used to recover carotenoids from lyophilized biomass of *S. almeriensis* (Cerón et al., 2008). First step is a cell disruption process, with alumina in a 1:1 w/w proportion, using a beads mill (Staatlich Berlin Ku 4) at rotation speed of 120 rpm and with beads

of 28 mm diameter for 5 min to remove fatty acids soaps. Second step is a saponification performed using 4% w/v KOH with a biomass concentration of 100 g/L for 5 min. Longer alkaline treatments or the use of higher KOH concentrations reduced the yield of the process. Finally, extraction with hexane is performed using a 1:1 ratio hexane to sample volume, a total of three steps being performed to recover more than 90% of carotenoids contained in the processed biomass. In each step a volume of ethanol equal to 1% of the total volume was added for avoiding emulsion (Camacho et al., 2007). Hexane was removed from the extract by high vacuum distillation.

2.3. Olive oils sampling and extract addition

Five commercial extra-virgin olive oils (EVOO's) representative from Jaén region were selected for the present study (from A to E). Three bottles of 750 mL of each olive oil were obtained ($n = 3$). From each bottle, three samples of 50 mL were constituted: control (I – olive oils without extract); olive oil with 0.1 mg of extract per mL of oil (II); and olive oil with 0.21 mg of extract per mL of oil (III). All olive oils were filtrated in the presence of sulfate sodium anhydrous before use. Once prepared, samples were homogenized and kept under 4 °C prior to any analysis.

2.4. Physical and quality parameters evaluated

2.4.1. Color determination

Color of olive oils with and without extract addition was measured with a Konica Minolta model CR-400 colorimeter. Color differences (ΔE) between control samples considered as standard (olive oils without extract) and oils with extract addition were calculated from the determined monochromatic variables L^* , a^* , and b^* obtained from CIELAB method, as well as yellowness index (YI) as described by Zamora, Olmo, Navarro, and Hidalgo (2004):

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

$$YI = \frac{142.86 \times b^*}{L^*}$$

L^* is a measure of luminance or lightness component, which ranges from 0 to 100 (black to white); a^* ranges from negative to positive (green to red); and b^* also ranges from negative to positive (blue to yellow).

2.4.2. Quality parameters determination

Free acidity (FA), peroxide value (PV) and coefficients of specific extinction at 232 and 270 nm (K_{232} and K_{270}) were determined according to European Union standard methods (Annexes II and IX in European Community Regulation EEC/2568/91 from 11th July).

2.5. *p*-Anisidine value determination

Unsaturated aldehydes, secondary oxidation products, were estimated by the anisidine value (*p*-AV), as detailed in ISO 6885 (2006). This measurement is based on the absorbance increase per g of oil, measured at 350 nm (Genesys 10UV), of an olive oil solution in iso-octane, before and after reaction with *p*-anisidine reagent in the dark.

2.6. Oxidative stability

The oxidative stability was estimated by measuring the oxidation induction time, on a Rancimat 743 apparatus (Metrohm CH, Switzerland). Filtered, cleaned, dried air (20 L/h) was bubbled

through the oil (3.00 g) heated at 120 ± 1.6 °C, with the volatile compounds being collected in water, and the increasing water conductivity continuously measured. The time taken to reach the conductivity inflection was recorded.

2.7. Fatty acids composition

Fatty acids were evaluated as their methyl esters after cold alkaline transesterification with methanolic potassium hydroxide solution (European Community Regulation EEC/2568/91 from 11th July) and extraction with *n*-heptane. The fatty acid profile was determined with a Chrompack CP 9001 chromatograph equipped with a split–splitless injector, a FID detector, an autosampler Chrompack CP-9050 and a 50 m \times 0.25 mm i.d. fused silica capillary column coated with a 0.19 μ film of CP-Sil 88 (Varian). Helium was used as carrier gas at an internal pressure of 110 kPa. The temperatures of the detector and injector were 250 and 230 °C, respectively. The oven temperature was programmed at 120 °C during the first 3 min with an increase of 4 °C/min until 220 °C. The split ratio was 1:50 and the injected volume was of 1 μ L. The results are expressed in relative percentage of each fatty acid, calculated by internal normalization of the chromatographic peak area eluting between myristic and lignoceric methyl esters. A control sample (olive oil 47118, Supelco) and a fatty acids methyl esters standard mixture (Supelco 37 FAME Mix) was used for identification and calibration purposes (Sigma, Spain).

2.8. Tocopherols composition

Tocols were evaluated following the international standard ISO 9936 (2006), with some modifications as described by Malheiro et al. (2013a). Tocopherols standards (α , β , γ and δ) were purchased from Calbiochem (La Jolla, San Diego, CA) and Sigma (Spain), while the internal standard 2-methyl-2-(4,8,12-trimethyltridecyl)chroman-6-ol (tocol) was from Matreya Inc. (Pleasant Gap, PA). An accurate amount of filtered olive oil or *S. almeriensis* extract were blended with an appropriate amount of internal standard solution (tocol) in a 1.5 mL volume of *n*-hexane and homogenized by stirring. Sample preparation was conducted in dark and tubes containing the samples were always wrapped in aluminum foil. The mixture was centrifuged for 5 min at 13,000 rpm and the supernatant analyzed by HPLC. The liquid chromatograph consisted of a Jasco integrated system (Japan) equipped with a Jasco LC – NetIII/ADC data unit, a PU-1580 Intelligent Pump, a LG-1580-04 Quaternary Gradient Unit, a DG-1580-54 Four Line Degasser and an FP-920 fluorescence detector ($\lambda_{exc} = 290$ nm and $\lambda_{em} = 330$ nm). The chromatographic separation was achieved on a Supelcosil™ LC-SI column (3 μ m) 75 \times 3.0 mm (Supelco, Bellefonte, PA), operating at constant room temperature (23 °C). A mixture of *n*-hexane and 1,4-dioxane (97.5:2.5) was used as eluent, at a flow rate of 0.7 mL/min. Data were analyzed with the ChromNAV Control center – JASCO Chromatography Data Station (Japan). The compounds were identified by chromatographic comparisons with authentic standards, by co-elution and by their UV spectra. Quantification was based on the internal standard method, using the fluorescence signal response.

2.9. Pigments composition

The extracts were prepared in accordance with Achir, Randrianatoandro, Bohuon, Laffargue, and Avallone (2010). Briefly, olive oil samples (200 mg) were added with an appropriate amount of internal standard β -apo-carotenol (Sigma–Aldrich), mixed with 2 mL acetone, vortexed for 10 s, and left overnight at -20 °C for triacylglycerol crystallization. Triacylglycerols were separated by rapid sampling followed by centrifugation at

13,000 rpm. These steps were omitted in the *S. almeriensis* extract analysis, being directly diluted in acetone after internal standard addition. The extract was directly injected into the HPLC column, a Phenomenex Luna C18 (250 \times 3.5 mm internal diameter) at 23 °C and eluted with a 30-min linear gradient from 80% aqueous methanol (v/v) containing 0.05% triethylamine and 20% ethyl acetate (containing 0.05% triethylamine) at 1 mL/min. The analysis was performed on the same HPLC equipment described for the tocols, except for the use of a DAD detector (JASCO MD-2015-Plus, Japan). Lutein and β -carotene were obtained from Sigma. Calibration curves were constructed at 440 nm for lutein and β -carotene against the internal standard.

2.10. Statistical analysis

2.10.1. Analysis of variance

An analysis of variance (ANOVA) with Type III sums of squares was performed using the GLM (General Linear Model procedure) of the SPSS software, version 21.0 (IBM Corporation, New York, U.S.A.). The fulfilment of the ANOVA requirements, namely the normal distribution of the residuals and the homogeneity of variance, were evaluated by means of the Kolmogorov–Smirnov with Lilliefors correction (if $n > 50$) or the Shapiro–Wilk's test (if $n < 50$), and the Levene's tests, respectively. All dependent variables were analyzed using a one-way ANOVA with or without Welch correction, depending if the requirement of the homogeneity of variances was fulfilled or not. The main factor studied was the effect of the addition of different concentrations of *S. almeriensis* extract in EVOO's quality (FA, PV, *p*-AV, TOTOX, K_{232} , K_{270} , and ΔK), color parameters (a^* , b^* , L^* , ΔE and YI), fatty acids profile, tocopherols composition (α -, β -, γ -, and total tocopherols), oxidative stability, and pigments composition (lutein and β -carotene). If a statistical significant effect was found, means were compared using Tukey's honestly significant difference multiple comparison test or Dunnett T3 test also depending if equal variances could be assumed or not. All statistical tests were performed at a 5% significance level.

2.10.2. Principal component analysis (PCA)

Principal components analysis (PCA) was applied for reducing the number of variables in the olive oils enriched with different concentration of *S. almeriensis* extract (4 variable corresponding to color parameters – L^* , a^* , b^* , and YI; 5 variables corresponding to the quality parameters – FA, PV, K_{232} , K_{270} and ΔK ; *p*-AV, TOTOX index; 4 variables corresponding to tocopherols, including total vitamin E content (total tocopherols); oxidative stability; lutein and β -carotene contents; with a total of 18 variables) to a smaller number of new derived variables (principal component or factors) that adequately summarize the original information, i.e., the addition of different concentrations of *S. almeriensis* to EVOO's. Moreover, it allowed recognizing patterns in the data by plotting them in a multidimensional space, using the new derived variables as dimensions (factor scores). PCA was performed by using SPSS software, version 21.0 (IBM Corporation, New York, U.S.A.).

2.10.3. Linear discriminant Analysis (LDA)

A linear discriminant analysis (LDA) was used as a supervised learning technique to classify the EVOO's with different concentrations of *S. almeriensis* extract added according to their color and quality parameters, TOTOX, *p*-AV, tocopherols content, fatty acids profile, pigments content, and oxidative stability (32 variables overall). A stepwise technique, using the Wilk's lambda method with the usual probabilities of F (3.84 to enter and 2.71 to remove), was applied for variable selection. This procedure uses a combination of forward selection and backward elimination procedures, where before selecting a new variable to be included, it is verified

whether all variables previously selected remain significant. With this approach, it is possible to identify the significant variables among all variables in study. To verify which canonical discriminant functions were significant, the Wilks' Lambda test was applied. To avoid overoptimistic data modulation, a leaving-one-out cross-validation procedure was carried out to assess the model performance. Moreover, the sensibility and specificity of the discriminant model were computed from the number of individuals correctly predicted as belonging to an assigned group. Sensibility was calculated by dividing the number of samples of a specific group correctly classified by the total number of samples belonging to that specific group. Specificity was calculated by dividing the number of samples of a specific group classified as belonging to that group by the total number of samples of any group classified as belonging to that specific group. The LDA was performed by using the SPSS software, version 21.0 (IBM Corporation, New York, U.S.A.).

3. Results and discussion

3.1. Color parameters

The color of the EVOO's was evaluated to assess the addition of *S. almeriensis* in their appearance, since olive oils visual aspect is an important factor for consumers' evaluation and preference (Gómez-Caravaca et al., 2007). In Table 1 are presented the CIELAB main axes, L^* , a^* and b^* values obtained from EVOO's with different concentrations of *S. almeriensis* extract. In the five olive oils studied its clear the impact of the addition of the extracts. Values of a^* decrease with the concentration of extract added in similar way in the five olive oils, with significant differences observed (Table 1). This means that green coloration, typical of virgin olive oils, pass to a more yellow-orange coloration (Fig. 1). Regarding b^* value its observed an increase in this parameter, mainly with the addition of 0.1 mg of extract per mL of olive oil, since olive oils become more yellow with the addition of *S. almeriensis* extract (Table 1 and Fig. 1). The luminosity (L^*) of olive oils decrease significantly in all samples, being observed a direct proportion between the

concentration of extract and the luminosity observed, which turn olive oils more darker than control olive oils (Fig. 1).

The results obtained in a^* , b^* and L^* showed that *S. almeriensis* extract addition to olive oils brought significant changes in their color, observations corroborated by ΔE parameter (color differences). In Fig. 1 are reported the color differences (Fig. 1A) between olive oils without and with *S. almeriensis* extract and the yellowness index (YI) (Fig. 1B). ΔE values are higher with the amount of extract added to olive oils, which means that color differences with extract increase (Fig. 1). YI increases significantly with extract addition, however, no differences were observed between the addition of 0.1 and 0.21 mg/mL.

The addition of *S. almeriensis* extracts is clearly seen, even at naked eye (Fig. 1). The color adopted by the olive oils is related to extract composition, mainly carotenoids (Cerón et al., 2008), as properly discussed in Section 3.5.

3.2. Quality parameters

The quality of the olive oils was assessed to verify if the addition of *S. almeriensis* extracts cause quality changes. The global observations clearly highlight that no quality degradation is undertaken by extract addition (Table 1). Regarding FA values in four of the five olive oils studied no significant changes were observed, and in one olive oil (olive oil B), extract addition reduce the levels of free fatty acids in the olive oils, but without significant changes between olive oils with extract. Such results are positive, since the addition of extracts does not trigger hydrolytic reactions in the olive oils, maintaining the levels of free fatty acids.

The possible occurrence of oxidative processes in the EVOO's was monitored by several quality parameters (PV, K_{232} , K_{270} , ΔK , and p -AV) reported in Table 1. The peroxidation of the EVOO's is reduced by *S. almeriensis* extracts, since in all olive oils, except olive oil C, a significant decrease in PV was observed. Therefore the formation of primary oxidation products (mainly hydroperoxides) (Laguette, Lecomte, & Villeneuve, 2007) is inhibited, acting the *S. almeriensis* extracts as antioxidants. Specific extinction coefficients at 232 and 270 nm (K_{232} and K_{270} respectively) also corroborate

Table 1
Quality parameters (FA – free acidity; PV – peroxide value), p -anisidine value (p -AV), TOTOX index, and color parameters (a^* , b^* and L^*) of EVOO's without (I) and with *S. almeriensis* extract (II = 0.1 mg/mL; III = 0.21 mg/mL).

Olive oil	Colour parameters			Quality parameters					p -AV	TOTOX
	a^*	b^*	L^*	FA (%)	PV (mEq. O ₂ /kg)	K_{232}	K_{270}	ΔK		
A										
I	-11.77 ± 0.29a	81.95 ± 0.81a	73.95 ± 0.52c	0.3 ± 0.04a	9 ± 1b	0.86 ± 0.15a	0.15 ± 0.02a	-0.003 ± 0.002a	17 ± 1a	35 ± 2a
II	-2.33 ± 0.42b	86.01 ± 1.32b	70.70 ± 0.85b	0.3 ± 0.05a	6 ± 1a	0.83 ± 0.09a	0.15 ± 0.01a	-0.003 ± 0.001a	16 ± 0a	28 ± 3a
III	3.92 ± 0.51c	82.65 ± 0.96a	68.24 ± 0.61a	0.3 ± 0.04a	7 ± 2a	0.94 ± 0.12a	0.19 ± 0.03b	-0.001 ± 0.002a	16 ± 1a	30 ± 4a
B										
I	-12.77 ± 0.27a	81.41 ± 1.46a	75.60 ± 1.01c	0.2 ± 0.00a	9 ± 1b	0.94 ± 0.17a	0.13 ± 0.02a	-0.002 ± 0.005a	12 ± 0a	30 ± 2b
II	-3.08 ± 0.45b	86.39 ± 2.23c	70.96 ± 1.38b	0.2 ± 0.00a	6 ± 1a	0.86 ± 0.18a	0.12 ± 0.01a	-0.005 ± 0.002a	13 ± 1a	24 ± 2a
III	3.35 ± 0.36c	83.89 ± 1.49b	69.01 ± 0.89a	0.2 ± 0.00a	6 ± 0a	1.17 ± 0.55a	0.16 ± 0.01b	-0.003 ± 0.004a	13 ± 1 a	25 ± 1a
C										
I	-13.13 ± 0.76a	73.24 ± 2.39a	78.53 ± 0.85c	0.3 ± 0.00a	9 ± 0a	0.84 ± 0.07a	0.18 ± 0.02a	-0.001 ± 0.003a	13 ± 1a	32 ± 0b
II	-1.28 ± 1.10b	89.40 ± 1.56b	72.93 ± 1.01b	0.3 ± 0.00a	8 ± 0a	0.88 ± 0.03a,b	0.21 ± 0.02a,b	-0.007 ± 0.008a	14 ± 1a	31 ± 0b
III	5.42 ± 1.09c	88.15 ± 0.56c	71.58 ± 0.34a	0.3 ± 0.00a	8 ± 1a	0.92 ± 0.04b	0.24 ± 0.03b	-0.003 ± 0.002a	13 ± 1a	30 ± 1a
D										
I	-11.77 ± 0.37a	82.34 ± 1.08a	74.85 ± 0.82c	0.2 ± 0.00a	9 ± 0b	0.82 ± 0.05a	0.13 ± 0.01a	-0.003 ± 0.001a	15 ± 1a	33 ± 1b
II	-3.48 ± 0.21 b	85.87 ± 2.02b	70.96 ± 1.01b	0.2 ± 0.00 a	6 ± 1a	0.84 ± 0.04a	0.15 ± 0.02a,b	-0.004 ± 0.002a	16 ± 1a	27 ± 2a
III	2.36 ± 0.46c	85.17 ± 1.23c	69.87 ± 0.76a	0.2 ± 0.04a	6 ± 1a	0.81 ± 0.05a	0.16 ± 0.01b	-0.002 ± 0.001a	16 ± 1a	28 ± 1a
E										
I	-14.15 ± 0.04a	71.48 ± 2.12a	81.34 ± 0.61c	0.3 ± 0.00a	8 ± 1b	1.00 ± 0.07a	0.13 ± 0.02a	-0.003 ± 0.001a	14 ± 1a	29 ± 1a
II	-5.38 ± 0.20b	95.20 ± 0.38c	77.49 ± 0.26b	0.3 ± 0.05a	5 ± 1a	0.93 ± 0.08a	0.13 ± 0.02a	-0.009 ± 0.017a	14 ± 1a	24 ± 2b
III	0.85 ± 0.83c	93.58 ± 0.81b	75.13 ± 0.58a	0.3 ± 0.00a	5 ± 1a	1.01 ± 0.03a	0.16 ± 0.01b	-0.002 ± 0.002a	14 ± 1a	24 ± 1b

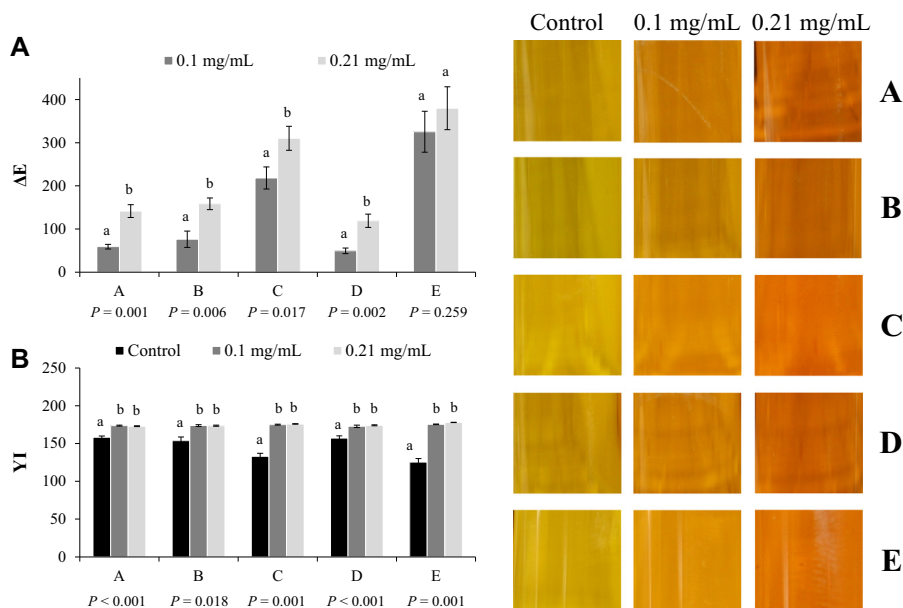


Fig. 1. Color differences (ΔE) (A) and yellowness index (YI) (B) between EVOO's with and without *S. almeriensis* extract. In each olive oil mean values with different letters differ significantly ($P < 0.05$). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

that extracts addition does not affect olive oils quality. In K_{232} and ΔK no significant changes were observed in the olive oils, however the addition of extracts to olive oil increase significantly K_{270} values. K_{270} is indicative of the formation of secondary products of oxidation, meanwhile, and by evaluating the values obtained in p -AV, we clearly conclude that the addition of extracts does not inflict secondary oxidation in olive oils, and those results obtained in K_{270} could be related with the color conferred to olive oils by the extracts. According to Malheiro, Casal, Ramalhosa, and Pereira (2011) p -AV is an empirical determination used to assess advanced oxidative rancidity of vegetable oils. The analytical method is based on the reactivity of the aldehyde carbonyl bond on the p -anisidine amine groups, leading to the formation of Schiff base that absorbs at 350 nm. It allows the estimation of secondary products of oxidation of unsaturated fatty acids, principally dienes and 2-alkenals (Labrinea, Thomaidis, & Georgiou, 2001). Therefore, by studying the data obtained in quality parameters (Table 1) of the EVOO's studied is clear that extracts addition inflicts neither primary (PV and K_{232}) nor secondary (p -AV) oxidative reactions. In fact the addition is positive since a lower formation of hydroperoxides is observed and the overall quality of EVOO's increase, as observed in TOTOX value (Table 1). TOTOX value is a useful tool when assessing the oxidative deterioration of vegetable oils, being also reported as the total oxidation value according to ISO 6885 (2006). In the five olive oils analyzed, only in olive oil A no significant decreases in TOTOX value were observed. The remaining olive oils reported lower oxidative deterioration with extracts addition. Lower TOTOX values were reported in comparison to those obtained in Italian EVOO and OO (olive oil) (Cerretani, Bendini, Rodriguez-Estrada, Vittadini, & Chiavaro, 2009).

Regarding all the values obtained in the quality parameters of the olive oils with and without *S. almeriensis* extracts, all oils could be classified as EVOO's according to the European Communitarian legislation (Commission Implementing Regulation (EU), No. 299/2013).

3.3. Fatty acids profile

Fatty acids profile of EVOO's without and with different concentrations of *S. almeriensis* extracts are reported in Table 2. The fatty acids profile of the five EVOO's is mainly composed by oleic acid

($C_{18:1}$), followed by palmitic acid ($C_{16:0}$) and linoleic acid ($C_{18:2}$). In the EVOO's studied the addition of *S. almeriensis* extracts didn't brought significant changes in the fatty acids profile, except in some specific situations. In two olive oils (B and E) the content of palmitic acid increase significantly, while in olive oil C the same was observed regarding linoleic acid. The contents of linolenic acid ($C_{18:3}$) in olive oils B and D increase considerably with statistical meaning (Table 2). Concerning the different fatty acids fractions that compose the studied olive oils, as expected due to the high contents in oleic acid, MUFA (monounsaturated fatty acids) were the most abundant (>77%), followed by SFA (saturated fatty acids) between 14.40% and 17.15%, and by PUFA (polyunsaturated fatty acids) with values ranging from 3.59% and 4.70% (Table 2). *Trans* fatty acids were always equal or inferior to 0.05% (Table 2).

3.4. Tocopherols composition

Tocopherols detailed composition of the EVOO's with different concentrations of *S. almeriensis* extracts is reported in Table 3. In the five olive oils analyzed, three tocopherols were detected and quantified: α -, β -, and γ -tocopherol. α -Tocopherol was present in higher amounts, as expected for olive oils (Malheiro, Casal, Lamas, Bento, & Pereira, 2012), with contents ranging from 119 to 429 mg/kg in control olive oils. β -Tocopherol values were between 4 and 6 mg/kg while γ -tocopherol ranged from 40 to 55 mg/kg in all samples studied (Table 3). Total tocopherols amount varied from 159 mg/kg (olive oil C in control samples) to 511 mg/kg (olive oil B with 0.1 mg/mL). The addition of *S. almeriensis* extracts does not affect considerably total tocopherols amount as well as individual tocopherols, except in some particular cases (Table 3). These observations are in accordance with the observed absence of tocopherols in the *S. almeriensis* extract. Since tocopherols, mainly α -tocopherol, possess important antioxidant and vitaminic action, the fact that the addition of *S. almeriensis* do not compromise their content is a good aspect, since both important biological properties are preserved in the olive oils.

3.5. Pigments composition

Analysis carried out by HPLC in the *S. almeriensis* extracts, prior to the inclusion in the EVOO's, supported its richness in

Table 2
Detailed fatty acids composition (g/100 g of fatty acids) of EVOO's without (I) and with *S. almeriensis* extract (II = 0.1 mg/mL; III = 0.21 mg/mL).

Olive oil	C _{16:0}	C _{16:1}	C _{17:1}	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	C _{20:0}	C _{18:3}	C _{20:1}	C _{22:0}	SFA	MUFA	PUFA	Trans
A														
I	11.76 ± 0.45a	0.79 ± 0.06a	0.10 ± 0.02a	2.87 ± 0.26a	78.09 ± 0.84a	3.46 ± 0.44a	0.37 ± 0.02a	0.57 ± 0.03a	0.24 ± 0.01a	0.09 ± 0.02a	15.24 ± 0.56a	79.22 ± 0.85a	4.02 ± 0.41a	0.04 ± 0.01a
II	11.35 ± 0.44a	0.77 ± 0.01a	0.10 ± 0.00a	2.60 ± 0.23a	79.32 ± 0.61a	3.18 ± 0.04a	0.35 ± 0.01a	0.58 ± 0.00a	0.22 ± 0.00a	0.11 ± 0.00a	14.52 ± 0.66a	80.42 ± 0.61a	3.76 ± 0.05a	0.02 ± 0.00a
III	11.07 ± 0.37a	0.80 ± 0.01a	0.10 ± 0.00a	2.74 ± 0.06a	79.21 ± 0.36a	3.30 ± 0.01a	0.35 ± 0.01a	0.60 ± 0.00a	0.22 ± 0.00a	0.11 ± 0.01a	14.40 ± 0.45a	80.34 ± 0.36a	3.9 ± 0.01a	0.02 ± 0.01a
B														
I	11.43 ± 0.64a	1.33 ± 0.03a	0.11 ± 0.00a	2.41 ± 0.32a	77.67 ± 0.66a	3.58 ± 0.12a	0.36 ± 0.01a	0.77 ± 0.02a	0.25 ± 0.01a	0.12 ± 0.02a	14.45 ± 0.95a	79.35 ± 0.69b	4.35 ± 0.13a	0.04 ± 0.01b
II	12.01 ± 0.27ab	1.36 ± 0.06a	0.10 ± 0.00a	2.29 ± 0.17a	77.33 ± 0.14a	3.73 ± 0.04a	0.37 ± 0.01a	0.81 ± 0.01b	0.25 ± 0.00a	0.11 ± 0.02a	14.92 ± 0.13ab	79.04 ± 0.08ab	4.54 ± 0.04a	0.01 ± 0.00ab
III	13.00 ± 0.78b	1.34 ± 0.03a	0.11 ± 0.01a	2.71 ± 0.16a	76.22 ± 0.71a	3.73 ± 0.08a	0.36 ± 0.01a	0.80 ± 0.01ab	0.25 ± 0.00a	0.10 ± 0.00a	16.30 ± 0.65b	77.91 ± 0.69a	4.53 ± 0.08a	0.03 ± 0.01a
C														
I	10.85 ± 0.56a	0.88 ± 0.02a	0.10 ± 0.01a	2.99 ± 0.17a	78.77 ± 0.58a	3.56 ± 0.08a	0.34 ± 0.01a	0.63 ± 0.05a	0.22 ± 0.02a	0.11 ± 0.02a	14.42 ± 0.72a	79.96 ± 0.58a	4.19 ± 0.10a	0.05 ± 0.02a
II	11.22 ± 0.34a	0.93 ± 0.09a	0.13 ± 0.04a	2.86 ± 0.18a	78.69 ± 0.25a	3.66 ± 0.05ab	0.38 ± 0.04a	0.60 ± 0.03a	0.27 ± 0.06a	0.11 ± 0.01a	14.73 ± 0.53a	80.02 ± 0.14a	4.26 ± 0.03ab	0.04 ± 0.01a
III	11.35 ± 0.11a	0.90 ± 0.04a	0.10 ± 0.00a	2.94 ± 0.05a	78.73 ± 0.09a	3.73 ± 0.03b	0.35 ± 0.01a	0.63 ± 0.01a	0.23 ± 0.00a	0.10 ± 0.00a	14.86 ± 0.05a	79.96 ± 0.12a	4.36 ± 0.04b	0.04 ± 0.01a
D														
I	13.36 ± 0.74a	1.17 ± 0.02a	0.11 ± 0.03a	2.28 ± 0.10a	77.09 ± 1.01a	2.94 ± 0.05a	0.33 ± 0.02a	0.65 ± 0.02a	0.24 ± 0.02a	0.10 ± 0.01a	16.19 ± 0.78a	78.61 ± 1.03a	3.59 ± 0.07a	0.05 ± 0.03a
II	13.14 ± 0.52a	1.16 ± 0.01a	0.10 ± 0.00a	2.32 ± 0.10a	77.33 ± 0.24a	3.07 ± 0.11a	0.35 ± 0.03a	0.69 ± 0.01ab	0.24 ± 0.00a	0.11 ± 0.01a	16.05 ± 0.44a	78.84 ± 0.24a	3.77 ± 0.11a	0.02 ± 0.01a
III	12.18 ± 0.71a	1.17 ± 0.04a	0.10 ± 0.00a	2.27 ± 0.13a	78.29 ± 0.74a	3.31 ± 0.05a	0.34 ± 0.01a	0.74 ± 0.03b	0.24 ± 0.01a	0.10 ± 0.01a	15.02 ± 0.68a	79.82 ± 0.77a	4.05 ± 0.08b	0.04 ± 0.02a
E														
I	12.17 ± 0.64a	1.18 ± 0.40a	0.08 ± 0.03a	3.16 ± 0.26a	76.94 ± 0.76a	3.85 ± 0.20a	0.36 ± 0.01a	0.63 ± 0.03a	0.22 ± 0.03a	0.11 ± 0.01a	15.94 ± 0.88a	78.41 ± 0.42a	4.48 ± 0.23a	0.04 ± 0.03a
II	11.92 ± 0.87ab	0.94 ± 0.01a	0.09 ± 0.00a	2.98 ± 0.03a	77.19 ± 0.74a	4.03 ± 0.06a	0.37 ± 0.01a	0.67 ± 0.01a	0.24 ± 0.01a	0.11 ± 0.00a	15.52 ± 0.86a	78.47 ± 0.72a	4.70 ± 0.07a	0.04 ± 0.02a
III	13.55 ± 0.26b	0.96 ± 0.05a	0.09 ± 0.01a	3.02 ± 0.14a	76.04 ± 0.39a	3.98 ± 0.06a	0.35 ± 0.02a	0.67 ± 0.02a	0.23 ± 0.01a	0.10 ± 0.01a	17.15 ± 0.42a	77.32 ± 0.41a	4.65 ± 0.08a	0.03 ± 0.01a

carotenoids, with β-carotene representing 13.3% of total extract, followed by 0.25% of lutein and 1% of other unidentified carotenoids. Spectrophotometric analyses corroborated the previous results, with an average of 14.4% of total carotenoid-like compounds in the *S. almeriensis* extracts.

The pigments composition of the five EVOO's with and without extracts of *S. almeriensis* is displayed in Fig. 2. From the results obtained is observed that *S. almeriensis* extracts are mainly rich in carotenoids, β-carotene and lutein, the first one being the major component. In the five EVOO's analyzed, lutein content in control olive oils varied from 4.5 to 6.3 mg/kg (Fig. 2B). The addition of *S. almeriensis* extracts increases considerably lutein content in olive oils (except olive oil B). The increase of lutein with 0.1 mg/mL was only statistically significant in oils A and C, while the addition of 0.21 mg/mL was significant in olive oils A, C and D in comparison with the control. Therefore the addition of 0.1 mg/mL would be the best option in order to improve lutein content in olive oils. Meanwhile, we observed that the extracts of *S. almeriensis* are highly rich in other carotenoid, β-carotene (Fig. 2A). β-carotene content in control olive oils varied between 1.2 (olive oil C) and 4.1 mg/kg (olive oil D). When we added 0.1 mg/mL, β-carotene increase 6.5, 6.0, 11.1, 4.4, and 8.3 times in olive oils from A to E, respectively. With an addition of 0.21 mg/mL β-carotene content increased 9 times in olive oil D and 25.8 times in olive oil C. β-carotene content in olive oils with 0.21 mg/mL varied between 30.1 and 37.1 mg/kg (olive oil B and D respectively; Fig. 2A). Comparatively to EVOO's enriched with olive leaves during extraction process (Malheiro, Casal, Teixeira, Bento, & Pereira, 2013b), EVOO's with *S. almeriensis* report lower lutein content but much higher β-carotene, resulting from extract addition, without the significant increment in chlorophylls and pheophytins as observed with olive leaves addition during extraction process, regarded as potentially reducing olive oil photostability.

Such increment in carotenoids caused significant changes in olive oils color and quality as witnessed in Sections 3.1 and 3.2 of the present manuscript and in Fig. 1 and Table 1.

3.6. Oxidative stability

The oxidative stability of olive oils was assessed in order to verify if the addition of *S. almeriensis* extracts could display antioxidant, pro-oxidant or no activity in the EVOO's. The results obtained are presented in Fig. 2C and they clearly show that *S. almeriensis* extracts act as antioxidants, protecting olive oils from oxidation. A significant increase in resistance to oxidation was verified in all olive oils. Meanwhile, by adding 0.21 mg of extract per mL of olive oil no significant increases in oxidative stability were observed comparatively to the addition of 0.1 mg/mL (except olive oil D). From this observation we could infer the addition of 0.21 mg/mL of *S. almeriensis* extracts to olive oil could be excessive since no further improvements were observed, and could also possibly act as prooxidants. The addition of 0.1 mg/mL increased oxidative stability of olive oils from 11.85% (olive oil C) to 37.80% (olive oil A), while 0.21 mg/mL raised oxidative stability between 15.76% (olive oil C) and 42.06% (olive oil B). The increase in the oxidative stability is related to the composition of the extracts of *S. almeriensis*, especially rich in β-carotene. β-carotene is a recognized antioxidant compound (Sies & Stahl, 1995), and according to Aparicio, Roda, Albi, and Gutiérrez (1999), in normal conditions, carotenoids are responsible for about 6% of olive oils stability. In this kind of olive oils, with the great amounts of β-carotene in the olive oils, carotenoids contribution to oxidative stability is greatly increased. Such observations are important since shelf-life of olive oils could be considerably increased, being interesting to study the impact and stabilization of olive oils with *S. almeriensis* extracts during storage period and thermal processing.

Table 3

Tocopherols composition (mg/kg of olive oil) of EVOO's without (I) and with *S. almeriensis* extract (II = 0.1 mg/mL; III = 0.21 mg/mL).

Olive Oil	α -Tocopherol	β -Tocopherol	γ -Tocopherol	Total tocopherols
A				
I	257 ± 6.1 a	4.9 ± 0.1 a	50 ± 0.9 b	312 ± 6.8 a
II	273 ± 1.2 b	4.7 ± 0.2 a	50 ± 0.1 b	328 ± 1.8 b
III	261 ± 4.4 a	4.5 ± 0.1 a	46 ± 0.4 a	311 ± 4.6 a
B				
I	429 ± 9.8 a	5.7 ± 0.2 a	55 ± 2.4 a	489 ± 11.4 a
II	451 ± 20.3 a	5.5 ± 0.3 a	54 ± 1.9 a	511 ± 20.2 a
III	435 ± 5.2 a	5.4 ± 0.1 a	52 ± 2.5 a	492 ± 6.7 a
C				
I	119 ± 21.4 a	4.1 ± 0.1 a	44 ± 3.5 a	159 ± 24.7 a
II	121 ± 19.9 a	4.1 ± 0.0 a	42 ± 2.8 a	168 ± 22.6 a,b
III	137 ± 20.6 a	4.2 ± 0.1 a	42 ± 3.3 a	183 ± 24.0 b
D				
I	336 ± 25.8 a	5.2 ± 0.1 b	42 ± 5.1 a	383 ± 30.8 a
II	330 ± 26.5 a	5.0 ± 0.2 a,b	40 ± 5.0 a	376 ± 31.5 a
III	334 ± 31.7 a	4.7 ± 0.2 a	39 ± 4.3 a	378 ± 35.6 a
E				
I	297 ± 2.6 a	5.0 ± 0.1 a	51 ± 0.6 b	353 ± 3.2 a
II	297 ± 2.0 a	4.9 ± 0.1 a	49 ± 0.6 a,b	351 ± 2.6 a
III	307 ± 11.7 a	4.8 ± 0.1 a	49 ± 1.4 a	360 ± 13.2 a

3.7. Olive oils discrimination by *Scenedesmus almeriensis* extract addition

Scenedesmus almeriensis extracts addition at different concentrations clearly affected color, quality, composition and oxidative stability of EVOO's in a way that it was possible to discriminate them according to the concentration of extract added in each olive

oil. In Fig. 3A is shown the two-dimensional representation of the two principal component factor scores that explain 58.61% of the total variance of the data obtained. It is perceived that the first principal component (PC1) separates control EVOO's (without extracts) from olive oils with *S. almeriensis* extracts. Control EVOO's, represented in the entire negative region of PC1 (Fig. 3A), were characterized by worst quality indexes (PV, FA, and TOTOX value), while EVOO's with 0.1 and 0.21 mg/mL, mainly represented in the positive region of PC1, are associated with higher values in color parameters (a^* , b^* , L^* , ΔE , and YI – Table 1 and Fig. 1), higher lutein and β -carotene content (Fig. 2A and B), and higher oxidative stability (Fig. 2C).

Together with the unsupervised PCA method, a stepwise linear discriminant analysis (LDA) was applied to the obtained data in order to create a discriminant model. The model obtained resulted in seven significant discriminant functions that explained 100% of the variance, although only the first two were used, since they explain 89.3% of the variance of the experimental data (Function 1 52.8% and Function 2 36.5%; Fig. 3B). From the initial 32 variables, the model was created and based in 7 variables: b^* , L^* , YI, β -carotene, lutein, α -tocopherol and γ -tocopherol. Once more, chemometrics proved that extracts addition have an important effect in the EVOO's color descendent from pigments content in a way that is possible to correctly classify samples. The model showed an extremely satisfactory performance since it allowed classifying correctly all samples according to the olive oil they belong and to the correct concentration of *S. almeriensis* added. The same results were observed for the cross-validation procedure (sensitivities and specificities of 100%), showing that the classification of the original groups was not overestimated. In Fig. 3B is possible to observe that the discriminant functions separate EVOO's accordingly to the concentration of *S. almeriensis* extracts added, and among the same concentration is even possible to separate

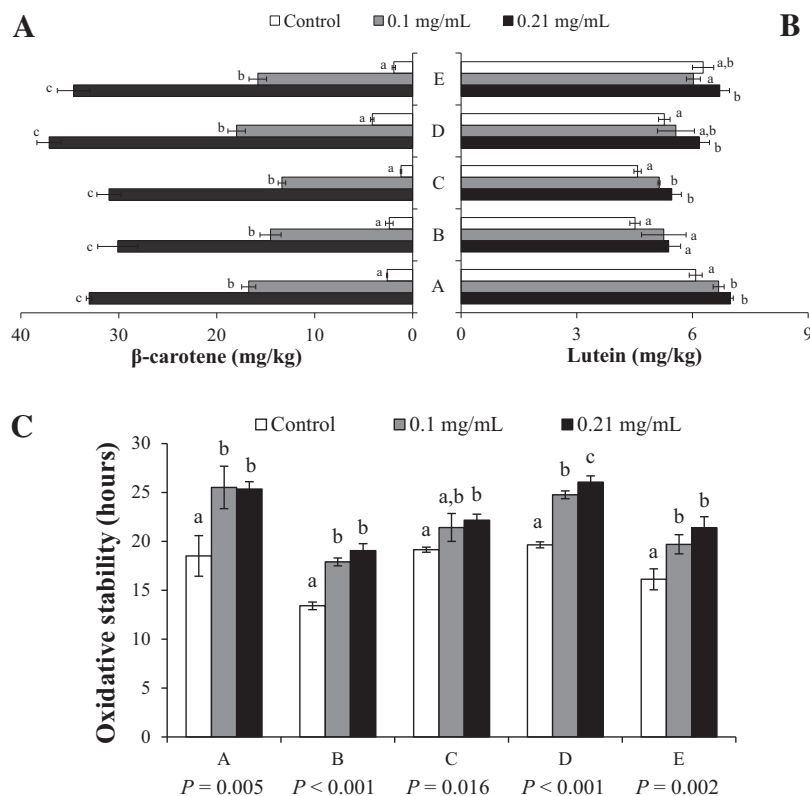


Fig. 2. β -Carotene (mg/kg; A), lutein (mg/kg; B) and oxidative stability (hours; C) of EVOO's without (I) and with *S. almeriensis* extract (II = 0.1 mg/mL; III = 0.21 mg/mL). In each olive oil mean values with different letters differ significantly ($P < 0.05$).

Support from the European Union (FEDER funds through COM-PETE) and FCT through project Pest-C/EQB/LA0006/2012 is also acknowledged. This manuscript is part of Piedad Limón Ph.D. dissertation.

References

- Achir, N., Randrianatoandro, V. A., Bohuon, P., Laffargue, A., & Avallone, S. (2010). Kinetic study of β -carotene and lutein degradation in oils during heat treatment. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *112*, 349–361.
- Ación, F. G., Fernández-Sevilla, J. M., Magán, J. J., & Molina-Grima, E. (2012). Production cost of a real microalgae production plant and strategies to reduce it. *Biotechnology Advances*, *30*, 1344–1353.
- Aparicio, R., Roda, L., Albi, M. A., & Gutiérrez, F. (1999). Effect of various compounds on virgin olive oil stability measured by Rancimat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*, 4150–4155.
- Block, G., Patterson, B., & Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: A review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, *18*, 1–29.
- Camacho, F. G., Rodríguez, J. G., Mirón, A. S., García, M. C. C., Belarbi, E. H., Chisti, Y., et al. (2007). Biotechnological significance of toxic marine dinoflagellates. *Biotechnology Advances*, *25*, 176–194.
- CDC (Centers for Disease Control and Prevention) (2013). "State Indicator Report on Fruits and Vegetables 2013" from the Division of Nutrition, Physical Activity, and Obesity of the National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion.
- Cerón, M. C., Campos, I., Sánchez, J. F., Ación, F. G., Molina, E., & Fernández-Sevilla, J. M. (2008). Recovery of lutein from microalgae biomass: Development of a process for *Scenedesmus almeriensis* biomass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 11761–11766.
- Cerretani, L., Bendini, A., Rodriguez-Estrada, M. T., Vittadini, E., & Chiavaro, E. (2009). Microwave heating of different commercial categories of olive oil: Part I. Effect on chemical oxidative stability indices and phenolic compounds. *Food Chemistry*, *115*, 1381–1388.
- Commission Implementing Regulation (EU), No. 299/2013: Amending Regulation (EEC) No. 2568/91 on the characteristics of olive oil and olive-residue oil and on the relevant methods of analysis. *Official Journal of the European Union*.
- Commission Regulation (1991). (EEC) No. 2568/91: On the characteristics of olive oil and olive-pomace oil and on the relevant methods of analysis. *Official Journal of European Union*, *L248*, 1–82.
- Duyn, M. A. S. V., & Pivonka, E. (2000). Overview of the health benefits of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: Selected literature. *Journal of the American Dietetic Association*, *100*, 1511–1521.
- European Food Information Council (EUFIC) (2012). EUFIC Review. Fruit and vegetable consumption in Europe – do Europeans get enough? Available at: <<http://www.eufic.org/article/en/expid/Fruit-vegetable-consumption-Europe/>> Accessed at 23.02.14.
- Fernández-Sevilla, J. M., Ación Fernández, F. G., & Molina Grima, E. (2010). Biotechnological production of lutein and its applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *86*, 27–40.
- García-González, M., Moreno, J., Manzano, J. C., Florencio, F. J., & Guerrero, M. G. (2005). Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- β -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology*, *115*, 81–90.
- Gaziano, J. M., Manson, J. E., Branch, L. G., Colditz, G. A., Willett, W. C., & Buring, J. E. (1995). A prospective study of consumption of carotenoids in fruits and vegetables and decreased cardiovascular mortality in the elderly. *Annals of Epidemiology*, *5*, 255–260.
- Gómez-Caravaca, A. M., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Lercker, G. (2007). Effect of filtration systems on the phenolic content in virgin olive oil by HPLC-DAD-MSD. *American Journal of Food Technology*, *2*, 671–678.
- Granado, F., Olmedilla, B., & Blanco, I. (2003). Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *British Journal of Nutrition*, *90*, 487–502.
- Granado-Lorencio, F., Herrero-Barbudo, C., Ación-Fernández, G., Molina-Grima, E., Fernández-Sevilla, J. M., Pérez-Sacristán, B., et al. (2009). *In vitro* bioaccessibility of lutein and zeaxanthin from the microalgae *Scenedesmus almeriensis*. *Food Chemistry*, *114*, 747–752.
- International Olive Council (IOC) (2013). World olive oil figures – production. Available at: <<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>> Accessed 11.02.14.
- International Olive Council (IOC) (2013). World olive oil figures – consumption. Available at: <<http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures>> Accessed 11.02.2014.
- ISO 6885 (2006). Animal and vegetable fats and oils – Determination of anisidine value.
- ISO 9936 (2006). Animal and vegetable fats and oils – Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography.
- Kimmons, J., Gillespie, C., Seymour, J., Serdula, M., & Blanck, H. M. (2009). Fruit and vegetable intake among adolescents and adults in the United States: Percentage meeting individualized recommendations. *The Medscape Journal of Medicine*, *11*, 26.
- Labrinea, E. P., Thomaidis, N. S., & Georgiou, C. A. (2001). Direct olive oil anisidine value determination by flow injection. *Analytica Chimica Acta*, *448*, 201–206.
- Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. (2007). Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. *Progress in Lipid Research*, *46*, 244–282.
- Malheiro, R., Casal, S., Lamas, H., Bento, A., & Pereira, J. A. (2012). Can tea extracts protect extra virgin olive oil from oxidation during microwave heating? *Food Research International*, *48*, 148–154.
- Malheiro, R., Casal, S., Ramalhosa, E., & Pereira, J. A. (2011). Microwave heating: A time saving technology or a way to induce vegetable oils oxidation? In S. Grundas (Ed.), *Advances in induction and microwave heating of mineral and organic materials* (pp. 597–614). Rijeka: Croatia.
- Malheiro, R., Casal, S., Teixeira, H., Bento, A., & Pereira, J. A. (2013b). Effect of olive leaves addition during the extraction process of overmature fruits on olive oil quality. *Food and Bioprocess Technology*, *6*, 509–521.
- Malheiro, R., Rodrigues, N., Manzke, G., Bento, A., Balmes, J., Cullen, M. R., & Casal, S. (2013a). The use of olive leaves and tea extracts as effective antioxidants against the oxidation of soybean oil under microwave heating. *Industrial Crops and Products*, *44*, 37–43.
- Morita, M., Watanabe, Y., & Saiki, H. (2002). Photosynthetic productivity of conical helical tubular photobioreactor incorporating *Chlorella sorokiniana* under field conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, *77*, 155–162.
- Nishino, H. (1998). Cancer prevention by carotenoids. *Mutation research/fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, *402*, 159–163.
- Omenn, G. S., Goodman, G. E., Thornquist, M. D., Balmes, J., Cullen, M. R., Glass, A., et al. (1996). Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *The New England Journal of Medicine*, *334*, 1150–1155.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) (2013). Health at a glance 2013. OECD indicators.
- Ozawa, Y., Sasaki, M., Takahashi, N., Kamoshita, M., Miyake, S., & Tsubota, K. (2012). Neuroprotective effects of lutein in the retina. *Current Pharmaceutical Design*, *18*, 51–56.
- Peterson, J. J., Dwyer, J. T., Jacques, P. F., & McCullough, M. L. (2012). Associations between flavonoids and cardiovascular disease incidence or mortality in European and US populations. *Nutrition Reviews*, *70*, 491–508.
- Pomerleau, J., Lock, K., Knai, C., & McKee, M. (2004). Effectiveness of interventions and programmes promoting fruit and vegetable intake. Background paper for the joint FAO/WHO workshop on fruit and vegetables for health. p. 133.
- Sánchez, J. F., Fernández, J. M., Ación, F. G., Rueda, A., Pérez-Parra, J., & Molina, E. (2008a). Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochemistry*, *43*, 398–405.
- Sánchez, J. F., Fernández-Sevilla, J. M., Ación, F. G., Cerón, M. C., Pérez-Parra, J., & Molina-Grima, E. (2008b). Biomass and lutein productivity of *Scenedesmus almeriensis*: Influence of irradiance, dilution rate and temperature. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *79*, 719–729.
- Seddon, J. M., Ajani, U. A., Sperduto, R. D., Hiller, R., Blair, N., Burton, T. C., et al. (1994). Dietary carotenoids, vitamins A, C, and E, and advanced age-related macular degeneration. *JAMA*, *272*, 1413–1420.
- Sies, H., & Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *62*, 1315S–1321S.
- Teikari, J. M., Laatikainen, L., Virtamo, J., Haukka, J., Rautalahti, M., Liesto, K., et al. (1998). Six-year supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene and age-related maculopathy. *Acta Ophthalmologica Scandinavica*, *76*, 224–229.
- Tennant, D. R., Davidson, J., & Day, A. J. (2014). Phytonutrient intakes in relation to European fruit and vegetable consumption patterns observed in different food surveys. *British Journal of Nutrition*, *112*, 1214–1225.
- Veer, P., Jansen, M. C. J. F., Klerk, M., & Kok, F. J. (2000). Fruits and vegetables in the prevention of cancer and cardiovascular disease. *Public Health Nutrition*, *3*, 103–107.
- World Health Organization (2014). Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health. Promoting fruit and vegetable consumption around the world. Available at: <<http://www.who.int/dietphysicalactivity/fruit/en/>> Accessed 23.02.2014.
- Yen, H., Sun, C., & Ma, T. (2011). The comparison of lutein production by *Scenedesmus* sp. in the autotrophic and the mixotrophic cultivation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *164*, 353–361.
- Zamora, R., Olmo, C., Navarro, J. L., & Hidalgo, F. J. (2004). Contribution of phospholipid pyrolyzation of the color reversion produced during deodorization of poorly degummed vegetable oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*, 4166–4171.



CAPÍTULO DE LIBRO

AUTORES: Ruperto Bermejo, Piedad Limón, José M. Fernández y F. Gabriel Acién.

TÍTULO: Aceites de oliva virgen enriquecidos en nuevos antioxidantes procedentes de microalgas para la prevención de enfermedades degenerativas.

REF. LIBRO: (Eds. Castillo de Canena Olive Juice S.L.) Gráficas La Paz, Jaén-Spain (2014)

ISBN: 978-84-617-2115-3.

ACEITES DE OLIVA VIRGEN ENRIQUECIDOS CON NUEVOS ANTIOXIDANTES PROCEDENTES DE MICROALGAS PARA PREVENCIÓN DE ENFERMEDADES DEGENERATIVAS

Ruperto Bermejo¹, Piedad M. Limón¹, José M. Fernández² y F. Gabriel Acién²

¹Departamento de Química Física y Analítica, Escuela Politécnica Superior de Linares, Alfonso X El Sabio, 28, Universidad de Jaén, Linares 23700

²Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería

Ruperto Bermejo Román es Doctor en Ciencias Químicas y actualmente es Profesor Titular de Universidad en el Área de conocimiento de Química Física de la Universidad de Jaén. Pertenece al Grupo de Investigación PAIDI “Estructura y Dinámica de sistemas Químicos, FQM-337”. Así mismo, es Subdirector de Relaciones Institucionales e Infraestructuras de Investigación de la Escuela Politécnica Superior de Linares.

F. Gabriel Acién Fernández es Doctor en Ciencias Químicas y actualmente es Profesor Titular de Universidad en el área de Ingeniería Química de la Universidad de Almería. Pertenece al Grupo de Investigación PAIDI “Biotecnología de microalgas marinas, BIO-173”.

José M. Fernández Sevilla es Doctor en Ciencias Químicas y actualmente es Profesor Titular de Universidad en el área de Ingeniería Química de la Universidad de Almería. Pertenece al Grupo de Investigación PAIDI “Bioprocesos y tecnologías del agua, BIO-263”.

Piedad M. Limón Villarejo es Ingeniero Técnico Industrial (Especialidad Química Industrial) y ha realizado el Máster Oficial en Olivar, Aceite de Oliva y Salud, ambos títulos obtenidos en la Universidad de Jaén. Actualmente se encuentra finalizando sus estudios de Tercer Ciclo (Doctorado), adscrita al área de Química Física, dentro del Grupo de Investigación FQM-337.



COMUNICACIONES EN CONGRESOS

Autores: R. Gavara, A. M. Diniz, Y. Leydet, J. C. Lima, P. M. Limón, A. J. Parola, V. Petrov, A. Quintas y F. Pina.

Título: Studies of self-aggregation and co-pigmentation involving anthocyanidin 3-glucosides.

Tipo de participación: Comunicación (Póster)

Congreso: Conference: European Winter School on Physical Organic Chemistry (e-WISPOC)

Lugar celebración: Bressanone (Italy)

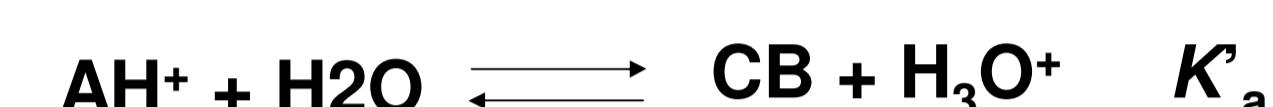
Fecha: 2013

Introduction

Anthocyanins are the natural compounds responsible for most of the red to blue colors of flowers and fruits.¹ However, they present a pH dependent network of chemical reactions in water that provokes, at low concentrations, the loss of color at moderately acidic pH values (see Scheme 1 for Oenin).² The pH of vacuoles, where anthocyanins are located in plants, changes roughly from 3 to 6,³ and therefore, Nature should find some mechanisms for the stabilization of color. Two important mechanisms are auto-association and co-pigmentation with other compounds. Here we present a summary about our studies on the self-aggregation of the six most common anthocyanidin 3-glucosides.^{4,5} Additionally, results about the co-pigmentation involving Kuromanin and caffeine as a co-pigment are as well presented.⁶

Scheme 1. Network of chemical reactions represented for Oenin

Global acid-base equilibrium



$$[\text{CB}] = [\text{A}] + [\text{B}] + [\text{Cc}] + [\text{Ct}]$$

$$K'_a = K_a + K_h + K_h K_t + K_h K_t K_i$$

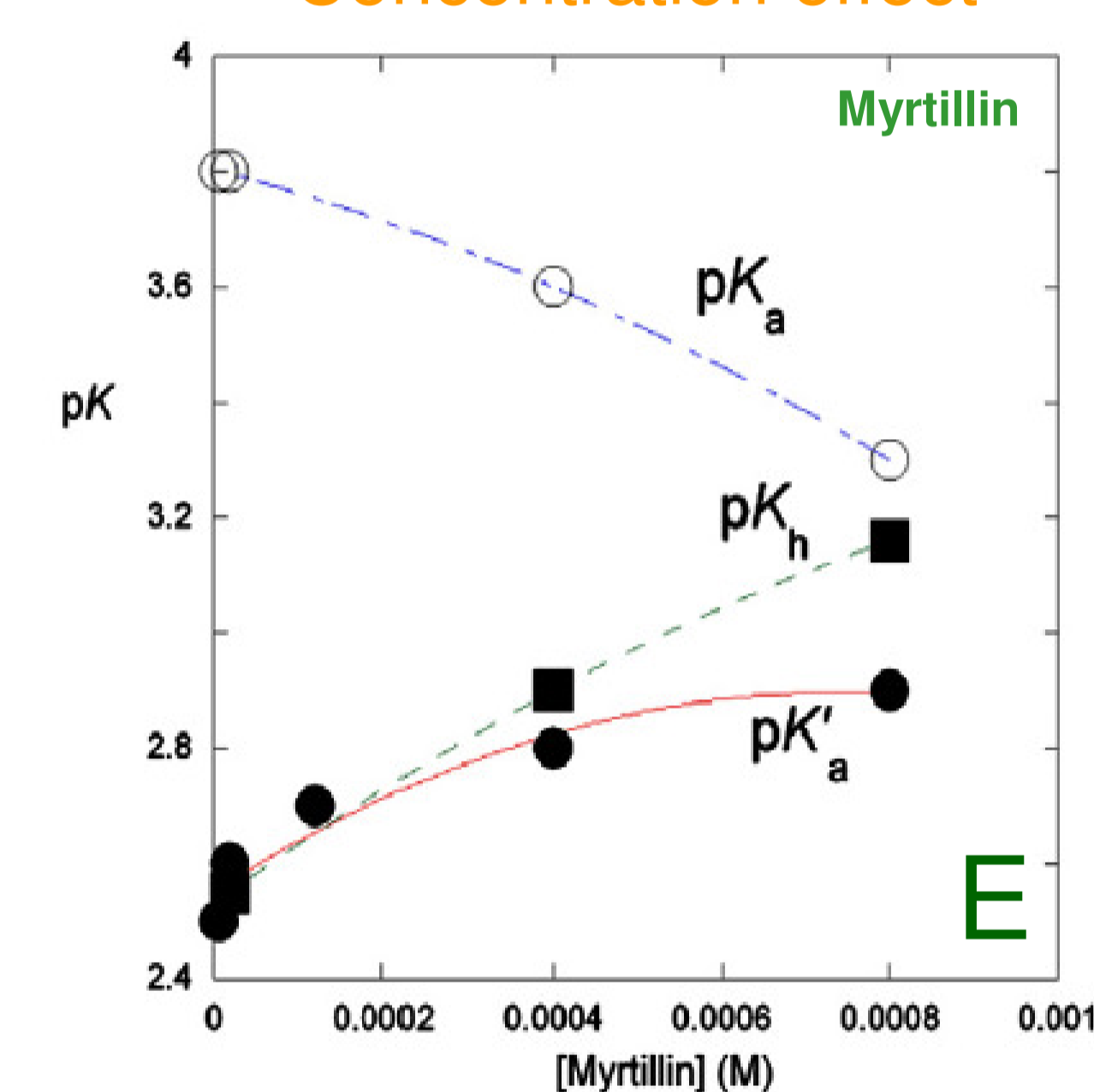
Self-aggregation studies

Diluted solutions: UV-vis spectroscopy

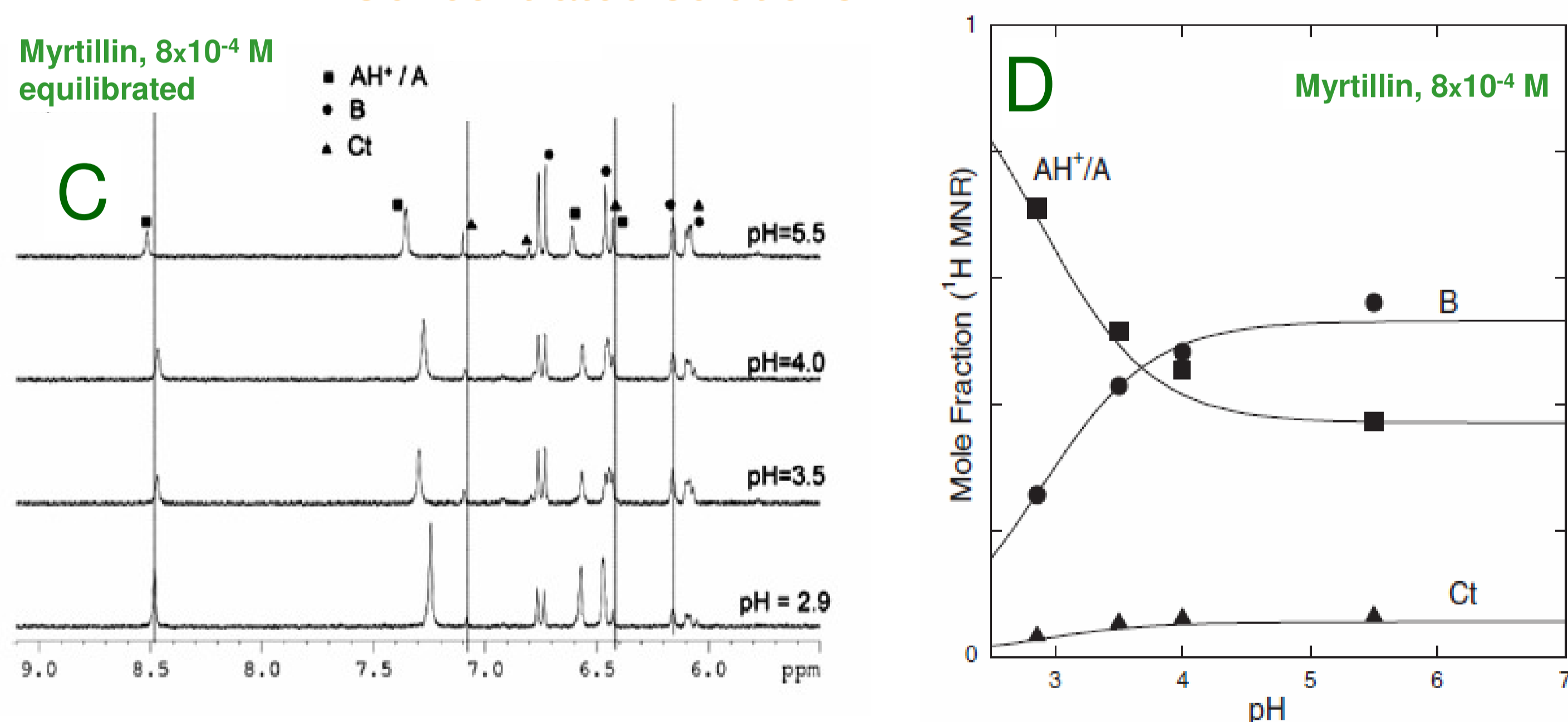


The thermodynamic and kinetic constants of the network of chemical reactions were determined for every anthocyanin at several concentrations, in the range 6.0×10^{-6} – 8×10^{-4} M.⁴ Diluted and moderately concentrated solutions were studied by UV-vis spectroscopy, and carrying out the so-called **direct and reverse pH jumps** experiments. Analysis of the equilibrated solutions (Figure A) and the kinetic information obtained from the pH jumps (Figure B for direct pH jump) allows to characterize the thermodynamics and kinetics of the system. Concentrated solutions were studied by ¹H-NMR, in this case, information about the mole fraction distribution of every species at the equilibrium can be directly obtained from the analysis of the spectra (Figures C and D).

Concentration effect



Concentrated solutions: ¹H-NMR



Representation of the values K'_a , K_a and K_h obtained from ¹H-NMR and UV-vis shows the dependence of these constants on the anthocyanin concentration (see Figure E for Myrtillin).⁴ Both, **flavylium cation and quinoidal base self-aggregates**. In the case of flavylium cation, **aggregation difficults hydration** while for quinoidal base the **acidity is increased** with aggregation. **Data reported for 2×10^{-5} M are a good approximation for the intrinsic behavior of the anthocyanins, i.e. in the absence of aggregation (Table 1).**

Table 1. Thermodynamic and kinetic data for the concentration 2×10^{-5} M (no aggregation).

Anthocyanin	pK'_a (± 0.1)	pK_a (± 0.1)	K_h (M^{-1}) ^a	K'_t ^a	k_h (s^{-1}) ^a	k_{-h} ($M^{-1} s^{-1}$) ^a	k_t (s^{-1}) ^a	k_{-t} (s^{-1}) ^a
Myrtillin	2.6	3.8	2.8×10^{-3}	0.06	0.09	32	0.03 ^b	0.5 ^b
Oenin	2.3	3.8	3.4×10^{-3}	0.12	0.12	35	0.06 ^c	0.5 ^c
Petunidin 3-O-Gl	2.4	3.7	3.3×10^{-3}	0.13	0.10	30	0.08 ^c	0.6 ^c
Kuromanin	2.5	3.8	3.1×10^{-3}	0.12	0.11	35	0.07 ^c	0.6 ^c
Peonidin 3-O-Gl	2.4	3.6	4.9×10^{-3}	0.26	0.19	39	0.14 ^b	0.5 ^b
Callistephin	2.7	3.9	1.8×10^{-3}	0.13	0.12	67	0.11 ^c	0.8 ^c

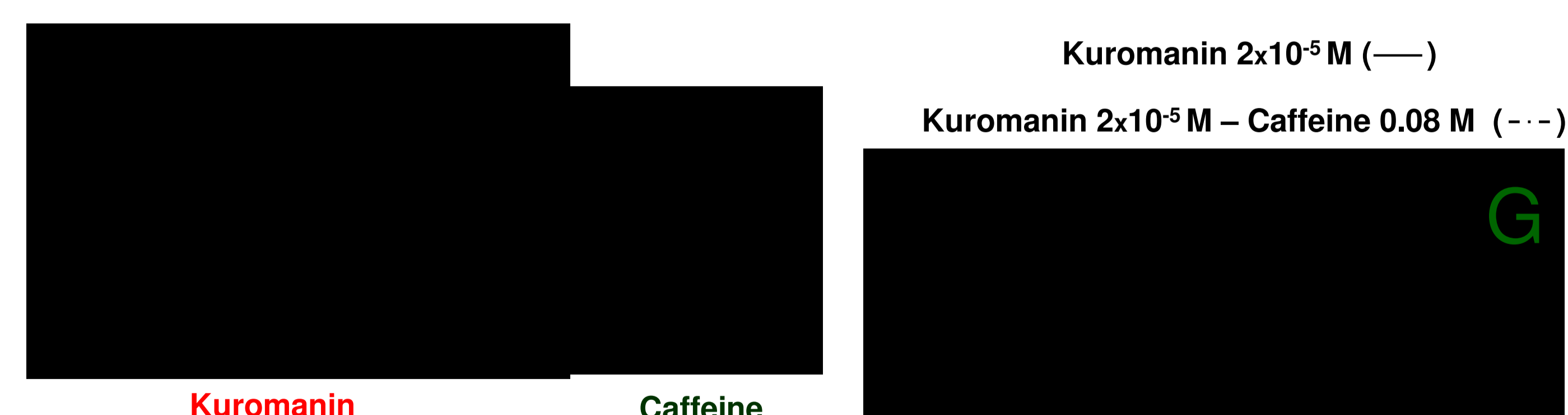
^a Estimated error ~20%. ^b At pH = 1.0. ^c At pH = 1.1.

Aggregation of the flavylium cation was studied at pH = 1 by means of ¹H-NMR, UV-vis and circular dichroism. In the last case (see Figure F for Petunidin 3-O-Gl), a signal in the visible region appears upon aggregation due to appearance of supramolecular chirality. For all the cases, the flavylium cation self-associates in a left-handed manner.⁵ The variations observed for all the three techniques can be fitted with a **monomer-dimer model**. The dimerization constants are shown in Table 2 and their magnitude seems to be related to the number of -OH and -OCH₃ substituents present in the molecule.^{4,5}

Table 2. Dimerization constants for the flavylium cation.

Anthocyanin	$K_D \text{AH}^+$ (M^{-1})	-OH	-OCH ₃
Myrtillin	1240	2	-
Oenin	976	-	2
Petunidin 3-O-Gl	900	1	1
Kuromanin	700	1	-
Peonidin 3-O-Gl	661	-	1
Callistephin	401	-	-

Co-pigmentation studies



Co-pigmentation effect was studied for the system Kuromanin:caffeine.⁶ **The co-pigment interacts both with the flavylium cation (AH⁺) and the quinoidal base (A) stabilizing these species.** As a result, the domain of the flavylium cation is extended to more basic pH values, while at moderately acidic medium the mole fraction of the quinoidal base increases at expenses of the hemiketal B (Figure G).

Bibliography

[1] Markakis P. (Ed.), Anthocyanins as Food Colors, Academic Press, New York, 1982. [2] Pina, F., Melo, M. J., Laia, C. A.T., Parola, A. J., Lima, J. C. *Chem. Soc. Rev.* 2012, 41, 869–908. [3] Steward, R. N., Norris, K. H., Asen, S. *Phytochemistry* 1975, 14, 937–942. [4] Leydet, L., Gavara, R., Petrov, V., Diniz, A. M., Parola, A. J., Lima J. C., Pina, F. *Phytochemistry* 2012, 83, 125–135. [5] Gavara, R., Petrov, V., Quintas, A., Pina, F. *Phytochemistry* 2013, accepted. [6] Limón, P. M., Gavara, R., Pina, F., submitted.

Acknowledgements

This work was funded by FCT through the projects PEst-C/EQB/LA0006/2011 and PTDC/QUI-QUI/117996/2010 and post-doc grant SFRH/BPD/44639/2008 (RG.).



COMUNICACIONES EN CONGRESOS

Autores: R. Bermejo, P. Limón, F. Gabriel Acién, J.M. Fernández- Sevilla y M. Melgosa.

Título: Aceites de oliva virgen enriquecidos con nuevos antioxidantes procedentes de microalgas para prevención de enfermedades degenerativas.

Tipo de participación: Comunicación (Oral)

Congreso: XVI Scientific-Technical Symposium of olive oil (Expoliva 2013).

Lugar celebración: Jaén

Fecha: 2013

Aceites de oliva virgen enriquecidos con nuevos antioxidantes procedentes de microalgas para prevención de enfermedades degenerativas.

Ruperto Bermejo Román¹, Piedad Limón Villarejo¹, F. Gabriel Acién Fernández²,
José M. Fernández Sevilla², Manuel Melgosa Latorre³

¹ Dpto. Química Física y Analítica, E.P.S. Linares, Universidad de Jaén.

² Dpto. Ingeniería Química, Universidad de Almería.

³ Dpto. Óptica, Universidad de Granada.

<http://www4.ujaen.es/~rbermejo>

rbermejo@ujaen.es

ABSTRACT

Currently there is a growing interest in the development of functional foods, which are those able to provide beneficial effects on health, in addition to their nutritional or energetic values. Usually these products are traditional foods enriched with one or several components promoting a beneficial effect on human health.

In this sense, the interest in carotenoid lutein has recently increased on the basis of different studies suggesting the protective effect resulting from an adequate intake of this pigment in the prevention and evolution of human-degenerative eye diseases. However, the quantity of lutein recommended for risk groups, is very difficult to be administered by dietary modifications, so it is convenient to manage supplements containing lutein-enriched extracts in their formulations.

The aim of this work is the laboratory production and colorimetric characterization of virgin-olive oils enriched in lutein. A new methodology has been developed to obtain lutein extracts from the microalga *Scenedesmus almeriensis*, which has a high level of this antioxidant compound, to perform a physicochemical and colorimetric characterization of different virgin-olive oils enriched with these extracts, as a suitable conduction medium to provide lutein to human organism. We have added increasing amounts of lutein to different virgin-olive oils, studying how their color parameters change.

The results obtained show that virgin-olive oils enriched with lutein to a concentration of 0.21 mg lutein/ml oil, show acceptable physicochemical and colorimetric properties, allowing also to administer the daily-recommended lutein intake (6 mg), taking into account the estimated average consumption of virgin-olive oil per habitant and day in our country (30 ml). In this way, we try to obtain virgin-olive oils with additional health properties, as an alternative way in the fight against human degenerative diseases.

Keywords: Food color, lutein, virgin-olive oil, *Scenedesmus almeriensis*.

INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un interés creciente en el desarrollo de alimentos funcionales, que son aquellos capaces de proporcionar efectos beneficiosos para la salud, adicionalmente a su valor nutritivo o energético. Estos productos, son usualmente alimentos tradicionales enriquecidos en

uno o varios componentes, que ejercen o promueven un efecto beneficioso para la salud humana.

El interés por el carotenoide luteína se ha incrementado recientemente en base a estudios que sugieren el efecto protector que resulta de una ingesta adecuada de este pigmento en la prevención y evolución de enfermedades degenerativas oculares humanas. Sin embargo, la dosis de luteína recomendada para grupos de riesgo, difícilmente puede ser cubierta por modificaciones dietarias, por lo que es conveniente administrar suplementos que incluyan en sus formulaciones extractos enriquecidos en luteína.

La luteína y su interés

Los carotenoides son una gran familia de pigmentos fotosintéticos que se pueden dividir en carotenos y xantofilas, dentro de la cual se encuentra la luteína. La luteína posee un alto interés comercial, en sectores como la industria de nutracéuticos, alimentación y cosmética, como colorante y potenciador de la pigmentación. Actualmente, existen una serie de enfermedades oftálmicas tales como las relacionadas con degeneración macular senil y cataratas y otros problemas que involucran diferentes mecanismos (respuestas inmunes, inflamaciones y apoptosis), que tienen que ver con el déficit de luteína en el organismo y la correspondiente pérdida de protección antioxidante [1]. La luteína se encuentra en cantidades significativas en la retina humana en la zona denominada "mácula lútea". Aunque se desconoce el mecanismo de la acción protectora de la luteína, éste se atribuye a su capacidad de filtrar parte de la luz azul o de neutralizar los radicales libres que esta radiación u otros factores puedan originar [2]. En este contexto, estudios epidemiológicos y clínicos de administración de luteína como suplemento han mostrado que la ingesta de esta sustancia tiene un papel relevante en la protección contra la aparición y/o progresión de enfermedades de elevada incidencia en países desarrollados como son cáncer [3], enfermedad cardiovascular, cataratas y degeneración macular senil [4]. En estos momentos, una de las vías más interesantes de cara a desarrollar una estrategia preventiva para la

degeneración macular, es una adecuada ingestión de luteína en la dieta.

Fuentes de luteína. Las microalgas como alternativa.

Dado su papel esencial en el metabolismo vegetal y concretamente en la estructura y función del aparato fotosintético, la luteína se encuentra ampliamente distribuida en plantas superiores, contándose frutas y verduras entre sus fuentes para consumo humano, y siendo especialmente ricas las de hoja verde. Sin embargo, ninguna de estas fuentes es directamente aplicable para complementar la ingesta habitual de la población hasta las dosis recomendadas para la prevención de enfermedades degenerativas (6,0 mg/día). Para esto, habitualmente se recurre al uso de extractos enriquecidos en luteína que, en su mayoría, proceden de flores de caléndula y sirven para suplementar dietas de los grupos de riesgo.

A pesar de la amplia distribución de la luteína en plantas superiores y algunos productos que se usan para la alimentación animal (harina de alfalfa, gluten de maíz y flores de caléndula), la reducida concentración de luteína en estas materias primas hace que se estén buscando otras fuentes en las que el pigmento se encuentre en mayores concentraciones. Así, se están realizando esfuerzos considerables para hacer posible la producción comercial de este carotenoide a partir de microalgas [5,6]. La biomasa de microalgas es una fuente ventajosa de luteína debido a su elevado contenido en este pigmento con respecto a las fuentes tradicionales anteriormente mencionadas y a que aparece como molécula libre en lugar de la mezcla de ésteres que habitualmente se encuentra en los extractos comerciales.

Es importante resaltar en este punto, la existencia de la microalga *Scenedesmus almeriensis*, una nueva especie descubierta por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería en Agosto de 2003, que contiene una elevada cantidad de luteína (hasta 7000 ppm), constituyendo ésta el carotenoide mayoritario [7].

El aceite de oliva

Es bien conocido que el aceite de oliva posee, debido a su composición química, importantes propiedades que lo hacen un alimento muy saludable y recomendado, presentando además un alto factor de digestibilidad, parámetro muy importante en alimentación. Son muchos los trabajos científicos que avalan la importancia de su incorporación en una dieta equilibrada, mostrando efectos muy beneficiosos para la salud.

Dentro de la gran variedad de compuestos existentes en el aceite de oliva, se pueden nombrar, entre otros: compuestos hidrocarbonados, esteroides, compuestos diterpénicos y triterpénicos, alcoholes alifáticos, tocoferoles, pigmentos, etc. Las clorofilas y los

Aceites de oliva virgen enriquecidos con nuevos antioxidantes procedentes de microalgas para prevención de enfermedades degenerativas. R. Bermejo Román, P. Limón Villarejo, F.G. Acien Fernández, J.M. Fernández Sevilla, M. Melgosa Latorre.

carotenoides son los pigmentos más abundantes en aceites de oliva virgen. Los carotenoides se encuentran presentes en un intervalo comprendido entre los 5-100 mg kg⁻¹, y dependiendo de la naturaleza del aceite se ha encontrado luteína en concentraciones que varían en el intervalo 2-8 mg kg⁻¹ [8]. Los anteriores valores, indican que la luteína se encuentra en cantidades muy pequeñas y por tanto el aceite de oliva, en su composición original, no puede aportar las cantidades recomendadas para la prevención de enfermedades degenerativas. Sin embargo, es importante resaltar que por sus características y por contener pequeñas cantidades de luteína, puede ser un adecuado medio para la incorporación de este pigmento. En este sentido, existen trabajos en los que se pone de manifiesto que matrices alimenticias ricas en grasas, como lo es el aceite de oliva, pueden facilitar y/o beneficiar el proceso de bioasimilación de este tipo de carotenoides [9].

MATERIALES Y MÉTODOS

Se han obtenido extractos de luteína procedente de la microalga *Scenedesmus almeriensis*, mediante el desarrollo de metodologías descritas previamente [7,10]. Tras la eliminación de disolventes, la luteína ha sido redisoluelta en aceite de oliva virgen, obteniendo un extracto concentrado de luteína (5 mg/ml) listo para ser utilizado en los experimentos de enriquecimiento de diferentes aceites de oliva virgen extra (Figura 1).

Las medidas de color se han realizado utilizando un espectrocolorímetro Konica Minolta CM-5 conectado a un ordenador dotado del software SpectraMagic NX PRO USB. El equipo proporciona medidas en el espacio de color CIELAB. Suponemos iluminante D65 y observador patrón colorimétrico CIE 1931 en nuestras medidas colorimétricas. Tras la correspondiente calibración del instrumento se procedió a medir los parámetros de color para las muestras. Así, se colocaron 14 ml de aceite en una cubeta transparente de cuarzo con unas dimensiones de 4.2 x 3.2 x 1.0 cm. Tras la medida inicial para caracterizar el aceite sin adición de luteína, se inició el enriquecimiento, mediante sucesivas adiciones de 100 µl de extracto concentrado de luteína y se midieron los valores de los parámetros colorimétricos de cada muestra generada (L*, a*, b*), así como los correspondientes a las variaciones de los mismos por comparación con el aceite original (ΔL^* , Δa^* , Δb^* y ΔE^*_{ab}). Los resultados de diferencias de color usando fórmulas de diferencia de color avanzadas como CIEDE2000 [11], son similares a los obtenidos con CIELAB. La Figura 2 muestra, a título de ejemplo, algunos de los diferentes aceites ensayados antes de las adiciones de luteína.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Antes de usar el extracto de luteína obtenido, procedente del correspondiente tratamiento de la biomasa de la microalga *Scenedesmus almeriensis*, se ha procedido a caracterizar colorimétricamente los diferentes aceites de oliva virgen adquiridos, que tienen diferentes denominaciones de origen (Tabla 1). Los datos de color de la Tabla 1 (por ejemplo, altos valores de L^*) no se corresponden bien con los colores observados en la Figura 2, ya que los datos de la Tabla 1 corresponden a medidas de color por transmisión en muestras con un espesor menor que el de las muestras de la Figura 2. En la Tabla 1 puede también observarse que los aceites “Melgarejo” y “Carbonell” tienen coordenadas de color muy parecidas, pero aún así nos interesa estudiar el cambio de color que las adiciones de luteína producen en cada uno de ellos, ya que su composición química puede ser muy diferente.

Se han realizado adiciones sucesivas de un volumen constante de extracto de luteína para ir aumentando la concentración de forma progresiva. Tras cada una de las adiciones de 100 μ l de extracto de luteína, se homogeniza la muestra de aceite enriquecido y se mide el color con el espectrocolorímetro, obteniéndose los parámetros correspondientes a las muestras generadas y las diferencias de color con el aceite original al que no se había añadido luteína. A título de ejemplo se muestran en las Tablas 2 y 3 datos correspondientes a los aceites Santuario de Mágina y Melgarejo.

Los resultados obtenidos muestran que a medida que añadimos luteína, el color del aceite va cambiando desde las tonalidades iniciales amarillo-verdosas de los diferentes aceites de oliva virgen extra, en la dirección que marca el extracto fuertemente anaranjado de luteína. La adición de luteína produce un fuerte aumento en los valores de la coordenada a^* y una disminución moderada de L^* , como cabría esperar, y se observa que también la coordenada b^* sufre modificaciones importantes en algunos de los aceites (ej. “Melgarejo”, Tabla 3). El valor de ΔE_{ab}^* crece de forma continua conforme se adiciona extracto y es interesante resaltar que de los aceites ensayados, los que generan menor variación del parámetro ΔE_{ab}^* son FuenRoble y Santuario de Mágina.

En la Figura 3 se observa, a modo de ejemplo, el efecto de la adición de luteína en cantidades crecientes sobre cuatro de los aceites utilizados. Se puede observar que dicho efecto de adición de luteína en los cuatro aceites es similar, si bien destaca un poco más la trayectoria correspondiente al aceite “Santuario de Mágina” ya que el cambio de color con la primera adición de luteína es de 9,6 unidades CIELAB, bastante menor que el que se obtiene para los otros tres aceites (por encima de 20

unidades CIELAB). Esta diferencia entre el comportamiento colorimétrico de los cuatro aceites estudiados puede estar relacionada con el hecho de que el color inicial del aceite “Santuario de Mágina” es bastante diferente al de los otros tres aceites (véase Tabla 1). En efecto, al ser su coordenada b^* tan elevada ($b^*=122,3$), la primera adición de luteína difícilmente consigue aumentar aún más dicha coordenada, por lo que la diferencia de color total que produce dicha adición es bastante menor que la que se observa en los otros tres aceites. Por otra parte, la Figura 3 muestra que, salvo para el aceite de oliva “Santuario de Mágina”, en las primeras adiciones de luteína el color cambia más que en las últimas; es decir, hay una cierta tendencia asintótica o de estabilización del color a partir de cierta cantidad de luteína adicionada.

La Tabla 4 muestra, a modo de resumen, los parámetros colorimétricos de todos los aceites utilizados y de los mismos adicionados con luteína hasta una concentración igual a 0,21 mg/ml. En ella aparecen ordenados en orden creciente de parámetro ΔE_{ab}^* . Puede observarse que los aceites que cambian menos de color tras la adición de luteína respecto del color original sin la adición de la misma, son los cuatro primeros de la Tabla 4, en donde los valores del parámetro que indica la variación de color total se mantiene por debajo de 30 unidades CIELAB.

A la vista de los datos puede deducirse que una adición de luteína de 600 μ l de extracto, genera aceites con una concentración de luteína igual a 0,21 mg/ml, concentración que haría que la ingesta media estimada por el COI (Comité Oleícola Internacional) y la FEN (Federación Española de Nutrición) para la población de España, que es de 30 ml por persona y día, fuera suficiente para incorporar los 6 mg de luteína que se estima que son necesarios para la prevención de enfermedades degenerativas tales como las comentadas anteriormente. El color que se obtiene con la adición de luteína obviamente difiere del aceite original, siendo lógicamente más anaranjado debido a las características propias del extracto de luteína, debiendo abordarse como otra línea de investigación paralela y complementaria, los estudios de variabilidad en la aceptabilidad y preferencia de este tipo de aceites por parte de los potenciales consumidores (Figura 4).

CONCLUSIONES

Se ha desarrollado una metodología para obtener extractos ricos en luteína procedentes de una estirpe de microalga (*Scenedesmus almeriensis*) rica en este compuesto antioxidante y se ha realizado un estudio de caracterización fisicoquímica y colorimétrica de los aceites de oliva enriquecidos en la misma, como medio idóneo de incorporación al organismo. Se ha procedido a adicionar luteína a

diferentes aceites de oliva virgen, estudiando como varían los parámetros colorimétricos a medida que va aumentando la concentración de luteína. Así, se ha utilizado un extracto de luteína de concentración igual a 5 mg/ml, y se han realizado sucesivas adiciones de 100 µl hasta llegar a concentraciones en los aceites de 0'33 mg/ml (360 mg luteína/kg aceite), es decir se han alcanzado concentraciones de luteína entre 45 y 180 veces superiores a las que presentan los aceites de oliva no enriquecidos en luteína (2-8 mg luteína/kg aceite).

Los resultados obtenidos muestran que enriqueciendo los aceites hasta una concentración de 0'21 mg luteína/ml, se obtienen aceites con propiedades fisicoquímicas y colorimétricas muy aceptables, que además permiten incorporar al organismo la ingesta diaria de luteína recomendada (6 mg), teniendo en cuenta el consumo medio estimado de aceite de oliva por habitante y día para nuestro país (30 ml). De esta forma, se pretende dotar al aceite de oliva de un valor añadido superior al que ya de por sí tiene y ofrecer una alternativa diferente a las actuales, en la lucha contra algunas enfermedades degenerativas humanas.

De esta forma, se han podido solubilizar cantidades adecuadas de luteína en los diferentes aceites de oliva virgen ensayados y se han estudiado colorimétricamente los mismos, prestando especial atención a los cambios de color producidos por la adición del antioxidante. Estos resultados son esperanzadores en cuanto a la posible utilización de aceite de oliva como medio de incorporación de luteína en nuestro organismo, si bien deben ser completados con estudios de propiedades fisicoquímicas de los aceites enriquecidos y de estabilidad de los mismos, respecto de parámetros tales como la temperatura y el tiempo, así como también de preferencias y emociones de color de los aceites aditivados frente a los originales, por parte de personas de España u otros países.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Jaén, por la financiación recibida a través del Proyecto del Plan Propio UJA 2011/13/09 que ha permitido el desarrollo de los estudios presentados. A la Caja Rural de Jaén por el correspondiente patrocinio.

Aceites de oliva virgen enriquecidos con nuevos antioxidantes procedentes de microalgas para prevención de enfermedades degenerativas. R. Bermejo Román, P. Limón Villarejo, F.G. Acién Fernández, J.M. Fernández Sevilla, M. Melgosa Latorre.

REFERENCIAS

- [1] Kijlstra, A., Tian, Y., Kelly, E., Berendschot, T. (2012) Lutein: more than just a filter for blue light, *Progress in Retinal and Eye Research* 31, 303-315.
- [2] Brenna, O.V. & Berardo, N., (2004). Application of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) to the Evaluation of carotenoids content in maize. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 52: 5577-5582.
- [3] Demming-Adams, B. & W.W.Adams III (2002). Antioxidants in Photosynthesis and Human Nutrition. *Science*, 298, 2149-2153.
- [4] Granado, F., Olmedilla B. & Blanco, I. (2003). Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *British Journal of Nutrition*, 90:487-502.
- [5] Del Campo, J.A., H.Rodríguez, J.Moreno, M.A.Vargas, J.Rivas & M.G.Guerrero (2001). Lutein production by *Muriellopsis* sp. in an outdoor tubular photobioreactor. *J.Biotechnol.*, 85, 289-295.
- [6] García-González M., Moreno, J., Manzano, C., Florencio, F. J., Garcia Guerrero, M., (2005) Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis-carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology* 115:81-90.
- [7] Fernández, J.M., Acién, F.G., Molina, E., (2010) Biotechnological production of lutein and its applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86-1, 27-40.
- [8] Cichelli, A. & Pertesana, G.P., (2004). High-performance liquid chromatography analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils: chemometric approach to variety classification. *Journal of Chromatography A*, 1046: 141-146.
- [9] Nidhi, B. y Baskaran, V,(2011) Influence of vegetable oils on micellization of lutein in a simulated digestion model, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88, 367-372.
- [10] Cerón García, M.C., Campos Pérez, I., Macías Sánchez, M.D., Bermejo Román, R., Fernández Sevilla, J.M and Molina Grima, E. (2010) Stability of carotenoids in *Scenedesmus almeriensis* biomass and extracts under storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6944-6950.
- [11] CIE 142-2001 "Improvement t industrial colour-difference evaluation". Comisión Internacional de Iluminación, Viena, 2001.

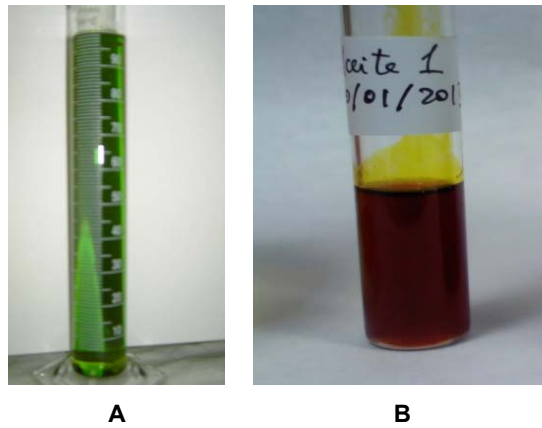


Figura 1. (A) Microalga *Scenedesmus almeriensis* y (B) extracto de luteína (5 mg/ml).

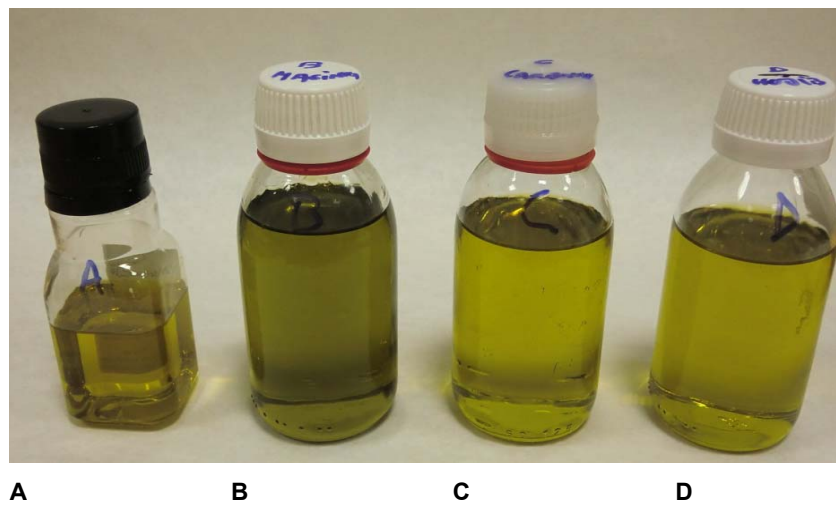


Figura 2. Aceites de oliva virgen extra empleados en las experiencias de enriquecimiento en luteína. A) Melgarejo, B) Santuario de Mágina, C) Carbonell y D) Hojiblanca.

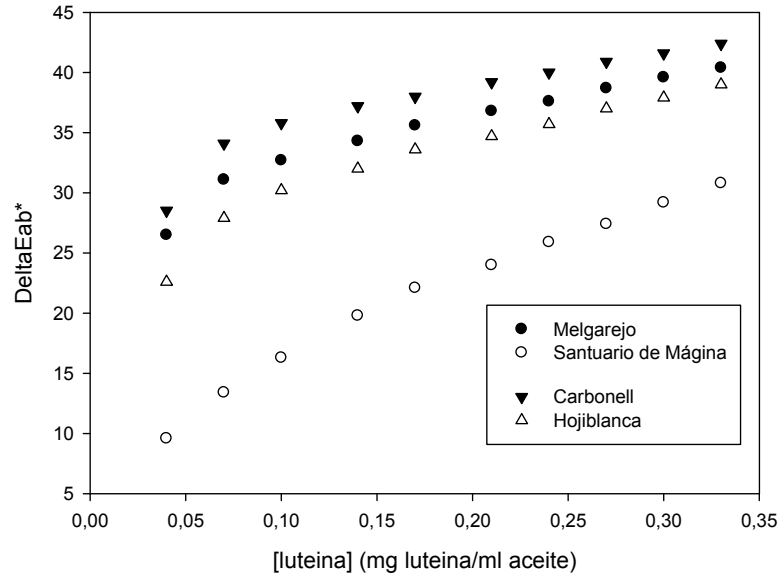


Figura 3. Diferencias de color (unidades CIELAB) para los aceites de oliva virgen extra en función del enriquecimiento en luteína en los mismos.

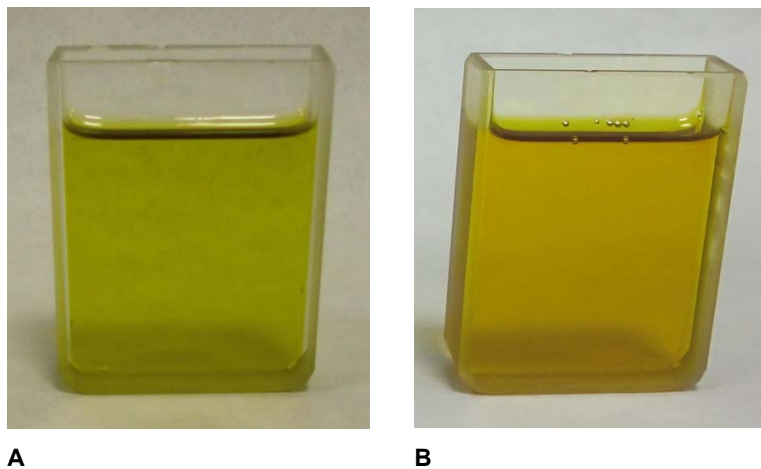


Figura 4. Variación del color en aceite de oliva virgen extra Santuario de Mágina (A) y el mismo aceite enriquecido con luteína hasta una concentración igual a 0'21 mg/ml (muestra 6 de la Tabla 2).

Tabla 1. Parámetros colorimétricos de aceites de oliva virgen extra utilizados en las experiencias de enriquecimiento en luteína procedente del alga *Scenedesmus almeriensis*.

Aceite de Oliva	Procedencia	L*	a*	b*
FuenRoble	Orcera (Jaén)	78'8	6'9	123'1
Santuario de Mágina	Huelma (Jaén)	81'9	5'1	122'3
Oro Bailén	Bailén (Jaén)	83'7	1'8	119'2
Oro Génave	Génave (Jaén)	86'4	2'6	120'5
Hojiblanca	Antequera (Málaga)	87'8	1'7	111'8
La Cántara	Cambil (Jaén)	87'49	0'3	107'9
Melgarejo	Pegalajar (Jaén)	88'8	1'3	109'0
Carbonell	Nacional	88'0	0'7	105'3
Garay	Lucena (Córdoba)	88'2	0'7	102'6
Baena	Baena (Córdoba)	88'8	0'5	102'1
Abades	Loja (Granada)	89'1	-0'03	102'7

Tabla 2. Parámetros colorimétricos en la adición de luteína sobre aceite de oliva virgen extra "Santuario de Mágina". Extracto de luteína adicionado [luteína]= 5 mg/ml. Volumen inicial de aceite en cubeta =14 ml.

Muestra	Luteína Adicionada (ml)	L*	a*	b*	ΔE_{ab}^*	[luteína] mg/ml	mg luteína/kg aceite
0	-	81'9	5'10	122'3	-	-	
1	0.1	79'7	11'5	129'2	9'6	0'04	43.6
2	0.2	77'8	16'2	128'6	13'4	0'07	76.3
3	0.3	76'4	19'6	127'2	16'3	0'10	109
4	0.4	74'9	23'3	125'8	19'8	0'14	153
5	0.5	73'9	25'5	124'3	22'1	0'17	185
6	0.6	72'8	27'3	123'1	24'0	0'21	229
7	0.7	71'9	29'0	121'8	25'9	0'24	261
8	0.8	71'1	30'2	120'8	27'4	0'27	294
9	0.9	70'2	31'7	119'5	29'2	0'30	327
10	1.0	69'4	32'9	118'2	30'8	0'33	360

Tabla 3. Parámetros colorimétricos en la adición de luteína en aceite de oliva virgen extra "Melgarejo". Origen: Pegalajar (Jaén). Extracto de luteína adicionado [luteína]= 5 mg/ml. Volumen inicial de aceite en cubeta =14 ml.

Muestra	Luteína Adicionada (ml)	L*	a*	b*	ΔE_{ab}^*	[luteína] mg/ml	mg luteína/kg aceite
0	-	88'8	1'30	109'0	-	-	
1	0.1	84'8	11'4	133'3	26'5	0'04	43.6
2	0.2	82'8	16'9	135'3	31'1	0'07	76.3
3	0.3	81'3	20'6	134'4	32'7	0'10	109
4	0.4	79'6	24'3	132'9	34'3	0'14	153
5	0.5	78'5	26'8	131'7	35'6	0'17	185
6	0.6	77'4	29'2	130'4	36'8	0'21	229
7	0.7	76'5	30'8	129'1	37'6	0'24	261
8	0.8	75'6	32'6	127'9	38'7	0'27	294
9	0.9	74'8	33'9	126'9	39'6	0'30	327
10	1.0	74'1	35'2	125'7	40'4	0'33	360

Tabla 4. Parámetros colorimétricos de aceites de oliva vírgenes y diferencias de color CIELAB entre los aceites originales y los aditivados con luteína.

Aceite de Oliva	Procedencia	L*	a*	b*	ΔE_{ab}^*	[luteína] mg/ml
FuenRoble	Orcera (Jaén)	78'81	6'91	123'13	-	-
		71'10	25'81	120'28	20'60	0'21
Santuario de Mágina	Huelma (Jaén)	81'9	5'10	122'3	-	-
		72'8	27'3	123'1	24'00	0'21
Oro Bailén	Bailén (Jaén)	83'68	1'79	119'15	-	-
		73'62	26'57	124'32	27'24	0'21
Oro Génave	Génave (Jaén)	86'42	2'63	120'52	-	-
		76'70	27'31	129'05	27'86	0'21
Hojiblanca	Antequera (Málaga)	87'8	1'69	111'8	-	-
		76'6	29'6	129'2	34'7	0'21
La Cántara	Cambil (Jaén)	87'39	0'33	107'96	-	-
		76'41	28'5	128'8	36'68	0'21
Melgarejo	Pegalajar (Jaén)	88'8	1'30	109'0	-	-
		77'4	29'2	130'4	36'8	0'21
Carbonell	Nacional	88'0	0'72	105'3	-	-
		76'7	29'6	129'3	39'0	0'21
Garay	Lucena (Córdoba)	88'18	0'67	102'6	-	-
		77'40	27'9	130'17	40'22	0'21
Baena	Baena (Córdoba)	88'75	0'46	102'14	-	-
		76'82	29'18	129'51	41'43	0'21
Abades	Loja (Granada)	89'08	-0'03	102'66	-	-
		78'07	27'96	131'20	41'46	0'21



COMUNICACIONES EN CONGRESOS

Autores: R. Bermejo, P. Limón, F. Gabriel Acién, J.M. Fernández- Sevilla y M. Melgosa.

Título: Measuring color in virgin olive oils enriched with lutein from microalgae.

Tipo de participación: Comunicación (Oral)

Congreso: X Congreso Nacional del Color.

Lugar celebración: Valencia

Fecha: 2013

MEDIDAS DE COLOR EN ACEITES DE OLIVA VIRGEN ENRIQUECIDOS CON LUTEÍNA PROCEDENTE DE MICROALGAS.

MEASURING COLOR IN VIRGIN OLIVE OILS ENRICHED WITH LUTEIN FROM MICROALGAE.

Bermejo Román, Ruperto (1); Limón Villarejo, Piedad (1); Acién Fernández, F. Gabriel (2); Fernández Sevilla, José M. (2); Melgosa Latorre, Manuel (3)

(1) Departamento de Química Física y Analítica, Escuela Politécnica Superior de Linares, Universidad de Jaén. Linares.

(2) Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Almería, Almería.

(3) Departamento de Óptica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada.

Página web <http://www4.ujaen.es/~rbermejo>; e-mail: rbermejo@ujaen.es

Resumen:

Actualmente existe un interés creciente en el desarrollo de alimentos funcionales, que son aquellos capaces de proporcionar efectos beneficiosos para la salud, adicionalmente a su valor nutritivo o energético. Estos productos, son usualmente alimentos tradicionales enriquecidos en uno o varios componentes, que ejercen o promueven un efecto beneficioso para la salud humana.

El interés por el carotenoide luteína se ha incrementado recientemente en base a estudios que sugieren el efecto protector que resulta de una ingesta adecuada de este pigmento en la prevención y evolución de enfermedades degenerativas oculares humanas. Sin embargo, la dosis de luteína recomendada para grupos de riesgo, difícilmente puede ser cubierta por modificaciones dietarias, por lo que es conveniente administrar suplementos que incluyan en sus formulaciones extractos enriquecidos en luteína.

El presente estudio tiene por objetivo la obtención y caracterización colorimétrica de aceites de oliva enriquecidos en luteína a nivel de laboratorio. Así, se ha desarrollado una metodología para obtener extractos ricos en luteína procedentes de una estirpe de microalga (*Scenedesmus almeriensis*) rica en este compuesto antioxidante y se ha realizado un estudio de caracterización fisicoquímica y colorimétrica de los aceites de oliva enriquecidos en la misma, como medio idóneo de incorporación al organismo. Se ha procedido a adicionar luteína a diferentes aceites de oliva virgen, estudiando como varían los parámetros colorimétricos a medida que va aumentando la concentración de luteína. Se ha utilizado un extracto de luteína de concentración igual a 5 mg/ml, y se han realizado sucesivas adiciones de 100 µl hasta llegar a concentraciones en los aceites de 0'33 mg/ml (360 mg luteína/kg aceite), es decir se han alcanzado concentraciones de luteína entre 45 y 180 veces superiores a las que presentan los aceites de oliva no enriquecidos en luteína (2-8 mg luteína/kg aceite).

Los resultados obtenidos muestran que enriqueciendo los aceites hasta una concentración de 0'21 mg luteína/ml, se obtienen aceites con propiedades fisicoquímicas y colorimétricas muy aceptables, que además permiten incorporar al organismo la ingesta diaria de luteína recomendada (6 mg), teniendo en cuenta el consumo medio estimado de aceite de oliva por habitante y día para nuestro país (30 ml). De esta forma, se pretende dotar al aceite de oliva de un valor añadido superior al que ya de por sí tiene y ofrecer una alternativa diferente a las actuales, en la lucha contra algunas enfermedades degenerativas humanas.

Abstract:

Currently there is a growing interest in the development of functional foods, which are those able to provide beneficial effects on health, in addition to their nutritional or energetic values. Usually these products are traditional foods enriched with one or several components promoting a beneficial effect on human health.

In this sense, the interest in carotenoid lutein has recently increased on the basis of different studies suggesting the protective effect resulting from an adequate intake of this pigment in the prevention and evolution of human-degenerative eye diseases. However, the quantity of lutein recommended for

risk groups, is very difficult to be administered by dietary modifications, so it is convenient to manage supplements containing lutein-enriched extracts in their formulations.

The aim of this work is the laboratory production and colorimetric characterization of virgin-olive oils enriched in lutein. A new methodology has been developed to obtain lutein extracts from the microalga *Scenedesmus almeriensis*, which has a high level of this antioxidant compound, to perform a physicochemical and colorimetric characterization of different virgin-olive oils enriched with these extracts, as a suitable conduction medium to provide lutein to human organism. We have added increasing amounts of lutein to different virgin-olive oils, studying how their color parameters change. It has been used a lutein extract (5 mg/ml) and successive 100 µl additions to obtain virgin olive oils with concentrations in the range 0'04 to 0'33 mg lutein/ml oil (40 to 360 mg lutein/kg oil). Thus, lutein concentrations between 45 and 180 times higher than those found in virgin-olive oils not enriched with lutein (2-8 mg lutein/kg oil) were produced.

The results obtained show that virgin-olive oils enriched with lutein to a concentration of 0'21 mg lutein/ml oil, show acceptable physicochemical and colorimetric properties, allowing also to administer the daily-recommended lutein intake (6 mg), taking into account the estimated average consumption of virgin-olive oil per habitant and day in our country (30 ml). In this way, we try to obtain virgin-olive oils with additional health properties, as an alternative way in the fight against human degenerative diseases.

Palabras clave:

Color de alimentos, luteína, aceite de oliva virgen, *Scenedesmus almeriensis*.

Keywords:

Food color, lutein, virgin-olive oil, *Scenedesmus almeriensis*.

INTRODUCCIÓN

La luteína y su interés

Los carotenoides son una gran familia de pigmentos fotosintéticos que se pueden dividir en carotenos y xantofilas, dentro de la cual se encuentra la luteína. La luteína posee un alto interés comercial, en sectores como la industria de nutracéuticos, alimentación y cosmética, como colorante y potenciador de la pigmentación. Actualmente, existen una serie de enfermedades oftálmicas tales como las relacionadas con degeneración macular senil y cataratas y otros problemas que involucran diferentes mecanismos (respuestas inmunes, inflamaciones y apoptosis), que tienen que ver con el déficit de luteína en el organismo y la correspondiente pérdida de protección antioxidante [1]. La luteína se encuentra en cantidades significativas en la retina humana en la zona denominada "mácula lútea". Aunque se desconoce el mecanismo de la acción protectora de la luteína, éste se atribuye a su capacidad de filtrar parte de la luz azul o de neutralizar los radicales libres que esta radiación u otros factores puedan originar [2]. En este contexto, estudios epidemiológicos y clínicos de administración de luteína como suplemento han mostrado que la ingesta de esta sustancia tiene un papel relevante en la protección contra la aparición y/o progresión de enfermedades de elevada incidencia en países desarrollados como son cáncer [3], enfermedad cardiovascular, cataratas y degeneración macular senil [4]. En estos momentos, una de las vías más interesantes de cara a desarrollar una estrategia preventiva para la degeneración macular, es una adecuada ingestión de luteína en la dieta.

Fuentes de luteína. Las microalgas como alternativa.

Dado su papel esencial en el metabolismo vegetal y concretamente en la estructura y función del aparato fotosintético, la luteína se encuentra ampliamente distribuida en plantas superiores, contándose frutas y verduras entre sus fuentes para consumo humano, y siendo especialmente ricas las de hoja verde. Sin embargo, ninguna de estas fuentes es directamente aplicable para complementar la ingesta habitual de la población hasta las dosis recomendadas para la prevención de enfermedades degenerativas (6,0 mg/día). Para esto, habitualmente se recurre al uso de extractos

enriquecidos en luteína que, en su mayoría, proceden de flores de caléndula y sirven para suplementar dietas de los grupos de riesgo.

A pesar de la amplia distribución de la luteína en plantas superiores y algunos productos que se usan para la alimentación animal (harina de alfalfa, gluten de maíz y flores de caléndula), la reducida concentración de luteína en estas materias primas hace que se estén buscando otras fuentes en las que el pigmento se encuentre en mayores concentraciones. Así, se están realizando esfuerzos considerables para hacer posible la producción comercial de este carotenoide a partir de microalgas [5,6]. La biomasa de microalgas es una fuente ventajosa de luteína debido a su elevado contenido en este pigmento con respecto a las fuentes tradicionales anteriormente mencionadas y a que, aparece como molécula libre en lugar de la mezcla de ésteres que habitualmente se encuentra en los extractos comerciales.

Es importante resaltar en este punto, la existencia de la microalga *Scenedesmus almeriensis*, una nueva especie descubierta por el Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería en Agosto de 2003, que contiene una elevada cantidad de luteína (hasta 7000 ppm), constituyendo ésta el carotenoide mayoritario [7].

El aceite de oliva

Es bien conocido que el aceite de oliva posee, debido a su composición química, importantes propiedades que lo hacen un alimento muy saludable y recomendado, presentando además un alto factor de digestibilidad, parámetro muy importante en alimentación. Son muchos los trabajos científicos que avalan la importancia de su incorporación en una dieta equilibrada, mostrando efectos muy beneficiosos para la salud.

Dentro de la gran variedad de compuestos existentes en el aceite de oliva, se pueden nombrar, entre otros: compuestos hidrocarbonados, esteroides, compuestos diterpénicos y triterpénicos, alcoholes alifáticos, tocoferoles, pigmentos, etc. Las clorofilas y los carotenoides son los pigmentos más abundantes en aceites de oliva virgen. Los carotenoides se encuentran presentes en un intervalo comprendido entre los 5-100 mg kg⁻¹, y dependiendo de la naturaleza del aceite se ha encontrado luteína en concentraciones que varían en el intervalo 2-8 mg kg⁻¹ [8]. Los anteriores valores, indican que la luteína se encuentra en cantidades muy pequeñas y por tanto el aceite de oliva, en su composición original, no puede aportar las cantidades recomendadas para la prevención de enfermedades degenerativas. Sin embargo, es importante resaltar que por sus características y por contener pequeñas cantidades de luteína, puede ser un adecuado medio para la incorporación de este pigmento. En este sentido, existen trabajos en los que se pone de manifiesto que matrices alimenticias ricas en grasas, como lo es el aceite de oliva, pueden facilitar y/o beneficiar el proceso de bioasimilación de este tipo de carotenoides [9].

MATERIALES Y MÉTODOS

Se han obtenido extractos de luteína procedente de la microalga *Scenedesmus almeriensis*, mediante el desarrollo de metodologías descritas previamente [7,10]. Tras la eliminación de disolventes, la luteína ha sido redisuelta en aceite de oliva virgen, obteniendo un extracto concentrado de luteína (5 mg/ml) listo para ser utilizado en los experimentos de enriquecimiento de diferentes aceites de oliva virgen extra (Figura 1).

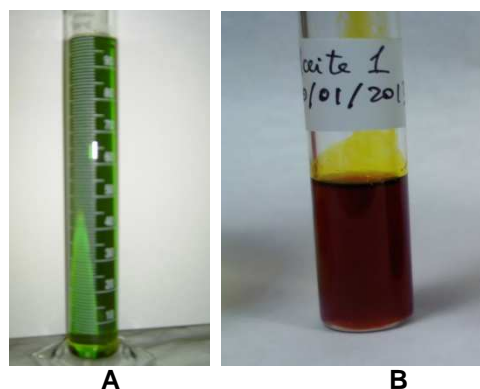


Figura 1. (A) Microalga *Scenedesmus almeriensis* y (B) extracto de luteína (5 mg/ml).

Las medidas de color se han realizado utilizando un espectrocolorímetro Konica Minolta CM-5 conectado a un ordenador dotado del software SpectraMagic NX PRO USB. El equipo proporciona medidas en el espacio de color CIELAB. Suponemos iluminante D65 y observador patrón colorimétrico CIE 1931 en nuestras medidas colorimétricas. Tras la correspondiente calibración del instrumento se procedió a medir los parámetros de color para las muestras. Así, se colocaron 14 ml de aceite en una cubeta transparente de cuarzo con unas dimensiones de 4.2 x 3.2 x 1.0 cm. Tras la medida inicial para caracterizar el aceite sin adición de luteína, se inició el enriquecimiento, mediante sucesivas adiciones de 100 μ l de extracto concentrado de luteína y se midieron los valores de los parámetros colorimétricos de cada muestra generada (L^* , a^* , b^*), así como los correspondientes a las variaciones de los mismos por comparación con el aceite original (ΔL^* , Δa^* , Δb^* y ΔE^*_{ab}). Los resultados de diferencias de color usando fórmulas de diferencia de color avanzadas como CIEDE2000 [11], son similares a los obtenidos con CIELAB. La Figura 2 muestra los diferentes aceites ensayados antes de las adiciones de luteína.

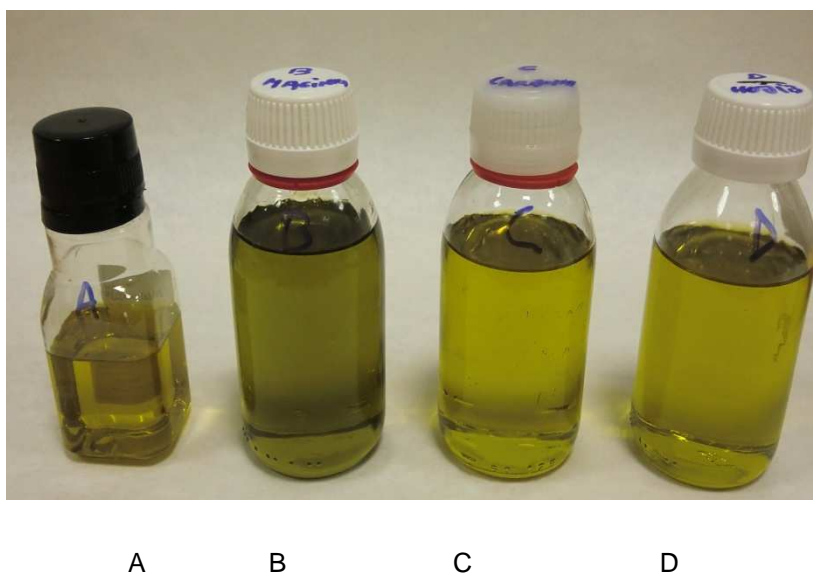


Figura 2. Aceites de oliva virgen extra empleados en las experiencias de enriquecimiento en luteína. A) Melgarejo, B) Santuario de Mágina, C) Carbonell y D) Hojiblanca.

RESULTADOS

Con el extracto de luteína obtenido, procedente del correspondiente tratamiento de la biomasa de la microalga *Scenedesmus almeriensis*, se ha procedido a caracterizar los diferentes aceites de oliva virgen adquiridos con diferentes denominaciones de origen (Tabla 1). Los datos de color de la Tabla 1 (por ejemplo, altos valores de L^*) no se corresponden bien con los colores

observados en la Figura 2, ya que los datos de la Tabla 1 corresponden a medidas de color por transmisión en muestras con un espesor menor que el de las muestras de la Figura 2. En la Tabla 1 puede también observarse que los aceites “Melgarejo” y “Carbonell” tienen coordenadas de color muy parecidas, pero aún así nos interesa estudiar el cambio de color que las adiciones de luteína producen en cada uno de ellos, ya que su composición química puede ser muy diferente, como puede por ejemplo inferirse de su diferente acidez.

Tabla 1. *Parámetros colorimétricos y características de los aceites de oliva virgen extra usados en las experiencias de enriquecimiento en luteína procedente de la microalga Scenedesmus almeriensis*

Aceite de Oliva	Procedencia	Variación aceituna	Acidez %	L*	a*	b*
A: Melgarejo	Pegalajar (Jaén)	Picual	0'19	88'8	1'3	109'0
B: Santuario de Mágina	Huelma (Jaén)	Picual	0'4	81'9	5'10	122'3
C: Carbonell	Nacional	Picual, arbequina	0'6	88'0	0'72	105'3
D: Hojiblanca	Antequera (Málaga)	Hojiblanca	0'5	87'8	1'69	111'8

Tras cada una de las adiciones de 100 µl de extracto de luteína, se homogeniza la muestra de aceite enriquecido y se mide el color con el espectrocolorímetro, obteniéndose los parámetros correspondientes a las muestras generadas y las diferencias de color con el aceite original al que no se había añadido luteína. A título de ejemplo se muestran en las Tablas 2 y 3 datos correspondientes a los aceites Santuario de Mágina y Hojiblanca.

Tabla 2. *Parámetros colorimétricos en la adición de luteína sobre aceite de oliva virgen extra “Santuario de Mágina”. Extracto de luteína adicionado [luteína]= 5 mg/ml. Volumen inicial de aceite en cubeta = 14 ml.*

Muestra	Luteína Adicionada (ml)	L*	a*	b*	ΔE_{ab}^*	[luteína] mg/ml	mg luteína/kg aceite
0	-	81'9	5'10	122'3	-	-	
1	0.1	79'7	11'5	129'2	9'6	0'04	43.6
2	0.2	77'8	16'2	128'6	13'4	0'07	76.3
3	0.3	76'4	19'6	127'2	16'3	0'10	109
4	0.4	74'9	23'3	125'8	19'8	0'14	153
5	0.5	73'9	25'5	124'3	22'1	0'17	185
6	0.6	72'8	27'3	123'1	24'0	0'21	229
7	0.7	71'9	29'0	121'8	25'9	0'24	261
8	0.8	71'1	30'2	120'8	27'4	0'27	294
9	0.9	70'2	31'7	119'5	29'2	0'30	327
10	1.0	69'4	32'9	118'2	30'8	0'33	360

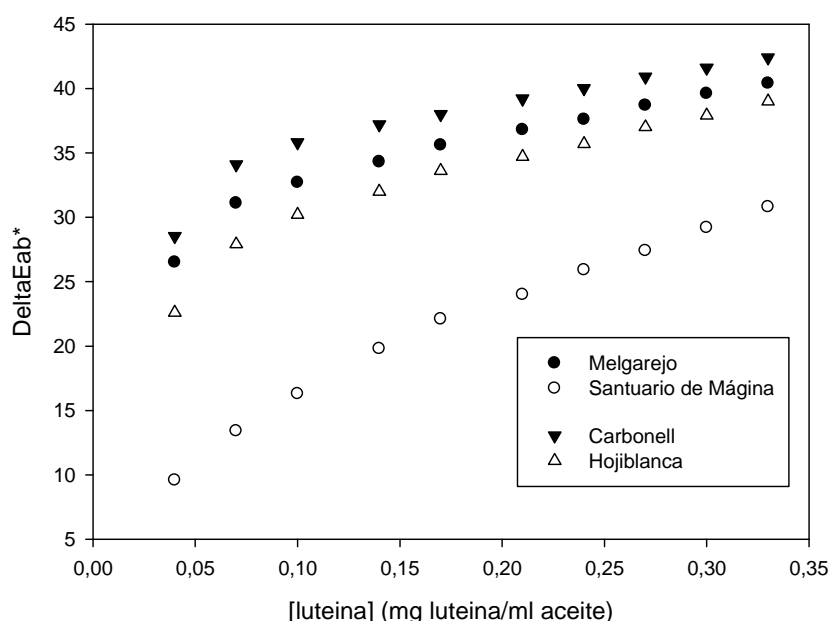
Los resultados obtenidos muestran que a medida que añadimos luteína, el color del aceite va cambiando desde las tonalidades iniciales amarillo-verdosas de los diferentes aceites de oliva virgen extra, en la dirección que marca el extracto fuertemente anaranjado de luteína. La adición de luteína produce un fuerte incremento en los valores de la coordenada a*, como cabría esperar, y se observa que también la coordenada b* sufre modificaciones importantes en algunos de los aceites (e.g. “Hojiblanca” de la Tabla 3). El valor de ΔE_{ab}^* crece de forma continua conforme se adiciona extracto y es interesante resaltar que de los cuatro aceites ensayados, el que genera menor variación del parámetro ΔE_{ab}^* es el correspondiente a Santuario de Mágina (Tabla 2).

Tabla 3. Parámetros colorimétricos en la adición de luteína sobre aceite de oliva virgen extra "Hojiblanca". Extracto de luteína adicionado [luteína]= 5 mg/ml. Volumen inicial de aceite en cubeta =14 ml.

Muestra	Luteína Adicionada (ml)	L*	a*	b*	ΔE_{ab}^*	[luteína] mg/ml	mg lutiena/kg aceite
0	-	87'8	1'69	111'8	-	-	
1	0.1	84'8	10'2	132'5	22'6	0'04	43.6
2	0.2	82'5	16'5	134'9	27'9	0'07	76.3
3	0.3	80'6	21'2	133'6	30'2	0'10	109
4	0.4	78'9	24'8	132'2	32'1	0'14	153
5	0.5	77'6	27'5	130'6	33'6	0'17	185
6	0.6	76'6	29'6	129'2	34'7	0'21	229
7	0.7	75'8	31'1	128'2	35'7	0'24	261
8	0.8	74'7	32'9	126'6	37'0	0'27	294
9	0.9	73'7	34'3	125'2	37'9	0'30	327
10	1.0	72'9	35'6	124'0	39'0	0'33	360

En la Figura 3 se observa que el efecto de la adición de luteína en los cuatro aceites es similar, si bien destaca un poco más la trayectoria correspondiente al aceite "Santuario de Mágina" ya que el cambio de color con la primera adición de luteína es de 9'6 unidades CIELAB, bastante menor que el que se obtiene para los otros tres aceites (por encima de 20 unidades CIELAB). Esta diferencia entre el comportamiento colorimétrico de los cuatro aceites estudiados puede estar relacionada con el hecho de que el color inicial del aceite "Santuario de Mágina" es bastante diferente al de los otros tres aceites (véase Tabla 1). En efecto, al ser su coordenada b^* tan elevada ($b^*=122'3$), la primera adición de luteína difícilmente consigue aumentar aún más dicha coordenada, por lo que la diferencia de color total que produce dicha adición es bastante menor que la que se observa en los demás aceites. Por otra parte, la Figura 3 muestra que, salvo para el aceite de oliva "Santuario de Mágina", en las primeras adiciones de luteína el color cambia más que en las últimas; es decir, hay una cierta tendencia asintótica o de estabilización del color a partir de cierta cantidad de luteína adicionada.

Figura 3. Variación de los parámetros colorimétricos en aceites de oliva virgen extra en función del enriquecimiento en luteína en los mismos.



A la vista de los datos puede deducirse que una adición de luteína de 600 µl de extracto, genera aceites con una concentración de luteína igual a 0'21 mg/ml, concentración que haría que la ingesta media estimada por el COI (Comité Oleícola Internacional) y la FEN (Federación Española de Nutrición) para la población de España, que es de 30 ml por persona y día, fuera suficiente para incorporar los 6 mg de luteína que se estima que son necesarios para la prevención de enfermedades degenerativas tales como las comentadas anteriormente. El color que se obtiene con la adición de luteína obviamente difiere del aceite original, siendo lógicamente más anaranjado debido a las características propias del extracto de luteína, debiendo abordarse como otra línea de investigación paralela y complementaria, los estudios de aceptabilidad y preferencia de este tipo de aceites por parte de los potenciales consumidores (Figura 4).

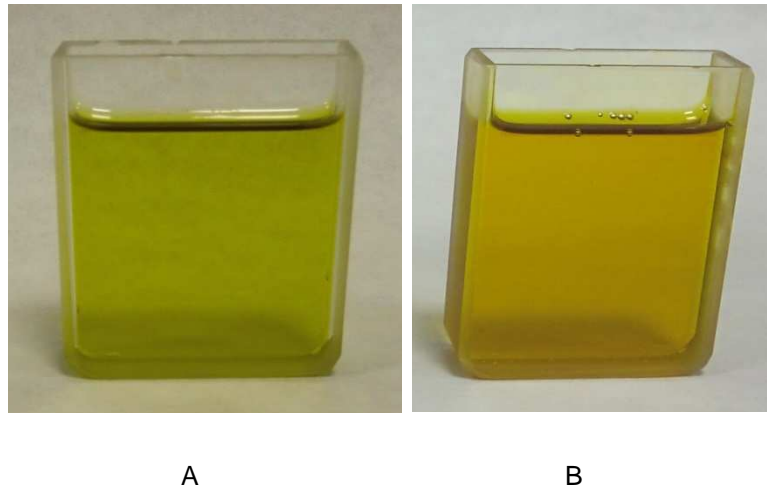


Figura 4. Variación del color en aceite de oliva virgen extra Santuario de Mágina (A) y el mismo aceite enriquecido con luteína hasta una concentración igual a 0'21 mg/ml (muestra 6 de la Tabla 2).

CONCLUSIONES

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado una metodología para la extracción de luteína procedente de la microalga *Scenedesmus almeriensis* y ha estudiado su incorporación al aceite de oliva como medio de incorporación idóneo para ingerir las cantidades necesarias y prevenir la aparición de ciertas enfermedades.

Se han podido solubilizar cantidades adecuadas de luteína en los diferentes aceites de oliva virgen ensayados y se han estudiado colorimétricamente los mismos, prestando especial atención a los cambios de color producidos por la adición del antioxidante. Estos resultados son esperanzadores en cuanto a la posible utilización de aceite de oliva como medio de incorporación de luteína en nuestro organismo, si bien deben ser completados con estudios de propiedades fisicoquímicas de los aceites enriquecidos y de estabilidad de los mismos, respecto de parámetros tales como la temperatura y el tiempo, así como también de preferencias y emociones de color de los aceites aditivados frente a los originales, por parte de personas de España u otros países.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Jaén, por la financiación recibida a través del Proyecto del Plan Propio UJA 2011/13/09 que ha permitido el desarrollo de los estudios presentados. A la Caja Rural de Jaén por el correspondiente patrocinio.

REFERENCIAS

- [1] Kijlstra, A., Tian, Y., Kelly, E., Berendschot, T. (2012) Lutein: more than just a filter for blue light, *Progress in Retinal and Eye Research* 31, 303-315.
- [2] Brenna, O.V. & Berardo, N., (2004). Application of Near-Infrared Reflectance Spectroscopy (NIRS) to the Evaluation of carotenoids content in maize. *Journal of Agricultural and food chemistry*, 52: 5577-5582.
- [3] Demming-Adams, B. & W.W.Adams III (2002). Antioxidants in Photosynthesis and Human Nutrition. *Science*, 298, 2149-2153.
- [4] Granado, F., Olmedilla B. & Blanco, I. (2003). Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *British Journal of Nutrition*, 90:487-502.
- [5] Del Campo, J.A., H.Rodríguez, J.Moreno, M.A.Vargas, J.Rivas & M.G.Guerrero (2001). Lutein production by *Muriellopsis* sp. in an outdoor tubular photobioreactor. *J.Biotechnol.*, 85, 289-295.
- [6] García-González M., Moreno, J., Manzano, C., Florencio, F. J., Garcia Guerrero, M., (2005) Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology* 115:81–90.
- [7] Fernández, J.M., Acién, F.G., Molina, E., (2010) Biotechnological production of lutein and its applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86-1, 27-40.
- [8] Cichelli, A. & Pertesana, G.P., (2004). High-performance liquid chromatography analysis of chlorophylls, pheophytins and carotenoids in virgin olive oils: chemometric approach to variety classification. *Journal of Chromatography A*, 1046: 141-146.
- [9] Nidhi, B. y Baskaran, V,(2011) Influence of vegetable oils on micellization of lutein in a simulated digestion model, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88, 367-372.
- [10] Cerón García, M.C., Campos Pérez, I., Macías Sánchez, M.D., Bermejo Román, R., Fernández Sevilla, J.M and Molina Grima, E. (2010) Stability of carotenoids in *Scenedesmus almeriensis* biomass and extracts under storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6944-6950.
- [11] CIE 142-2001 "Improvemento t industrial colour-difference evaluation". Comisión Internacional de Iluminación, Viena, 2001.



COMUNICACIONES EN CONGRESOS

Autores: R. Bermejo, P. Limón, F. Gabriel Acién, J.M. Fernández- Sevilla y M. Melgosa.

Título: Using B-phycoerythrin from microalgae as a natural colorant to reproduce the color in commercial strawberry yogurts.

Tipo de participación: Comunicación (Póster)

Congreso: 12th International AIC Congress 2013 (Congreso Internacional de la Asociación Internacional del Color, AIC 2013).

Lugar celebración: Newcastle (England)

Fecha: 2013



AIC Colour 2013

12th Congress of the International
Colour Association
8-12 July, 2013
Newcastle upon Tyne, UK

Proceedings Volume 3

Editors:
Lindsay MacDonald,
Stephen Westland,
Sophie Wuerger

The Colour Group (Great Britain)



International Colour Association
Internationale Vereinigung für die Farbe
Association Internationale de la Couleur



Using B-phycoerythrin from microalgae as a natural colorant to reproduce the color in commercial strawberry yogurts

Ruperto BERMEJO¹, Piedad LIMÓN¹, F. Gabriel ACIÉN-GERNÁNDEZ², J. María FERNÁNDEZ-SEVILLA², Manuel MELGOSA³

¹ Department of Physical and Analytical Chemistry, E.P. S. of Linares, Jaén University

² Department of Chemical Engineering, Almería University, Almería

³ Department of Optics, Granada University, Granada

ABSTRACT

Colorants are additives widely used in industrial sectors such as food, drinks and cosmetics. Actually, a high percentage of colorants used are synthetic and many of them can produce toxic reactions in susceptible organisms. Thus, there is a growing interest in searching new molecules with good coloring capacity to expand the catalogue of natural colorants available in the market. In this sense, phycobiliproteins are proteins that form light-harvesting antenna complexes (phycobilisomes) and act as photosynthetic accessory pigments in cyanobacteria and red algae. Phycobiliproteins consist of three main groups: phycoerythrins (PEs), phycocyanins (PCs) and allophycocyanins (APCs). Particularly, B-phycoerythrin (B-PE) has been shown to be particularly useful due to its high fluorescence efficiency and its intense and unique pink color. This protein has excellent spectroscopic properties, stability, high absorption coefficient and high quantum yield. For this reason, B-phycoerythrin has potential as natural colorant for use in food, cosmetics and pharmaceuticals, particularly as substitute of current synthetic dyes. Although natural colorants are widely found in nature, the major obstacle for their introduction as additives is the high investment required in their purification processes. We have developed a new methodology named “expanded bed adsorption chromatography” (EBAC) to obtain large quantities of phycobiliproteins simplifying the downstream-processing flow sheets for the recovery of phycobiliproteins, with concomitant savings in equipment and operating costs.

In order to study the usefulness of B-PE as a natural colorant, a B-PE extract from the microalga *Porphyridium cruentum* was obtained by EBAC, and has been used to generate different pink colors in yogurts. We have added increasing amounts of B-PE to a fixed white yogurt measuring the corresponding CIELAB color parameters, and obtaining that, while a* coordinate increases, both b* and L* decrease, as it could be expected from the intense pink color of the B-PE extract. More specifically, additions of increasing quantities of B-PE extract produced an almost asymptotic trend in the values of a*, b* and L* coordinates, particularly in a* values. We have analyzed whether the color of four different commercial strawberry yogurts, which incorporated in their composition a pink synthetic dye, can be also achieved using our B-PE natural colorant added to the white yogurt. We found that for just one of the four commercial yogurts, the addition of a small amount of B-PE extract (0.05 ml) to the white yogurt led to a minimum value of 2.9 CIELAB units, which means an acceptable reproduction of the color of this pink commercial yogurt using

our natural colorant. However, for the other three commercial yogurts, we needed to add 0.125, 1.150 and 0.200 ml of B-PE extract to the white yogurt, respectively, in order to obtain a color-difference below 5.0 CIELAB units. Current results are encouraging about the usefulness of B-phycoerythrin as a natural colorant in some industrial applications.

1. INTRODUCTION

Existen numerosos estudios que indican que los colorantes sintéticos son potencialmente tóxicos e incluso cancerígenos, generando reacciones alérgicas en individuos susceptibles (Arad and Yaron, 1992). Por esto, existe una demanda creciente por parte de los consumidores, de reemplazar los colorantes sintéticos por compuestos de origen natural, a la que los sectores industriales implicados deben dar respuesta. Es importante resaltar en este contexto, que estos problemas no aparecen cuando se utilizan compuestos naturales obtenidos a partir de organismos vivos, denominados biocolorantes. Sin embargo, el catálogo recientemente aprobado por la Unión Europea (EFSA, 2012), contiene un número de colorantes naturales relativamente pequeño en comparación con los de tipo sintético, siendo predominante la utilización de estos últimos en los sectores industriales vinculados.

Por otro lado, las biliproteínas son macromoléculas biológicas altamente fluorescentes e hidrosolubles, estando encargadas de la captación de luz en organismos fotosintéticos tales como las microalgas. Estas proteínas se utilizan en diversas aplicaciones biotecnológicas (Glazer, 1999). Además, poseen elevados coeficientes de extinción, colores muy intensos y atractivos, haciendo que estas biomoléculas posean un elevado potencial de utilización como colorantes naturales. Las biliproteínas más abundantes en la naturaleza son las ficoeritrinas (rosas, rojas y anaranjadas) y las ficocianinas (azules y moradas). Por tanto, la gama y la intensidad de colores disponibles, así como la abundancia relativa de estas proteínas en los organismos de procedencia, hacen de estas macromoléculas, excelentes candidatos para su empleo como colorantes, constituyendo una alternativa real para el incremento y diversificación de la oferta de colorantes naturales existentes en el mercado. Nuestro grupo de investigación ha desarrollado una novedosa metodología para la obtención de grandes cantidades de biliproteínas mediante adsorción en lecho expandido, por lo que dispone de cantidad suficiente para abordar ensayos de utilización como colorantes en diferentes matrices como alimentos y bebidas (Bermejo et al., 2007; Bermejo and Ramos, 2012; Ramos et al., 2010).

En este trabajo se ha utilizado una disolución enriquecida en B-ficoeritrina, como nuevo extracto colorante procedente de la microalga *Porphyridium cruentum*, para ensayar sus propiedades en matrices alimenticias como las constituidas por yogures, habiéndose realizado la caracterización colorimétrica de éstas.

2. METHOD

Las medidas de color se han realizado utilizando un espectrocolorímetro Konica Minolta CM-5 conectado a un ordenador dotado del software SpectraMagic NX PRO USB. El equipo proporciona medidas en el espacio de color $L^*a^*b^*$ y en el $L^*C^*h^*$. Tras la

correspondiente calibración del instrumento se procedió a medir los parámetros de color para las muestras. Así, se colocaron 15 g de muestra en una cubeta transparente de cuarzo con unas dimensiones de 4.2 x 3.2 x 1.0 cm. De esta forma, se obtuvieron los parámetros L^* , a^* , b^* , C^* y h^* correspondientes a la muestra, además de la diferencia de color de dicha muestra con respecto al estándar empleado (ΔL^* , Δa^* , Δb^* , ΔC^* , Δh^* y ΔE^*_{ab}).



Figura 1. Colorante natural utilizado: ficeoeritrina (rosa, procedente de *Porphyridium*).

Se han utilizado distintos tipos de yogures de fresa con el objetivo de intentar reproducir el color de éstos. Así, se ha estudiado la coloración de cada muestra a través de la adición de cantidades crecientes del extracto de B-ficeoeritrina obtenido a partir de biomasa de la microalga roja *Porphyridium cruentum* (Figura 1). Como estándar, se ha utilizado el yogur de cada marca natural (blanco) es decir, un producto con los mismos componentes que los comerciales coloreados pero sin la presencia de colorantes. En cuanto a la preparación de las muestras se pesaron 15g de matriz y, se les fue adicionando volúmenes crecientes del extracto de colorante natural. En todos los casos fue necesaria la correcta homogeneización de las muestras tras las adiciones del extracto. Así, la adición final fue aquella que produjo diferencias de color con la muestra comercial ensayada $\Delta E^*_{ab} \leq 5$.

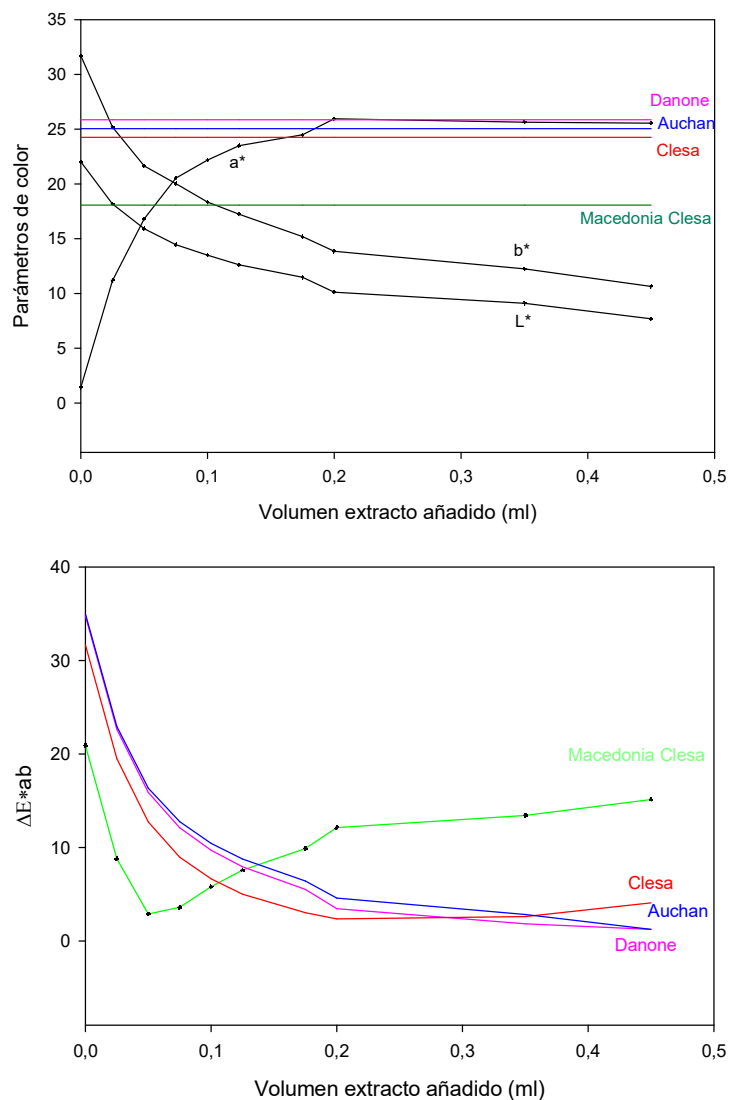
3. RESULTS AND DISCUSSION

El colorante utilizado han sido el extracto de B-ficeoeritrina obtenido previamente por nuestro grupo, a partir de la microalga correspondientes (Bermejo et al., 2007) y cuyos parámetros colorimétricos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Denominación, coordenadas cromáticas y propiedades físico-químicas de los biocolorantes utilizados en los ensayos de apreciación de color.

Biocolorante (extracto proteico enriquecido)	Microalga de Procedencia	Color natural	Concentración Proteína [mg/ml]	L^*	a^*	b^*
Ficeoeritrina	<i>Porphyridium cruentum</i>	Rosa	0.23	37.42	72.57	-8.25

Se han determinado las curvas de saturación de color del extracto añadido sobre cada matriz comercial ensayada, y se ha determinado el volumen de extracto necesario para aproximarse al color de los diferentes productos comerciales utilizados. Como el color no está compuesto por una única coordenada cromática, sino por el conjunto de parámetros ($L^*a^*b^*$), para cuantificar la desviación del color obtenido respecto al de los productos comerciales, se ha utilizado además el parámetro ΔE^*ab . De esta forma, se ha analizado tras cada adición de extracto colorante, el espectro de transmitancia dejando de añadir, cuando dicho espectro solapa aproximadamente con el correspondiente al del producto comercial de referencia. Es decir, se toma como volumen final de extracto necesario para lograr reproducir el producto comercial, aquel que genera una muestra con parámetros cromáticos similares a los de la muestra de referencia.



A **B**

Figura 2. Variación de la coordenadas cromáticas a^* , b^* y L^* (A) y de ΔE^*ab (B) con el volumen de biocolorante "ficoeritrina", añadido sobre yogur natural. Como referencia, aparecen los valores de a^* para diferentes yogures comerciales de fresa.

Como ejemplo, la Figura 2 muestra la variación de los parámetros cromáticos a^* y ΔE^*ab en las experiencias de aplicación del biocolorante “ficoeritrina” sobre la matriz de referencia (yogur natural) para tratar de reproducir diferentes yogures comerciales de fresa. Los resultados muestran como los productos comerciales difieren mucho entre sí, con valores de a^* entre 18 y 26. En el caso del producto con menor valor de a^* (yogur macedonia Clesa), son solo necesarios 0.05 mL de extracto para alcanzar el valor de a^* de referencia, mientras que en los otros se requieren entre 0.175-0.200 mL para alcanzar dicho valor. Además, los resultados muestran como la desviación de color (ΔE^*ab) disminuye cuanto mayor es el volumen de extracto añadido. Los parámetros de color y la simple apreciación visual de las muestras mostró una elevada similitud con los productos comerciales (Figura 3). Este hecho pone de manifiesto las buenas cualidades, como colorante natural, del extracto utilizado y los valores suficientemente bajos de volúmenes de extracto colorante para alcanzar un color similar a cada muestra comercial (Tabla 2).

Tabla 2. Volúmenes de extracto de ficoeritrina, necesarios adicionar a yogur natural, para intentar reproducir distintas marcas comerciales.

Yogur	Parámetro a^*	Volumen extracto necesario para reproducir a^* (μ l)	Volumen extracto para $\Delta E^*ab \leq 5$ (μ l)
Fresa Danone	25'86	200	175
Fresa Clesa	24'26	175	125
Fresa Auchan	25'05	175	200
Macedonia Clesa	18'07	50	50



Figura 3. Muestras comerciales y generadas con los nuevos colorantes ensayados sometidas a panel visual en cabina de comparación de color. Comparación con yogures de fresa comerciales.

4. CONCLUSIONS

La solubilidad de las biliproteínas en los medios ensayados es buena, modificándose el color de las diversas matrices con pequeños volúmenes de extractos proteicos. Así, los factores de tinción, calculados como cantidad de extracto biocolorante necesario (por unidad de volumen o masa de matriz) para reproducir el producto comercial ensayado, son bastante bajos, lo que indica el importante poder colorante de estas macromoléculas.

La cantidad de extracto biocolorante a añadir depende en primer lugar del color del producto comercial que se quiere alcanzar, ya que como se ha demostrado, yogures de similares características presentan colores muy diferentes. Por otro lado, depende de la naturaleza y concentración del extracto, pero sobre todo, es función de la propia matriz. Los resultados obtenidos demuestran que para un mismo extracto, el valor de color alcanzado varía enormemente en función de la matriz utilizada. Estos resultados ponen de manifiesto la posibilidad de utilizar extractos de biliproteínas de origen microalgal, como colorantes naturales en alimentación.

ACKNOWLEDGEMENTS

A la Junta de Andalucía, por la financiación recibida a través del Proyecto de Excelencia P06-TEP-01362 que ha permitido el desarrollo de los estudios presentados. Al Departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Almería, por su colaboración en el desarrollo de los cultivos de microalgas de las que se han obtenido los colorantes naturales.

REFERENCES

- S. Arad, A. Yaron, "Natural pigments from red microalgae for use in foods and cosmetic", Trends Food Sci. Technol., 3, 92-91 (1992).
- European Food Safety Authority; <http://www.efsa.europa.eu/fr/topics/foodcolours>(EFSA, 2011).
- A.N. Glazer, in: Z. Cohen (Ed.), "Chemicals from Microalgae", Chapter 11, UK: Taylor and Francis Ltd., 261-280 (1999).
- R. Bermejo, E. Ruiz, F.G. Acién, "Recovery of B-phycoerythrin using EBA chromatography: scale-up of the process", Enzyme and Microbial Technology, 40, 927-933 (2007).
- A. Ramos, F.G. Acién, J.M. Fernández, C. González, R. Bermejo, "Large-scale isolation and purification of C-phycoerythrin from the cyanobacteria *Anabaena marina* using EBA chromatography", J. Chem. Technol. Biotechnol, 85, 783-792 (2010).
- R. Bermejo and A. Ramos: "Pilot scale recovery of C-phycoerythrin from *Spirulina platensis* using expanded bed adsorption chromatography", Chromatographia, 75, 195-204 (2012).

Address: Prof. Ruperto Bermejo, Department of Physical and Analytical Chemistry, E.P. S. of Linares, Jaén University, C/ Alfonso X El Sabio, nº28, 23700 Linares, Jaén (Spain)
E-mails: rbermejo@ujaen.es; pidily@gmail.com; acien@ual.es; jfernand@ual.es; mmelgosa@ugr.es



COMUNICACIONES EN CONGRESOS

Autores: R. Bermejo, P. Limón, A. Navarro, A. Ortiz, M.P. Fernández, F. Gabriel Ación, J.M. Fernández y M. Melgosa.

Título: Stability assesment of virgin olive oils enriched with new antioxidants using spectrophotometric color monitorization.

Tipo de participación: Comunicación (Póster)

Congreso: XXIV Reunión Nacional de Espectroscopía. VII Congreso Ibérico de Espectroscopía

Lugar celebración: Logroño-LaRioja (Spain)

Fecha: 2014

**XXIV Reunión Nacional y
VIII Congreso Ibérico de
ESPECTROSCOPIA**

ABSTRACT BOOK



**XXIV RNE – VIII CIE
ESPECTROSCOPIA**

Logroño, 9-11 de julio de 2014



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**



**XXIV RNE - VIII CIE
ESPECTROSCOPIA**

La Presidenta del Comité Organizador Local hace constar que la comunicación

***Stability assessment of virgin olive oils
enriched with new natural antioxidants
using spectrophotometric colour
monitorization***

cuyos autores son

**R. Bermejo, P. Limón, A. Navarro, A. Ortiz,
M.P. Fernández-Liencres, F.G. Ación-Fernández,
J.M. Fernández-Sevilla, M. Melgosa**

ha sido presentada en forma de cartel en la
XXIV Reunión Nacional de Espectroscopia - VIII Congreso Ibérico de Espectroscopia,
celebrada en Logroño (La Rioja) del 9 al 11 de julio de 2014.

Logroño, a 11 de julio de 2014.

M.ª Teresa Tena Vázquez de la Torre
Presidenta del Comité Organizador Local



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

Stability assessment of virgin olive oils enriched with new natural antioxidants using spectrophotometric color monitorization

R. Bermejo¹, P. Limón¹, A. Navarro¹, A. Ortiz¹, M. P. Fernández-Liencre¹, F.G. Ación-Fernández², J.M. Fernández-Sevilla² and M. Melgosa³.

(1) Department of Physical and Analytical Chemistry, High Politechnical School of Linares, University of Jaén, Jaén (Spain). E-mail: rbermejo@ujaen.es

(2) Department of Chemical Engineering, University of Almería, Almería (Spain).

(3) Department of Optics, University of Granada, Granada (Spain).

Today there is a growing interest in the development of functional foods, which are those able to provide beneficial effects on health, in addition to their nutritional or energetic values. Usually these products are traditional foods enriched with one or several components promoting beneficial effect on human health.

Lutein is a yellow natural pigment of the carotenoid family that is selectively accumulated in different parts of the human eye, and is especially abundant at the centre of the human eye retina (macula), displaying important biological activities (i.e. antioxidant, blue light filter). The interest in lutein (macular pigment) has recently increased on the basis of different studies suggesting the protective effect resulting from an adequate intake of this pigment in the prevention and evolution of human-degenerative eye diseases (i.e. age-related macular degeneration, cataracts and maculopathy) [1,2]. The estimated daily lutein uptake by eating fruits and vegetables (1.5 mg/day) is not enough to reach the recommended value (6 mg/day). Therefore, for risk groups (elderly population) and people in general it would be important an adequate lutein intake through functional foods.

In the present paper, we describe the stability of virgin olive oils (VOOs) enriched with lutein obtained from the microalga *Scenedesmus almeriensis* using a previously described methodology [3]. Different varieties of VOOs have been enriched with lutein extract (5 mg/ml) obtaining a new functional food which seems a suitable conduction medium to provide this antioxidant to human organism in order to prevent eye diseases. In this sense, we have obtained VOOs enriched between 0.1 and 0.21 mg lutein/ml oil. This concentration range allows administering the daily-recommended lutein intake taking into account the estimated VOOs average consumption (30 ml per habitant and day).

We focus on the stability of a set of 10 VOOs as a function of three main degradation variables (time, temperature and light exposure) considering lutein-enriched VOOs in comparison with control VOOs (oils without antioxidant added). As it is well known, oil stability depends on chemical composition, which can be tracked using spectrophotometric color determinations. So, we used an application-based approach, employing the CIELAB color space rather than the analysis of transmittance spectra to assess the observed color changes (ΔE^*_{ab}). The results obtained were different depending on VOOs utilized but, in all cases, the VOOs enriched with lutein were more stable than the control ones. These results show that lutein-enriched VOOs could be successfully used like functional foods with additional health properties as an alternative way in the fight against some specific human degenerative diseases.

Acknowledgements

Financial support from University of Jaén and "Caja Rural de Jaén" (Research Project: UJA2011/13/09) is gratefully acknowledged.

References

- [1] A. Kijlstra, Y. Tian, E. Kelly, T. Berendschot. Lutein: more than just a filter for blue light, *Progress in Retinal and Eye Research* (2012) 31, 303-315.
- [2] F. Granado, B. Olmedilla, I. Blanco, I. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. *British Journal of Nutrition*, (2003) 90:487-502.
- [3] J.M. Fernández-Sevilla, F.G. Gabriel Ación-Fernández, E. Molina. Biotechnological production of lutein and its applications, *Appl. Microbiol. Biotech.* (2010) 86, 27-40.



STABILITY ASSESSMENT OF VIRGIN OLIVE OILS ENRICHED WITH NEW NATURAL ANTIOXIDANTS USING SPECTROPHOTOMETRIC COLOR MONITORIZATION



Ruperto Bermejo¹, Piedad Limón¹, Amparo Navarro¹, Antonio Ortiz¹, M.P. Fernández-Lienres¹, F. Gabriel Acién-Fernández², J. María Fernández-Sevilla² and Manuel Melgosa³

¹ Department of Physical and Analytical Chemistry, E.P. S. of Linares, Jaén University

² Department of Chemical Engineering, Almería University, Almería

³ Department of Optics, Granada University, GranadaSpain

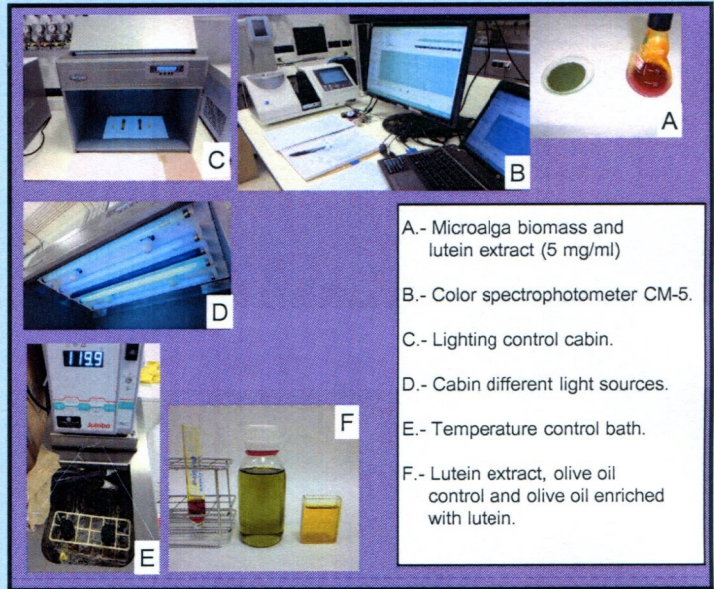
C/ Alfonso X El Sabio, 28 (Linares, Jaén, SPAIN); Phone: 34-953-648513; FAX: 34-953-648560; e-mail: rbermejo@ujaen.es

INTRODUCTION

Today there is a growing interest in the development of functional foods, which are those able to provide beneficial effects on health, in addition to their nutritional or energetic values. Usually these products are traditional foods enriched with one or several components promoting beneficial effect on human health.

Lutein is a yellow natural pigment of the carotenoid family that is selectively accumulated in different parts of the human eye, and is especially abundant at the centre of the human eye retina (macula), displaying important biological activities (i.e. antioxidant, blue light filter). The interest in lutein (macular pigment) has recently increased on the basis of different studies suggesting the protective effect resulting from an adequate intake of this pigment in the prevention and evolution of human-degenerative eye diseases (i.e. age-related macular degeneration, cataracts and maculopathy) [1,2]. The estimated daily lutein uptake by eating fruits and vegetables (1.5 mg/day) is not enough to reach the recommended value (6 mg/day). Therefore, for risk groups (elderly population) and people in general it would be important an adequate lutein intake through functional foods.

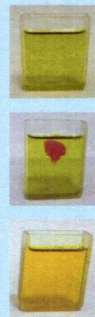
VIRGIN OLIVE OIL CHARACTERIZATION



- A.- Microalga biomass and lutein extract (5 mg/ml)
- B.- Color spectrophotometer CM-5.
- C.- Lighting control cabin.
- D.- Cabin different light sources.
- E.- Temperature control bath.
- F.- Lutein extract, olive oil control and olive oil enriched with lutein.

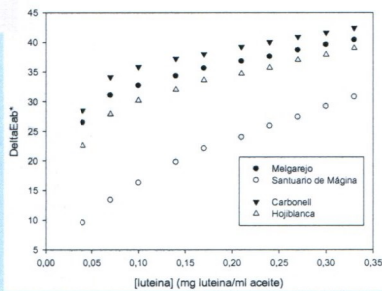
RESULTS and DISCUSSION

Olive Oil	From	L*	a*	b*	ΔE_{ab}^*	[lutein] mg/ml
FuenRoble	Orcera (Jaén)	78'81 71'10	6'91 25'81	123'13 120'28	- 20'60	0'21
Santuario de Mágina	Huelma (Jaén)	81'9 72'8	5'10 2'73	122'3 123'1	- 24'00	0'21
Oro Bailén	Bailén (Jaén)	83'68 73'62	1'79 26'57	119'15 124'32	- 27'24	0'21
Oro Génave	Génave (Jaén)	86'42 76'70	2'63 27'31	120'52 129'05	- 27'86	0'21
Hojiblanca	Antequera (Málaga)	87'8 76'6	1'69 29'6	111'8 129'2	- 34'7	0'21
La Cántara	Cambil (Jaén)	87'39 76'41	0'33 28'5	107'96 128'8	- 36'68	0'21
Melgarejo	Pegalajar (Jaén)	88'8 77'4	1'30 29'2	109'0 130'4	- 36'8	0'21
Carbonell	Nacional	88'0 76'7	0'72 29'6	105'3 129'3	- 39'0	0'21
Garay	Lucena (Córdoba)	88'18 77'40	0'67 27'9	102'6 130'17	- 40'22	0'21
Baena	Baena (Córdoba)	88'75 76'82	0'46 29'18	102'14 129'51	- 41'43	0'21
Abades	Loja (Granada)	89'08 78'07	-0'03 27'96	102'66 131'20	- 41'46	0'21

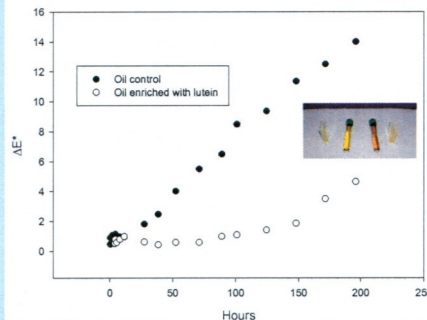


We describe the stability of virgin olive oils (VOOs) enriched with lutein obtained from the microalga *Scenedesmus almeriensis* using a previously described methodology [3]. Different varieties of VOOs have been enriched with lutein extract (5 mg/ml) obtaining a new functional food which seems a suitable conduction medium to provide this antioxidant to human organism in order to prevent eye diseases. In this sense, we have obtained VOOs enriched between 0.1 and 0.21 mg lutein/ml oil. This concentration range allows administering the daily-recommended lutein intake taking into account the estimated VOOs average consumption (30 ml per habitant and day).

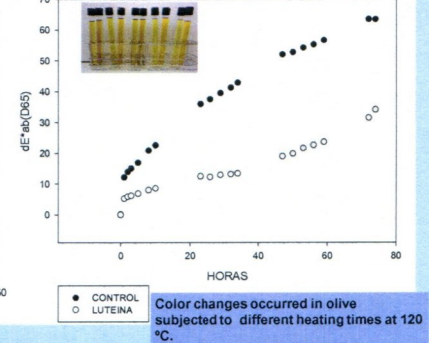
CIELAB color space parameters of virgin olive oils



PHOTOSTABILITY: Color change monitoring under uv-light exposure. Example: "Oro Génave"



STABILITY WITH TEMPERATURE: Color change monitoring



Muestra	Luteína Adicionada (ml)	L*	a*	b*	ΔE_{ab}^*	[luteina] mg/ml	mg luteina/kg aceite
0	-	81'9	5'10	122'3	-	-	-
1	0.1	79'7	11'5	129'2	9'6	0'04	43.6
2	0.2	77'8	16'2	128'6	13'4	0'07	76.3
3	0.3	76'4	19'6	127'2	16'3	0'10	109
4	0.4	74'9	23'3	125'8	19'8	0'14	153
5	0.5	73'9	25'5	124'3	22'1	0'17	185
6	0.6	72'8	27'3	123'1	24'0	0'21	229
7	0.7	71'9	29'0	121'8	25'9	0'24	261
8	0.8	71'1	30'2	120'8	27'4	0'27	294
9	0.9	70'2	31'7	119'5	29'2	0'30	327
10	1.0	69'4	32'9	118'2	30'8	0'33	360



Color changes occurred in olive oils enriching with lutein. Example: "Sierra Mágina" Virgin Olive oil"

We focus on the stability of a set of 10 VOOs as a function of three main degradation variables (time, temperature and light exposure) considering lutein-enriched VOOs in comparison with control VOOs (oils without antioxidant added). As it is well known, oil stability depends on chemical composition, which can be tracked using spectrophotometric color determinations. So, we used an application-based approach, employing the CIELAB color space rather than the analysis of transmittance spectra to assess the observed color changes (ΔE_{ab}^*). The results obtained were different depending on VOOs utilized but, in all cases, the VOOs enriched with lutein were more stable than the control ones. These results show that lutein-enriched VOOs could be successfully used like functional foods with additional health properties as an alternative way in the fight against some specific human degenerative diseases.

References:

- [1] A. Kijlstra, Y. Tian, E. Kelly, T. Berendschot. Lutein: more than just a filter for blue light, Progress in Retinal and Eye Research (2012) 31, 303-315.
- [2] F. Granado, B. Olmedilla, I. Blanco, I. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. British Journal of Nutrition. (2003) 90:487-502.
- [3] J.M. Fernández-Sevilla, F.G. Gabriel Acién-Fernández, E. Molina. Biotechnological production of lutein and its applications. Appl. Microbiol. Biotech. (2010) 86. 27-40.

Acknowledgements:

Financial support from University of Jaén and "Caja Rural de Jaén" (Research Project: UJA2011/13/09) is gratefully acknowledged.





COMUNICACIONES EN CONGRESOS

Autores: R. Bermejo, P. Limón, R. Malheiro, J.A. Pereira, M. Melgosa y F. Gabriel Ación.

Título: Mejora de la estabilidad y de la fracción antioxidante de aceites de oliva virgen extra mediante la adición de extractos de carotenoides procedentes de microalgas.

Tipo de participación: Comunicación (Póster). **ISBN:** 978-84-938900-5-6.

Congreso: XVII Scientific-Technical Symposium of olive oil (Expoliva 2015).

Lugar celebración: Jaén

Fecha: 2015

Mejora de la estabilidad y de la fracción antioxidante de aceites de oliva virgen extra mediante la adición de extractos de carotenoides procedentes de microalgas

Ruperto Bermejo Román¹, Piedad Limón Villarejo¹, Ricardo Malheiro², Jose Alberto Pereira², Manuel Melgosa Latorre³, F. Gabriel Acién Fernández⁴

¹ Dpto. Química Física y Analítica, Escuela Politécnica Superior de Linares, Universidad de Jaén, 23700 Linares, Spain. e-mail: rbermejo@ujaen.es

² Mountain Research Centre (CIMO), Polytechnic Institute of Braganca, Braganca, Portugal.

³ Dpto. Óptica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada, Spain.

⁴ Dpto. Ingeniería Química, Universidad de Almería, Almería, Spain.

RESUMEN

Actualmente una proporción importante de la población mundial sufre enfermedades crónicas atribuidas a valores insuficientes de compuestos antioxidantes en los tejidos. Así, estudios epidemiológicos han mostrado que la presencia de carotenoides a niveles séricos, está relacionada con bajos valores de riesgo en desarrollar enfermedades tales como: diversos tipos de cáncer, afecciones cardiovasculares, cataratas, degeneración macular, etc. Estos efectos beneficiosos para la salud, están principalmente relacionados con la capacidad antioxidante que tienen estos carotenoides [1,2].

Sólo las plantas, las algas, algunos hongos y bacterias sintetizan de forma natural los carotenoides, y por tanto, el ser humano necesita incorporarlos a través de la dieta mediante el consumo adecuado de alimentos, fundamentalmente frutas y verduras. Desafortunadamente, la ingesta de carotenoides esenciales es reducida debido al bajo consumo de los alimentos que los contienen [3].

En este contexto, existe un interés creciente en el desarrollo de alimentos funcionales, que son aquellos capaces de proporcionar efectos beneficiosos para la salud, adicionalmente a su valor nutritivo o energético. Estos productos, son usualmente alimentos tradicionales y una alternativa factible para paliar el déficit de antioxidantes en el organismo, puede ser el desarrollo de alimentos funcionales que contengan en su formulación extractos enriquecidos en carotenoides.

En el presente trabajo se han obtenido y caracterizado aceites de oliva enriquecidos en carotenoides (beta-caroteno y luteína), por adición de extractos ricos en estos compuestos obtenidos a partir de una microalga rica en ellos (*Scenedesmus almeriensis*). En estos aceites se han desarrollado estudios de estabilidad, habiendo sido determinado el comportamiento de los mismos frente a variables como el tiempo, la temperatura y la exposición a la luz. Además, se han analizado parámetros químicos: referentes a la calidad de los aceites (acidez libre, compuestos de oxidación primaria y secundaria, índice de peróxidos, K₂₃₂, K₂₇₀, p-anisidina,...) y referentes a la propia composición (perfil de ácidos grasos, tocoferoles, pigmentos, ...).

Los aceites de oliva virgen así obtenidos, han visto incrementada su fracción antioxidante por incorporación de

los carotenoides procedentes de *Scenedesmus almeriensis* y en lo que se refiere a estabilidad, en todos los casos ensayados, los aceites enriquecidos han mostrado mayor estabilidad, lo que muestra el efecto positivo del enriquecimiento en antioxidantes. Respecto del análisis químico, los resultados obtenidos muestran que la calidad de los aceites se ve mejorada, en el sentido de que los procesos de oxidación resultan en buena parte inhibidos. Además, la composición en ácidos grasos y en tocoferoles no se ve afectada. Por todo ello, puede decirse que los aceites mejoran notablemente su estabilidad además de su valor nutricional y antioxidante, por lo que podrían constituir un alimento funcional muy adecuado para la incorporación de este tipo de antioxidantes en el organismo humano.

INTRODUCCIÓN

Los carotenoides y su interés

Los carotenoides son una gran familia de pigmentos fotosintéticos que se pueden dividir dos grupos: carotenos y xantofilas. Los carotenos no presentan sustituciones en la cadena hidrocarbonada, mientras que las xantofilas son derivados oxigenados, que contienen uno o más grupos funcionales (hidroxilo, carbonilo, alcoxi, carboxilo, etc.). Los carotenoides presentan importantes propiedades como colorantes, antioxidantes, como favorecedores del bronceado y en el tratamiento y prevención de numerosas enfermedades [4].

Mención especial merecen dentro de estos compuestos, el beta-caroteno que pertenece al grupo de los carotenos y la luteína que pertenece al grupo de las xantofilas, por las relevantes aplicaciones que comercialmente se han desarrollado. Estos dos carotenoides poseen un gran potencial de aplicación y se vienen utilizando en diferentes sectores como la industria de nutracéuticos, en alimentación y cosmética y como colorantes y potenciadores de la pigmentación. Además, tienen utilidad en el tratamiento de afecciones de tipo asmático, en la reducción del riesgo de ciertos tipos de cánceres y

también en la prevención de enfermedades cardiovasculares, dermatológicas y oftalmológicas [5,6].

Una novedosa fuente de antioxidantes. Las microalgas como alternativa

Los carotenoides se encuentran distribuidos en plantas superiores, contándose frutas y verduras entre sus fuentes para consumo humano. Sin embargo, es difícil utilizando estas fuentes alcanzar la ingesta recomendada para la prevención de enfermedades degenerativas (6,0 mg/día) por lo que se recurre al uso de extractos, como por ejemplo los enriquecidos en luteína que, en su mayoría actualmente, proceden de flores de caléndula y sirven para suplementar la dieta de los grupos de riesgo.

A pesar de la amplia distribución de estos carotenoides en plantas superiores y algunos productos que se usan en alimentación (calabazas, zanahorias, yema de huevo, pimientos rojos, harina de alfalfa, gluten de maíz, flores de caléndula, etc.), la reducida concentración de estos compuestos en estas materias primas hace que se estén buscando otras fuentes en las que estos compuestos se encuentren en mayores concentraciones. Así, se están realizando esfuerzos considerables para hacer posible la producción comercial de estos y otros carotenoides a partir de microalgas [7]. La biomasa de microalgas es una fuente ventajosa de carotenoides debido a su elevado contenido en estos pigmentos con respecto a las fuentes tradicionales anteriormente mencionadas. En este sentido, la microalga *Scenedesmus almeriensis*, posee elevadas cantidades de estos carotenoides (beta-caroteno, luteína y violaxantina). Además, esta especie puede producirse en reactores tubulares con elevada productividad en la media-gran escala, constituyendo una fuente de producción segura y reproducible [8].

Una matriz alimenticia excepcional en la que incorporar los antioxidantes. El aceite de oliva

El aceite de oliva posee, debido a su composición química, importantes propiedades que lo hacen un alimento muy saludable y recomendado, presentando además un alto factor de digestibilidad, parámetro muy importante en alimentación. Son muchos los trabajos científicos que avalan la importancia de su incorporación en una dieta equilibrada, mostrando efectos muy beneficiosos para la salud.

Dentro de la gran variedad de compuestos existentes en el aceite de oliva, se pueden nombrar, entre otros: compuestos hidrocarbonados, esteroides, compuestos diterpénicos y triterpénicos, alcoholes alifáticos, tocoferoles, pigmentos, etc. Las clorofilas y los

Mejora de la estabilidad y de la fracción antioxidante de aceites de oliva virgen extra mediante la adición de extractos de carotenoides procedentes de microalgas – R. Bermejo-Román, P. Limón-Villarejo, R. Malheiro, J.A. Pereira, M. Melgosa-Latorre, F.G. Ación-Fernández

carotenoides son los pigmentos más abundantes en aceites de oliva virgen. Los carotenoides se encuentran presentes en un intervalo comprendido entre los 5-100 mg kg⁻¹, y dependiendo de la naturaleza del aceite se ha encontrado luteína en concentraciones que varían en el intervalo 2-8 mg kg⁻¹. Los anteriores valores, indican que carotenoides como la luteína se encuentra en cantidades muy pequeñas y por tanto el aceite de oliva, en su composición original, no puede aportar las cantidades recomendadas para la prevención de enfermedades. Sin embargo, es importante resaltar que por sus características y por contener pequeñas cantidades de luteína y también de beta-caroteno, puede ser un adecuado medio para ser enriquecido en estos antioxidantes. En este sentido, existen trabajos en los que se pone de manifiesto que matrices alimenticias ricas en grasas, como lo es el aceite de oliva, pueden facilitar y/o beneficiar el proceso de bioasimilación de este tipo de carotenoides [9].

MATERIALES Y MÉTODOS

Se han obtenido extractos de antioxidantes procedentes de la microalga *Scenedesmus almeriensis*, mediante el desarrollo de metodologías descritas previamente [8,10], para enriquecer aceites de oliva virgen extra obtenidos comercialmente y procedentes de las provincias de Jaén, Granada, Córdoba y Málaga (**Tabla 1**).

Caracterización fisicoquímica de aceites

La determinación espectrofotométrica del color se ha utilizado para caracterizar y monitorizar las muestras de aceites usando un espectrocolorímetro Konica Minolta CM-5. El equipo proporciona medidas en el espacio de color CIELAB, utilizando iluminante D65 y observador patrón colorimétrico CIE 1931. Se colocaron 14 ml de aceite en una cubeta transparente de cuarzo con unas dimensiones de 4.2 x 3.2 x 1.0 cm y se midieron los valores de los parámetros colorimétricos de cada muestra (L*, a*, b*), así como los correspondientes a las variaciones de los mismos por comparación con el aceite control (ΔL^* , Δa^* , Δb^* y ΔE^*ab).

Para las medidas de fotoestabilidad se han sometido las muestras a exposición a luz ultravioleta en cabina de control y comparación de color CAC 60 Verivide. Las medidas se tomaron a intervalos temporales distribuidos a lo largo de dos meses y se realizaron a temperatura ambiente. Para las medidas de termoestabilidad, las muestras se sumergieron en un termostato de precisión Julabo, dotado de líquido Thermal H5S para poder trabajar a temperatura igual a 120 °C. Las medidas se tomaron a intervalos de tiempo regulares durante 74 horas.

Caracterización química de los aceites enriquecidos con luteína

Los parámetros químicos de calidad han sido determinados de acuerdo con los métodos estándar aprobados por la Unión Europea (Anexos II y IX) (EEC/2568/91).

Preparación de las muestras de aceites y adición del extracto de carotenoides.

Los aceites analizados se han adquirido comercialmente como representativos de diferentes comarcas de Andalucía, habiendo sido almacenados hasta su utilización en el frigorífico. Todos los aceites han sido filtrados, previamente a la realización de los diferentes experimentos, en presencia de sulfato sódico anhidro.

Determinación de parámetros de calidad: Acidez libre. Índice de peróxidos. Coeficientes K_{232} y K_{270} .

La acidez libre ha sido determinada por valoración de la muestra de aceite disuelta en etanol:éter (1:1, v/v), utilizando para ello disolución etanólica de hidróxido de potasio y se ha expresado como tanto por ciento de ácido oleico. El valor de índice de peróxidos, expresado en miliequivalentes de oxígeno activo por kilogramo de aceite ($m_{\text{equiv}}/\text{kg}$), ha sido determinado dejando reaccionar una mezcla de aceite y cloroformo/ácido acético 3:2 (v/v), con una disolución de yoduro de potasio saturada y en oscuridad; el yoduro libre fue valorado entonces con una disolución de tiosulfato sódico. Para la determinación de los coeficientes K_{232} y K_{270} , se ha medido la absorbancia a esas dos longitudes de onda, de una disolución al 1 % (m/v) en iso-octano, utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso, en un espectrofotómetro Lambda 20 (Perkin Elmer).

Determinación del valor p-anisidina y de la estabilidad oxidativa.

Los aldehídos insaturados y los compuestos de oxidación secundarios, han sido determinados mediante el valor de anisidina, como se detalla en la norma ISO 6885 (2006). Esta determinación se basa en el incremento de absorbancia por gramo de aceite, medida a 350 nm (Genesys 10UV), de una disolución de aceite de oliva en iso-octano, antes y después de hacerlo reaccionar con el reactivo p-anisidina en condiciones de oscuridad.

La estabilidad oxidativa ha sido estimada mediante medida del tiempo de inducción a la oxidación utilizando un equipo Rancimat 743 (Metrohm CH, Switzerland). Para ello, una corriente de aire seco, filtrado y limpio (20 l/h) fue burbujeado a través de los aceites (3.00 g) calentando a 120 °C, colectando los compuestos volátiles en agua y midiendo de forma continua el incremento de la conductividad. Se

registró el tiempo en alcanzar la inflexión en la medida de conductividad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los cambios de tipo químico que se producen en los aceites de oliva suelen deberse a variables tales como la exposición a la luz, la temperatura y transcurso del tiempo desde la obtención de los mismos. Estas alteraciones con respecto a las propiedades iniciales de los aceites, se pueden monitorizar siguiendo el cambio del color en los mismos, ya que existe una estrecha relación entre los cambios químicos y la variación del color de la matriz (degradación de la misma). Así, se ha estudiado la degradación de distintos aceites frente a la exposición a luz ultravioleta (foto-estabilidad), frente al calentamiento (termo-estabilidad) y frente al transcurso del tiempo (estabilidad temporal).

Estabilidad en función de la radiación incidente: foto-estabilidad

Los estudios de foto-estabilidad se han realizado utilizando cinco aceites de oliva diferentes: cuatro de variedad picual, B, C, D y L; y un quinto aceite de variedad arbequina (aceite M). Se han ensayado dos concentraciones de luteína diferentes: 0.1 y 0.21 mg/ml. Así, se ha representado en ordenadas el valor que indica la variación de color (dE^*ab) frente al tiempo transcurrido desde el inicio a la exposición a luz ultravioleta. Como ejemplo, la **Figura 1** muestra la foto-estabilidad del aceite “B” enriquecido en luteína hasta 0.1 mg/ml. Se puede apreciar claramente como el aceite “B” enriquecido en antioxidantes sufre menor degradación por exposición a la radiación ultravioleta.

Estabilidad en función de la temperatura: termo-estabilidad

La temperatura es otra variable que produce degradación en los aceites y por ello se ha procedido a estudiar su influencia en la estabilidad de los mismos. Así, se ha utilizado una temperatura de 120 °C y los aceites han sido analizados a diferentes tiempos sometidos a ese valor de temperatura. Si nos fijamos como ejemplo en el aceite L, la **Figura 2** muestra el efecto del enriquecimiento en luteína a 0.1 mg/ml y como el aceite enriquecido es más estable frente a la degradación térmica que el control sin enriquecer.

Estabilidad en función del tiempo: consumo preferente

Otra propiedad deseable en los aceites, es el mantenimiento de sus propiedades fisicoquímicas el mayor tiempo posible. Es conocido, que para los aceites obtenidos en una determinada campaña, se recomienda que se consuman en el año posterior, ya

que si se supera este periodo de tiempo, las propiedades esenciales de los aceites podrían verse alteradas. En este sentido, se ha estudiado la estabilidad de cinco aceites diferentes, sin enriquecer y enriquecidos en luteína (0.1 mg/ml), analizando la influencia del paso del tiempo. Para ello, se han realizado los ensayos a temperatura ambiente y en condiciones de almacenamiento de oscuridad y ambiente seco. Los resultados obtenidos tras los 18 primeros meses de determinaciones, muestran que los valores obtenidos para los aceites enriquecidos en luteína generan siempre menos unidades de variación de color (dE_{ab}^*), lo cual vuelve a mostrar el efecto protector frente a la degradación, en este caso temporal, de las muestras enriquecidas en antioxidantes.

Determinación de parámetros químicos

Se han realizado las determinaciones en los aceites enriquecidos en luteína y comparado los parámetros obtenidos con los aceites control para analizar las diferencias. La **Tabla 2** muestra a título de ejemplo, algunos de los parámetros químicos analizados y correspondientes a cinco tipos de aceites diferentes. Se han enriquecido los aceites a dos valores diferentes de concentración de luteína (0.1 mg/ml y 0.21 mg/ml) para poder comprobar si los parámetros químicos de calidad se ven afectados debido a la diferente concentración de antioxidante alcanzada en las muestras.

Como se desprende globalmente de los resultados mostrados en la Tabla 2, los parámetros de calidad de los diferentes aceites ensayados no se ven afectados por el enriquecimiento en antioxidantes.

Así, los valores de acidez apenas se alteran por la adición de extracto antioxidante independientemente de la concentración alcanzada en el mismo. En cuatro de los cinco aceites ensayados, no se aprecian cambios significativos y únicamente en el aceite “C”, la adición de extracto antioxidante reduce los niveles de ácidos grasos libres en los aceites, pero sin cambios entre los aceites enriquecidos a diferentes valores de concentración en luteína (0.1 y 0.21 mg/ml respectivamente). Estos resultados son positivos, indicando que la adición de antioxidantes no produce reacciones hidrolíticas en los aceites, manteniendo los niveles de ácidos grasos libres.

Respecto al índice de peróxidos, en todos los aceites se produce una ligera disminución del mismo en las muestras enriquecidas, siendo esta disminución independiente de la concentración alcanzada. Estos valores indican que la peroxidación de los aceites disminuye con la adición de extracto antioxidante en todos los aceites, siendo los descensos importantes a excepción del aceite “F”. Así, puede decirse que la formación de productos de oxidación primaria (principalmente hidroperóxidos) resulta inhibida.

Análogamente, los parámetros K_{232} y K_{270} , no sufren apenas variaciones con el enriquecimiento y sus valores son aproximadamente constantes e independientes de la concentración alcanzada en antioxidante. En K_{232} y ΔK no se aprecian cambios significativos. Sin embargo, la adición de extracto a los aceites produce incrementos en los valores de K_{270} lo que podría indicar formación de productos secundarios de oxidación. No obstante, observando los valores obtenidos para p-AV, se puede concluir claramente que el enriquecimiento en luteína de los aceites no produce oxidación secundaria en ellos y los valores de K_{270} pueden deberse al color conferido a los aceites por la adición del extracto.

Respecto a la estabilidad oxidativa, los resultados obtenidos (**Figura 3**) muestran que el extracto añadido a los aceites, actúa claramente como antioxidante incrementando la resistencia a la oxidación de los aceites. Es de resaltar el elevado incremento en la estabilidad producido en el caso del aceite “A”, donde se alcanza un incremento del 37.80 %.

CONCLUSIONES

En todos los casos ensayados, los aceites enriquecidos en carotenoides son más estables y aguantan mejor la degradación producida por variables tales como temperatura, tiempo y exposición a la radiación ultravioleta. La estabilidad oxidativa de los aceites enriquecidos también ha mejorado sustancialmente y las reacciones de oxidación se han reducido notablemente. Además, el perfil de ácidos grasos y el contenido en tocoferoles no se ve afectado por el enriquecimiento.

Estos resultados, hacen que la posible introducción de estos aceites enriquecidos en carotenoides procedentes de microalgas marinas, podría incrementar la ingesta diaria de estos compuestos esenciales a través de la dieta, mejorando además las propiedades saludables y nutricionales de los aceites.

Por tanto, los aceites enriquecidos en antioxidantes no presentan alteraciones importantes en los parámetros químicos que tienen que ver con sus atributos esenciales y la presencia de los carotenoides añadidos va a producir más beneficios, que se suman a los ya existentes, sin que el resto de propiedades se vean perjudicadas. Esto hace que los aceites que se están obteniendo presenten mejores propiedades, aún si cabe, que los ya existentes, dotando de un importante valor añadido a los mismos y dejando la puerta abierta al desarrollo comercial e industrial de esta línea de nuevos aceites.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Jaén, por la financiación recibida a través del Proyecto del Plan Propio UJA 2011/13/09 que ha permitido el desarrollo de los estudios presentados. A la Caja Rural de Jaén por el correspondiente patrocinio. A la empresa “Castillo de Canena” por su colaboración en el desarrollo del proyecto.

REFERENCIAS

- Bhattacharyya, S., Datta, S., Mallik, B., Dhar, P., Ghosh, S. (2010) Lutein content and in vitro antioxidant activity of different cultivars of Indian Marigold flower extracts. *J. Agric. Food Chem.* 58, 8259-8264.
- Dermatol., J.I., Stahl, W., Heinrich, U., Jungmann, H., Sies, H., Tronnier, H. (2000) Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light-induced erythema in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 71, 795-798.
- Duyn, M.A., Pivonka, E. (2000) Overview of the health of fruit and vegetable consumption for the dietetics professional: selected literature. *Journal of the American Dietetic Association.* 100, 1511-1521.
- Demming-Adams, B. & W.W. Adams III (2002). Antioxidants in Photosynthesis and Human Nutrition. *Science*, 298, 2149-2153.
- Kijlstra, A., Tian, Y., Kelly, E., Berendschot, T. (2012) Lutein: more than just a filter for blue light, *Progress in Retinal and Eye Research* 31, 303-315.
- Omenn, G.S., Goodman, G.E., Thornquist, M.D., Balmes, J., Cullen, M.R., Glass, A. (1996). Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *The new England Journal of Medicine*, 334, 1150-1155.
- García-González M., Moreno, J., Manzano, C., Florencio, F. J., Garcia Guerrero, M., (2005) Production of Dunaliella salina biomass rich in 9-cis- carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor. *Journal of Biotechnology* 115:81–90.
- Fernández, J.M., Ación, F.G., Molina, E., (2010) Biotechnological production of lutein and its applications, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86-1, 27-40.
- Nidhi, B. y Baskaran, V. (2011) Influence of vegetable oils on micellization of lutein in a simulated digestion model, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88, 367-372.
- Cerón García, M.C., Campos Pérez, I., Macías Sánchez, M.D., Bermejo Román, R., Fernández Sevilla, J.M and Molina Grima, E. (2010) Stability of carotenoids in *Scenedesmus almeriensis* biomass and extracts under storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6944-6950.

Tabla 1. Parámetros colorimétricos de aceites de oliva virgen extra utilizados en las experiencias de enriquecimiento en carotenoides procedentes del alga *Scenedesmus almeriensis*.

Aceite	Procedencia	Variedad de aceituna	L*	a*	b*
A	Jaén	Picual	78.8	6.9	123.1
B	Jaén	Picual	81.9	5.1	122.3
C	Jaén	Picual	83.7	1.8	119.2
D	Jaén	Picual	86.4	2.6	120.5
E	Málaga	Hojiblanca	87.8	1.7	111.8
F	Jaén	Picual	87.5	0.3	107.9
G	Jaén	Picual	88.9	1.3	109.0
H	Nacional	Picual	88.0	0.7	105.3
I	Córdoba	Arbequina	88.2	0.7	102.6
J	Córdoba	Picual	88.8	0.5	102.1
K	Granada	Picual	89.1	-0.0	102.7
L	Jaén	Picual	80.3	-3.0	121.0
M	Jaén	Arbequina	81.7	-1.1	118.3
N	Jaén	Frantoyo	86.5	3.3	116.3
P	Jaén	Royal	80.1	4.9	121.5

Tabla 2. Parámetros de calidad de aceites

Aceite de Oliva	FA (%)	PV (mEq. O ₂ /kg)	K ₂₃₂	K ₂₇₀	ΔK	ρ-AV
A						
I	0.19±0.00	9±0	0.82±0.05	0.13±0.01	-0.003±0.001	15±1
II	0.19±0.00	6±1	0.84±0.04	0.15±0.02	-0.004±0.002	16±1
III	0.20±0.00	6±1	0.81±0.05	0.16±0.01	-0.002±0.001	16±1
B						
I	0.30±0.04	9±1	0.86±0.15	0.15±0.02	-0.003±0.002	17±1
II	0.31±0.05	6±1	0.83±0.09	0.15±0.01	-0.003±0.001	16±0
III	0.30±0.04	7±2	0.94±0.12	0.19±0.03	-0.001±0.002	16±1
C						
I	0.28±0.00	9±1	0.94±0.17	0.13±0.02	-0.002±0.005	12±0
II	0.19±0.00	6±1	0.86±0.18	0.12±0.01	-0.005±0.002	13±1
III	0.19±0.00	6±0	1.17±0.55	0.16±0.01	-0.003±0.004	13±1
D						
I	0.28±0.00	8±1	1.00±0.07	0.13±0.02	-0.003±0.001	14±1
II	0.24±0.05	5±1	0.93±0.08	0.13±0.02	-0.009±0.017	14±1
III	0.28±0.00	5±1	1.01±0.03	0.16±0.01	-0.002±0.002	14±1
F						
I	0.28±0.00	9±0	0.84±0.07	0.18±0.02	-0.001±0.003	13±1
II	0.28±0.00	8±0	0.88±0.03	0.21±0.02	-0.007±0.008	14±1
III	0.28±0.00	8±1	0.92±0.04	0.24±0.03	-0.003±0.002	13±1

(FA – acidez libre; PV – índice de peróxidos, valor de ρ-anisidina (ρ-AV), sin enriquecer (I) y enriquecidos (II = 0.1 mg/mL; III = 0.21 mg/mL).

Figura 1. Foto-estabilidad de aceite de oliva virgen “B” bajo condiciones de iluminación ultravioleta.

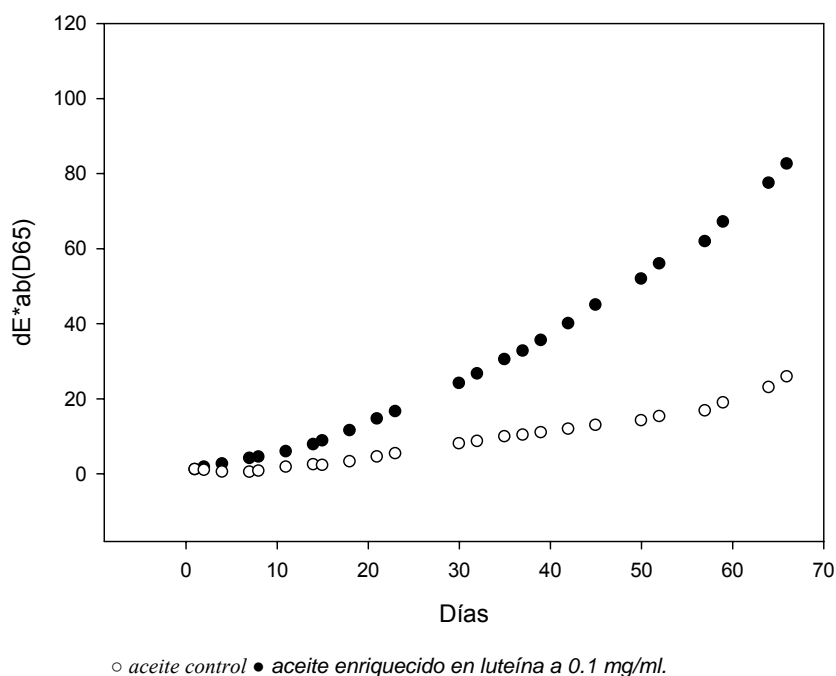


Figura 2. Variación de los parámetros colorimétricos en aceites de oliva virgen extra “L” enriquecido a 0.1 mg/ml en luteína.

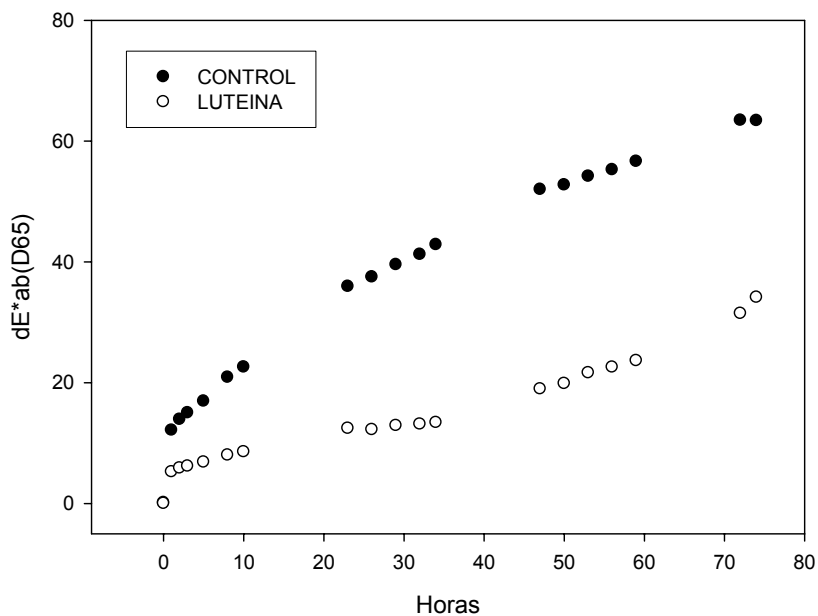
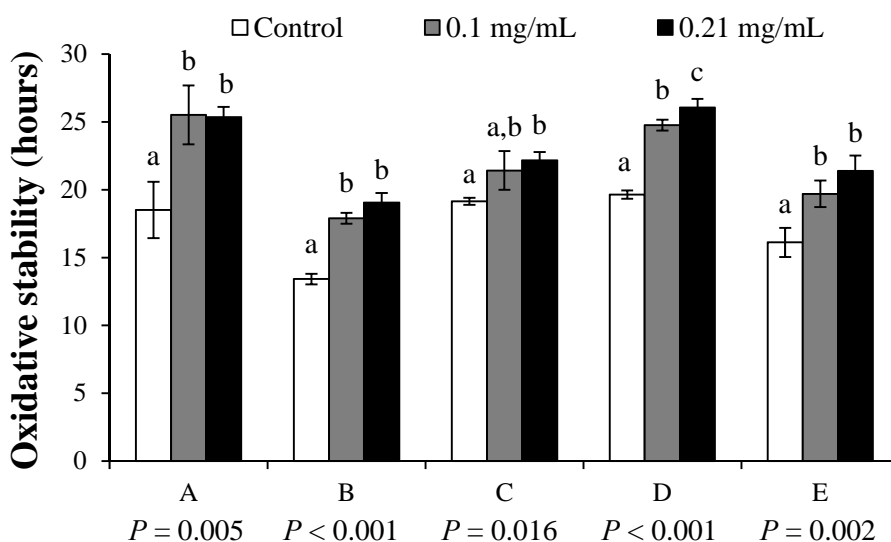


Figura 3. Efecto de la adición de extracto de carotenoides en la estabilidad oxidativa de diferentes aceites de oliva virgen.





COMUNICACIONES EN CONGRESOS

Autores: L. Gómez-Robledo, P. Limón, R. Bermejo y M. Melgosa.

Título: Colour emotions for antioxidant-enriched virgin olive oils

Tipo de participación: Comunicación (Oral)

Congreso: AIC2015 TOKYO Color and Image Congress (Midterm Meeting of the International Colour Association).

Lugar celebración: Tokyo (Japón)

Fecha: 2015



AIC2015 TOKYO Color and Image

Midterm Meeting of the International Colour Association (AIC)

19-22 May 2015, Ochanomizu sola city Conference Center, Tokyo, Japan

Proceedings

Editors: Hirohisa Yaguchi
Katsunori Okajima
Taiichiro Ishida
Kikuko Araki
Motonori Doi
Yoshitsugu Manabe



Proceedings

© 2015 Color Science Association of Japan (CSAJ)

DISCLAIMER

Matters of copyright for all images and text associated with the papers contained within the AIC 2015 Proceedings are the responsibility of the authors. The AIC and CSAJ do not accept responsibility for any liabilities arising from the publication of any of the submissions.

COPYRIGHT

Reproduction of this document or parts thereof by any means whatsoever is prohibited without the written permission of CSAJ - Color Science Association of Japan. All copies of the individual articles remain the intellectual property of the individual authors and/or their affiliated institutions.

Published May, 2015
by the Steering Committee of AIC2015 TOKYO
The Color Science Association of Japan
3-17-42, Shimo-ochiai, Shinjuku-ku, Tokyo 161-0033, Japan

Graphical design by Kikuko Araki
Printed by Tsujino Planning Office, Inc.

Colour Emotions for Antioxidant-Enriched Virgin Olive Oils

Luis GOMEZ-ROBLEDO¹, Piedad LIMON², Ruperto BERMEJO², Manuel MELGOSA

¹ Department of Optics, University of Granada (Spain)

² Department of Physical and Analytical Chemistry, High Politechnical School of Linares, Jaén University (Spain)

ABSTRACT

This work looks for relationships between 9 specific colour emotions applied to a set of extra virgin olive oils which have been coloured by using a lutein and β -carotene enriched extract from microalgae. 6 extra virgin olive oils have been coloured with 2 different concentrations of this colorant obtaining a total of 18 different samples. 20 non-expert Spanish observers were asked to describe the colour appearance of the samples using 9 different pairs of adjectives (Aromatic-Odourless, Bitter-Sweet, Fresh-Rancid, Healthy-Unhealthy, Like-Dislike, Natural-Artificial, Spicy-Non spicy, Tasty-Insipid and Textured-Smooth). Results of spectroradiometric measurements performed under the same conditions than visual observations showed that increasing concentrations of the colorant changed the colour of the sample towards a reddish hue. The microalgae antioxidant-enriched colorant changed the colour of the olive oils mainly in hue, in such a way that, on the average, more than 70% of the total CIELAB colour-difference between pure and lutein and β -carotene enriched virgin olive oils was a hue difference. Torgerson's law of categorical judgment was applied to the results in our colour-emotion experiment showing that there is a high correlation between some pairs of emotions whose meanings are more related to colour preference (Fresh-Rancid, Healthy-Unhealthy, Like-Dislike, Natural-Artificial and Tasty-Insipid). Bitter-Sweet, Spicy-Non spicy, and Textured-Smooth are not correlated with any other emotion. Finally, combining results from colour measurements and colour-preferences we found that if the samples are too reddish their appearance tends to generate a dislike emotion. Therefore, virgin olive oils with high CIELAB hue-angles (greenish hues) seem to be the most appropriate ones to be enriched by these extracts from microalgae.

1. INTRODUCTION

The amounts of carotenoids that are found in human tissues are almost exclusively from dietary origin, mainly from fruits and vegetables, or from supplements. It has been reported that the uptake of β -carotene reduces the risk of age-related macular degeneration (Teikari, J.M.: 1998). In addition, it has been shown that olive oil with extract from microalgae known as *Scenedesmus almeriensis* brought changes in olive oils, quality, composition, colour and stability giving. Therefore, olive oil with an addition of microalgae extract could be a good convoy to improve and enhance the intake of carotenoids in a daily basis (Limon, P: 2015). Although this change in colour may not change its taste or smell, the subjective perception of these factors can change (Zellner, DA: 2003) and colour emotion techniques help to quantify the expectation of a product when it is perceived by human eye (Wei, S: 2014).

This work has two main objectives. Firstly, we want to analyse how does the colour of virgin olive oil changes when we add lutein and β -carotene enriched extract from the *Scenedesmus almeriensis* microalga. Secondly, we want to check how does the human perceived this change in colour by using colour semantic methods (Ou, L: 2004).

2. METHOD

Six samples of different extra-virgin olive oils have been selected, five of them obtained in the same harvest season: Fuenroble, Santuario Mágina, Oro de Bailén, Castillo de Canena and Melgarejo 1; and another one from the previous harvest season Melgarejo 2. For each one of these samples we have prepared three different samples by adding different concentration of extract of microalgae: 0.00 mg/ml (A), 0.10 mg/ml (B) and 0.21 mg/ml. A total of 18 samples have been used, 6 oils \times 3 concentrations. Each one of the samples was poured into bottles with dimensions of 1.5 cm X 1.5cm X 6.0 cm and a capacity of about 20 ml. These bottles have rectangular prism shape and their flat faces allow having an homogenous colour of the oils, this fact makes easier their colour measurement and their colour perception. All the samples were kept in a controlled environment during all the experiment.

Colour measurement of the samples has been made placing the samples in a Verivide Portable cabinet (Verivide, Leicester, United Kingdom) using a D65 light source simulator, the walls of the cabinets were covered by white non fluorescent paper in order to avoid shades in the samples and have a lighter background behind the samples. The colour was measured using a Konica Minolta CS2000A spectroradiometer (Konica Minolta, Nieuwegein, Netherlands) in the same position that the observers performing the visual experiment (figure 1). Tristimulus values were computed assuming CIE64 standard observer. Three replicas of the measurements were made.

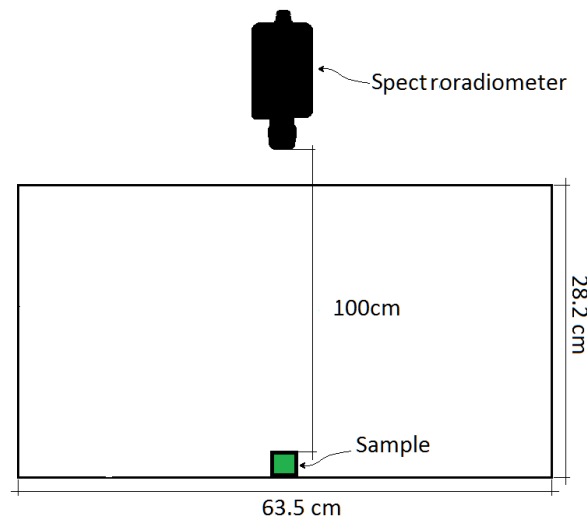


Figure 1: Geometry of the colour measurement of the samples

20 Spanish observers were asked to describe each one of the samples following 9 pairs of opposite descriptors: Aromatic-Odourless, Bitter-Sweet, Fresh-Rancid, Healthy-Unhealthy, Like-Dislike, Natural-Artificial, Spicy-Non spicy, Tasty-Insipid and Textured-Smooth. These 9 descriptors were obtained from 15 interviews to olive oil tasters, trying to describe olive oil appearance in an appropriate way.

For each pair they had to choose one of the descriptors and after that they had to decide if that descriptor describe the oil as “a little”, “moderately” or “very”. For example, an oil can be described as: *moderately aromatic, a little bitter, very rancid, moderately unhealthy, very dislike, very artificial, a little tasty and very textured*. Each one of the samples was shown to each observer 3 times, in the same conditions as it was measured by the spectroradiometer, following a random order. A total of 1080 judgements were made (20observers × 18 samples × 3 replicas).

Torgerson’s law of Cathegorical Judgement was applied to the mean of the answers of the observers. This law allow us to create pscophysical scales where each z score means the intensity in which a stimulus is percieved inside that emotional scale.

3. RESULTS AND DISCUSSION

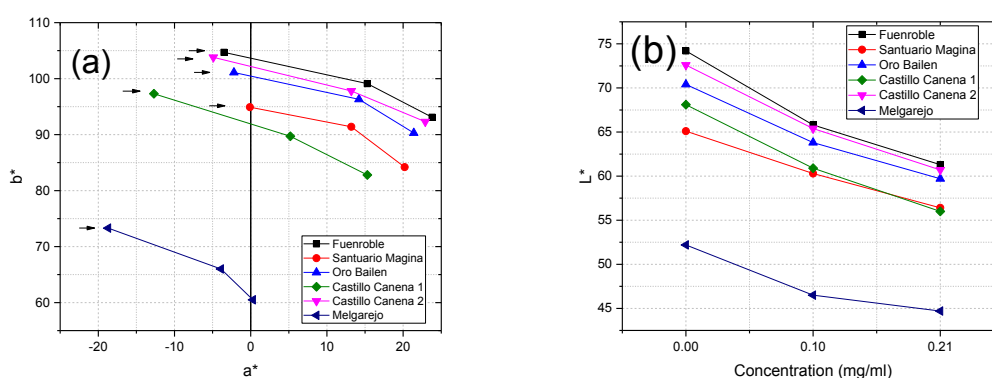


Figure 2: Colour coordinates of the samples changing the concentration of microalgae extract. (a) Plane a^*b^* (black arrow indicates direction of color change when extract concentration is increased). (b) Lightness dependence with concentration.

Figure 2 shows results corresponding to colour measurements. In figure 2 we can see that adding lutein and β -carotene produced a decrease of lightness L^* and b^* coordinates and an increase of a^* coordinate. In Table 1 we have summarized colour change of the oils from pure extra-virgin olive oil to oils with the 2 concentrations of microalgae extract. Second and third columns in Table 1 indicate a high colour change, clearly perceptible by human observers with normal color vision. Last column indicates that the colour change is mainly due to a hue change. Combining data from Figure 2 and Table 1 we can conclude that enriching the oils with lutein and β -carotene extract makes the oils become more reddish and darker. All the oils except Melgarejo (the greenest oil) undergo a color change from yellow to yellowish-orange hues.

Table 1: Mean colour change from pure extra-virgin olive oils in CIELAB and CIEDE2000 units. Three last columns show percentage of change in Lightness, Chroma and Hue in CIELAB units.

Change	ΔE_{00}	ΔE_{ab}	$\% \Delta L^*$	$\% \Delta C^*_{ab}$	$\% \Delta H^*_{ab}$
From 0.00 mg/ml to 0.10 mg/ml	10.5	18.8	12.4	10.7	76.9
From 0.00 mg/ml to 0.21 mg/ml	16.4	29.2	13.2	15.3	71.6

Results from visual experiment are summarized in Table 2. In this table we have correlation coefficients between z scores of different emotions. We can see that there are a high correlation between Fresh-Rancid, Healthy-Unhealthy, Like-Dislike, Natural-Artificial and Tasty-Insipid. That means that when an oil is perceived as Fresh it is perceived also as Healthy, Natural and it likes. This result agrees with the meaning of these descriptors, all of them are related with preferences and can be interpreted as like-dislike. The remaining emotions are descriptors that are related with taste and smell but for observers who are not olive oils experts they do not give a value of preference to the oil.

Table 2: Correlation coefficient (r^2) of z scores obtained from colour emotion experiment. Yellow cells show correlation coefficients greater than 0.8.

	Aromatic								
	Odourless								
Bitter	0.02	Bitter							
Sweet		Sweet							
Fresh	0.68	0.06	Fresh						
Rancid			Rancid						
Healthy	0.73	0.05	0.98	Healthy					
Unhealthy				Unhealthy					
Like	0.71	0.04	0.96	0.98	Like				
Dislike					Dislike				
Natural	0.73	0.03	0.98	0.99	0.98	Natural			
Artificial						Artificial			
Spicy	0.00	0.66	0.19	0.19	0.16	0.16	Spicy		
Non Spicy							Non spicy		
Tasty	0.87	0.00	0.83	0.87	0.86	0.86	0.05	Tasty	
Insipid								Insipid	
Textured	0.05	0.43	0.43	0.40	0.39	0.39	0.78	0.19	
Smooth									

Emotional responses corresponding to the pair of emotions Like-Dislike are plotted in Figure 3, in left axis we can check the z -score and in right axis we can see the linguistic meaning of the z -scores. The oils are perceived as less liked when the concentration of microalgae additive increases for most of the samples, and this trend is very similar for the emotions well correlated with Like-Dislike. If we add an additive that makes the oil more reddish, the olive oil is perceived as less natural and it does not like. There is only one exception, the oil Melgarejo follows an opposite trend to the other samples: when the concentration of lutein and β -carotene increases, the emotion “like” increases. The explanation to this behaviour can be explained with colour measurements (figure 2). This sample is the only one in which its colour goes from a greenish colour to a yellower and the rest of the samples go towards a reddish colour.

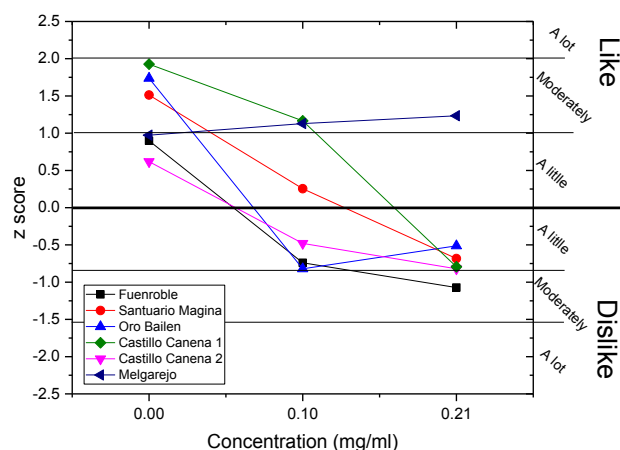


Figure 3: Emotional responses for each sample in scale Like-Dislike. Right axis and horizontal lines shows the linguistic term associated to each z score.

4. CONCLUSIONS

Colour measurements show that adding lutein and β -carotene enriched extract from microalga *Scenedesmus almeriensis* to extra virgin olive oils produces a change in colour of the oils. That makes them decrease slightly in their chroma and lightness, and produces a high decrease from greenish or yellow to reddish. The obtained colour differences are far from a just-noticeable colour difference, the change in colour being clearly perceptible by human eye.

From the studied descriptors by a colour-emotion experiment some of them are highly correlated. The meaning of these emotions can be related to the terms Like-Dislike. From the 6 studied oils there is only one that is liked more when we add extract from microalgae, because it changes from green to yellow.

ACKNOWLEDGEMENTS

Research Project FIS2013-40661-P, Ministry of Economy and Competitiveness (Spain), with European Regional Development Fund (ERDF).

REFERENCES

- Limón, P., Malheiro R., Casal S., Ación-Fernández, F.G., Fernández-Sevilla, J.M., Rodrigues, N., Cruz, R. Bermejo R., and J.A. Pereira. 2015. Improvement of stability and carotenoids fraction of virgin olive oils by addition of microalgae *scenedesmus almeriensis* extracts. *Food Chemistry* 175 (0) (5/15): 203-11.
- Ou, L.C., Luo M.R., Woodcock A., and A. Wright. 2004. A study of colour emotion and colour preference. part I: Colour emotions for single colours. *Color Research & Application* 29 (3): 232-40.

- Teikari, J. M., Rautalahti, M., Haukka, J., Jarvinen, P., Hartman, A. M., Virtamo, J., Albanes, D., and O. Heinonen. 1998. Incidence of cataract operations in Finnish male smokers unaffected by alpha tocopherol or beta carotene supplements. *Journal of Epidemiology and Community Health* 52 (7) (Jul): 468-72.
- Wei, S.T., Ou, L. C., Luo, M. R., and J. B. Hutchings. 2014. Package design: Colour harmony and consumer expectations. *International Journal of Design* 8 (1): 109-26.
- Zellner, D. A., and P. Durlach. 2003. Effect of color on expected and experienced refreshment, intensity, and liking of beverages. *American Journal of Psychology* 116 (4): 633-47.

*Address: Luis Gómez-Robledo, Department Optics, Faculty of Sciences,
University of Granada, Severo Ochoa s/n, 18170 Granada, SPAIN*

E-mails: luisgrobledo@ugr.es, pidily@gmail.com, rbermejo@ujaen.es, mmelgosa@ugr.es