

Las bondades del consumo de aceite de oliva virgen



Universida deVigo

AAI-Grupo
de Investigacións
Agroambientais
e Agroalimentarias

CIFACA: Clúster de Investigación
e Transferencia Agroalimentaria
do Campus da Auga

Facultade
de
Ciencias

Vicerreitoría do
Campus de Ourense
Campus da Auga

Vicerreitoría de
Comunicación e Relacións
Institucionais

Entidades financiadoras



Entidades patrocinadoras



Las bondades
del consumo de
aceite de
oliva virgen

AS BONDADES DO CONSUMO DE ACEITE DE OLIVA VIRXE

Xornada divulgativa do Aceite de Oliva Virxe
Ourense, 7 de marzo de 2019

Editores:

Beatriz Cancho Grande
Carmen González Barreiro
Patricia Reboredo Rodríguez
María Figueiredo González
Raúl Garzón Vidueira
Laura Castro Sobrino

ISBN: 978-84-8158-836-1

Todos los derechos reservados.

Cualquier forma de reproducción, distribución, comunicación pública o transformación de esta obra solo puede ser realizada con la autorización de sus titulares, salvo excepción prevista por la ley. Diríjase a CEDRO (Centro Español de Derechos Reprográficos, www.cedro.org) si necesita fotocopiar o escanear algún fragmento de esta obra.

Índice

Prólogo	vii
Comité	ix
Colaboradores	x
Lista de abreviaturas	xiii
CAPÍTULO 1	1
Variedades de olivo: catalogación, certificación y registro de variedades comerciales	
<i>Isabel Trujillo Navas</i>	
1.1 Introducción	3
1.2 Los recursos genéticos en olivo	5
1.3 Catalogación de variedades de olivo: experiencia UCOLIVO	7
1.3.1 Fundamentos y conceptos	10
1.3.2 Metodología	11
1.3.3 Caracterización	14
1.3.4 Identificación	15
1.3.5 Autenticación	16
1.3.6 Establecimiento de los nombres	17
CAPÍTULO 2	23
Aroma del aceite de oliva virgen, interpretación química de la percepción sensorial	
<i>Diego Luis García González</i>	
2.1 Calidad del aceite de oliva virgen. Importancia del aroma	24
2.2 Defectos sensoriales del aceite de oliva virgen	26
2.3 Compuestos volátiles en el aceite de oliva virgen	28
2.4 Análisis de compuestos volátiles	32

CAPÍTULO 3

39

Compuestos fenólicos y otros compuestos bioactivos del aceite de oliva: ¿Por qué es importante cuantificarlos correctamente?

Alegría Carrasco Pancorbo

3.1 Contextualización del capítulo y objetivo de los autores	39
3.2 Composición de la fracción insaponificable del aceite de oliva. Relevancia de los compuestos minoritarios	40
3.3 Necesidad de desarrollar métodos fiables para caracterizar la fracción minoritaria del aceite. Introducción a la Metabolómica de alimentos	43
3.4 Compuestos fenólicos del aceite de oliva: herramientas para llevar a cabo su determinación, dificultades e importancia de cuantificarlos correctamente	44
3.5 Tendencias en el análisis de metabolitos secundarios del aceite de oliva (y otras matrices relacionadas): métodos multi-clase y algunas de sus aplicaciones	49
3.6 Conclusiones	53

CAPÍTULO 4

57

Efecto anti-tumoral de los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen extra en líneas celulares humanas MCF-7

Maurizio Battino

4.1 Situación actual del cultivo del olivo en Galicia	58
4.2 El papel del aceite de oliva en la Dieta Mediterránea	59
4.3 Caracterización espectrofotométrica de los extractos fenólicos de los AOVE Brava y Mansa de Figueiredo	60
4.4 Efecto del extracto fenólico del AOVE Brava en la línea celular de cáncer de mama MCF-7	62
4.4.1 Efecto citotóxico del extracto fenólico del AOVE Brava en la línea celular de cáncer de mama MCF-7	62
4.4.2 Determinación de la producción de EROs	63
4.4.3 Determinación de los niveles de apoptosis	64
4.4.4 Efecto de los extractos fenólicos del AOVE Brava en los niveles de señalización de ARNm relacionados con la apoptosis intrínseca y extrínseca en células MCF-7	65

4.4.5 Efecto de los extractos fenólicos del AOVE Brava en los niveles de señalización de ARNm relacionados con la autofagia en células MCF-7.....	66
4.4.6 Alteración del fenotipo metabólico después del tratamiento con los extractos fenólicos del AOVE Brava en células de cáncer de mama MCF-7.....	67
4.5 Conclusiones	70

CAPÍTULO 5

77

Efectos del aceite de oliva virgen sobre el envejecimiento

José Luis Quiles Morales

5.1 Introducción.....	77
5.2 El aceite de oliva favorece el mantenimiento de la estructura ósea en hueso alveolar y fémur en el envejecimiento.....	81
5.3 El aceite de oliva virgen como fuente grasa de elección para un envejecimiento óptimo del páncreas	83
5.4 Efecto protector del aceite de oliva en el envejecimiento a nivel hepático	84
5.5 Longevidad y causas de muerte.....	85
5.6 Conclusiones.....	86

CAPÍTULO 6

93

Papel del aceite de oliva y la dieta mediterránea, en la enfermedad cardiovascular. Perfil lipoproteico

Montserrat Fitó Colomer

6.1 Enfermedad cardiovascular y factores de riesgo.....	94
6.2 Patrón de dieta mediterránea tradicional.....	94
6.3 Efecto de la dieta mediterránea sobre las enfermedades cardiovasculares	95
6.4 Beneficios del aceite de oliva y la dieta mediterránea sobre la aterogenicidad de la LDL y funcionalidad de la HDL.....	98
6.5 Beneficios del aceite de oliva y la dieta mediterránea sobre la funcionalidad de la HDL	100
6.6 Conclusiones.....	102

Prólogo

Si nos remontamos al pasado podremos comprobar que la historia del cultivo del olivo en Galicia se extendió desde la época romana hasta finales de la Edad Media por los valles interiores de los ríos Miño, Sil y Támega hasta el punto que llegó a ser un cultivo significativamente importante en época de los Reyes Católicos. Según algunas interpretaciones, los Reyes Católicos fueron los que impusieron un fuerte gravamen sobre cada olivo gallego como castigo por la *Revolta Irmandiña*. Según otras interpretaciones, este gravamen trataba de incentivar el asentamiento de colonos en las tierras reconquistadas en el Sur de la Península y la mejor manera de hacerlo era apoyando un cultivo que allí podía resultar mucho más rentable. Pero parece que los Reyes Católicos no acabaron con la tradición olivarera gallega, ya que en la primera mitad del s. XVII el Conde Duque de Olivares promulgó un impuesto sobre cada olivo plantado en Galicia, tratando con ello de proteger los intereses de sus fincas en Olivares, a las afueras de Sevilla, que llevó a que, una vez más, se arrancase buena parte de los olivos existentes (Guitián, 2015). Tanto es así que, en el siglo XVIII, Galicia producía menos de un 2% del aceite que se consumía y las cifras siguieron disminuyendo desde entonces.

No cabe duda que Andalucía es una de las principales zonas olivareras a nivel nacional. Este hecho no impide que a lo largo de los últimos años emerjan nuevas regiones que apuestan por el cultivo del olivo y por la explotación de variedades propias a fin de producir un aceite de oliva autóctono de alta calidad. Este es el caso del olivar gallego que en la actualidad resurge como un cultivo alternativo como consecuencia, entre otros factores, del cambio climático registrado en las últimas décadas.

Ahora bien, con el objetivo de dinamizar este sector, se están llevando a cabo dos políticas diferentes pero ambas necesarias. Por un lado, se está fomentando la plantación de variedades foráneas de olivo, Arbequina y/o Picual, con la finalidad de alcanzar una producción oleícola intensiva a corto plazo. Por otro lado, se están recuperando olivos centenarios de variedades autóctonas ampliamente conocidas por los olivicultores de la zona para elaborar aceites de oliva gallegos con un valor diferencial. Ambas políticas o iniciativas nacen con la finalidad de crear un tejido productivo y colaborativo con el que formular iniciativas en el sector olivarero gallego, implicando a la administración gallega

en esta puesta en valor (Paz, 2017). Además, la creación de la *Asociación de Produtores de Aceite e Oliva de Galicia (APAAG)*, en febrero de 2015, junto con la *Cooperativa Galega de Olivareiros* de más reciente formación, son dos claros indicativos de la relevancia que está alcanzando el sector oleícola en la actualidad. Un sector que se perfila año tras año como un sector socio-económico emergente dentro de nuestra Comunidad Autónoma.

El resurgimiento de la tradición oleícola, así como la elaboración de estos nuevos aceites gallegos despertó entre los investigadores del Grupo de Investigaciones Agroambientales y Alimentarias (AA1), ubicado en la Facultad de Ciencias del Campus de Ourense, la inquietud de querer caracterizarlos en cuanto a su calidad sensorial, atribuida a múltiples compuestos volátiles y fenólicos, y a su calidad funcional. No en vano, desde hace ya casi diez años, decidimos implantar una nueva línea de investigación en nuestro grupo volcada en este oro líquido. Una línea de investigación financiada con éxito a través de diferentes proyectos nacionales y europeos. Esta línea cuenta en la actualidad con jóvenes investigadores que plantean nuevos estudios relacionados estrechamente con el ámbito de la salud.

Ha llegado el momento de poder transferir nuestro *know-how* a los diferentes agentes del sector oleícola, acompañados de nuestros más estrechos investigadores colaboradores, grandes expertos en el ámbito del olivo, del aceite de oliva y de las propiedades saludables que se derivan de su consumo. Es por ello que hemos querido organizar la jornada divulgativa “As bondades do consumo de aceite de oliva virxe” desde la Facultad de Ciencias de nuestro Campus de Ourense. El principal objetivo es la puesta en valor del consumo del aceite de oliva virgen. Una jornada que pretende ser el punto de encuentro entre los diferentes agentes del sector oleícola gallego y representantes relevantes de la comunidad científica en esta temática.

En este libro se recopila la información divulgada por los investigadores que han participado en primera persona en dicho acto.

Beatriz Cancho Grande

Comité

Coordinadoras de la Jornada Divulgativa

Beatriz Cancho Grande, Universidade de Vigo

Carmen González Barreiro, Universidade de Vigo

Comité Organizador

Jesús Simal Gándara, Universidade de Vigo

Beatriz Cancho Grande, Universidade de Vigo

Carmen González Barreiro, Universidade de Vigo

Elena Martínez Carballo, Universidade de Vigo

Raquel Rial Otero, Universidade de Vigo

Miguel Ángel Prieto Lage, Universidade de Vigo

María Figueiredo González, Universidade de Vigo

Patricia Reboredo Rodríguez, Universidade de Vigo

Colaboradores

Sadia Afrin

Department of Gynecology and
Obstetrics, Johns Hopkins University,
School of Medicine, Baltimore, USA

Ramón Aparicio-Ruiz

Departamento de Química Analítica,
Facultad de Farmacia,
Universidad de Sevilla, Sevilla, España

Aadil Bajoub

Departamento de Química Analítica.
Facultad de Ciencias,
Universidad de Granada, Granada, España

Maurizio Battino

Dipartimento di Scienze Cliniche
Specialistiche ed Odontostomatologiche-
Sez, Biochimica,
Università Politecnica delle Marche,
Ancona, Italy;

Nutrition and Food Science Group,
Department of Analytical and Food
Chemistry, CITACA, CACTI,
University of Vigo, Vigo, Spain;

Centro Internacional de Investigación para
los Alimentos, Nutrición y Seguridad.
Universidad de Jiangsu, Zhenjiang, China

Alegría Carrasco Pancorbo

Departamento de Química Analítica.
Facultad de Ciencias,
Universidad de Granada, Granada, España

Olga Castañer

CIBER de la Fisiopatología de la
Obesidad y Nutrición (CIBERobn);
Instituto Hospital del Mar de
Investigaciones Médicas (IMIM),
Barcelona, España

Danila Cianciosi

Dipartimento di Scienze Cliniche
Specialistiche ed Odontostomatologiche-
Sez, Biochimica,
Università Politecnica delle Marche,
Ancona, Italy

Enrique Díaz Montaña

Departamento de Química Analítica,
Facultad de Farmacia,
Universidad de Sevilla, Sevilla, España

M. Soledad Ferreiro

Azienda Ospedaliera-Ospedali Riuniti
Ancona, Ancona, Italia

María Figueiredo-González

Nutrition and Bromatology Group,
Department of Analytical and Food
Chemistry, Faculty of Science,
University of Vigo, Ourense, Spain

Montserrat Fitó

CIBER de la Fisiopatología de la
Obesidad y Nutrición (CIBERobn);
Instituto Hospital del Mar de
Investigaciones Médicas (IMIM),
Barcelona, España

Tamara Y. Forbes-Hernández

Nutrition and Food Science Group,
Department of Analytical and Food
Chemistry, CITACA, CACTI,
University of Vigo, Vigo, Spain

Diego L. García-González

Instituto de la Grasa (CSIC), Campus
Universidad Pablo de Olavide, Sevilla,
España

Francesca Giampieri

Dipartimento di Scienze Cliniche
Specialistiche ed Odontostomatologiche-
Sez, Biochimica,
Università Politecnica delle Marche,
Ancona, Italy

Álvaro Hernáez

Instituto August Pi i Sunyer de
Investigación Biomédica (IDIBAPS);
CIBER de la Fisiopatología de la
Obesidad y Nutrición (CIBERobn);
Instituto Hospital del Mar de
Investigaciones Médicas (IMIM),
Barcelona, España

Ana Lobo-Prieto

Instituto de la Grasa (CSIC), Campus
Universidad Pablo de Olavide, Sevilla,
España

Romina P. Monasterio

Departamento de Química Analítica.
Facultad de Ciencias,
Universidad de Granada, Granada, España

María T. Morales Millán

Departamento de Química Analítica,
Facultad de Farmacia,
Universidad de Sevilla, Sevilla, España

María D. Navarro-Hortal

Instituto de Nutrición y Tecnología de los
Alimentos “José Mataix Verdú”. Centro
de Investigación Biomédica.
Departamento de Fisiología.
Universidad de Granada, Granada, España

Lucía Olmo García

Departamento de Química Analítica.
Facultad de Ciencias,
Universidad de Granada, Granada, España

Clemente Ortiz Romero

Instituto de la Grasa (CSIC), Campus
Universidad Pablo de Olavide, Sevilla,
España

José L. Quiles

Instituto de Nutrición y Tecnología de los
Alimentos “José Mataix Verdú”. Centro
de Investigación Biomédica.
Departamento de Fisiología.
Universidad de Granada, Granada, España

Patricia Reboredo Rodríguez

Nutrition and Bromatology Group,
Department of Analytical and Food
Chemistry, Faculty of Science,
University of Vigo, Ourense, Spain

José M. Romero-Márquez

Instituto de Nutrición y Tecnología de los
Alimentos “José Mataix Verdú”. Centro
de Investigación Biomédica.
Departamento de Fisiología.
Universidad de Granada, Granada, España

Jesús Simal Gándara

Nutrition and Bromatology Group,
Department of Analytical and Food
Chemistry, Faculty of Science,
University of Vigo, Ourense, Spain

Noelia Tena Pajuelo

Departamento de Química Analítica,
Facultad de Farmacia,
Universidad de Sevilla, Sevilla, España

Isabel Trujillo Navas

Departamento de Agronomía,
Universidad de Córdoba, Córdoba, España

Alfonso Varela-López

Instituto de Nutrición y Tecnología de los
Alimentos “José Mataix Verdú”. Centro
de Investigación Biomédica.
Departamento de Fisiología.
Universidad de Granada, Granada, España

Lista de Abreviaturas

2-DG	2-desoxi-D-glucosa
AAI	Grupo de Investigaciones Agro-Ambientales y Alimentarias
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Ácido gálico
AGAUR	Agencia de Gestión de Ayudas Universitarias e Investigación de Cataluña
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
AO	Aceite de oliva
AOV	Aceite de oliva virgen
AOVE	Aceite de oliva virgen extra
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Atg	Proteínas reguladoras de la autofagia
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma-2</i>
BGMO	Banco de Germoplasma Mundial de Variedades de Olivo
BPC	<i>Base Peak Chromatogram</i>
CARIN	Grupo de investigación de Riesgo Cardiovascular y Nutrición
CCNIEC	Centro de Estudios Catalanes en Nutrición
CE	<i>Capillary Electrophoresis</i>
CIBERobn	Centro de Investigación Biomédica en Red de Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición
COI	Consejo Oleícola Internacional
CoQ ₁₀	Coenzima Q ₁₀
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas

DE	Desviación estándar
DHE	Distinción, Homogeneidad y Estabilidad
DHS	<i>Dynamic Headspace</i>
DietMed	Dieta mediterránea
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
DMSO	<i>Dimethyl sulfoxide</i>
DOP	Denominación de Origen Protegida
DPPH	<i>2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate</i>
E.T.S.I.A.M	Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes
ECAR	<i>Acid Efflux Rate</i> - tasa de acidificación celular
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EROs	Especies reactivas del oxígeno
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
EU	<i>European Union</i>
FCCP	<i>Carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxy-phenylhydrazone</i>
FDA	Administración Federal de Medicamentos de EEUU
FID	<i>Flame Ionization Detector</i>
fMRI	<i>functional Magnetic Resonance Imaging</i>
FTIR	Espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier
GADPH	<i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
GC-MS	<i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HPLC-DAD	<i>High Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detector</i>
HSSE	<i>Headspace Sorptive Extraction</i>
IC	<i>Inhibitory Concentration</i>
IFAPA	Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica

IGP	Indicación Geográfica Protegida
IMIM	Instituto Hospital del Mar de Investigación Médica
LC-MS	<i>Liquid Chromatography Mass Spectrometry</i>
LDL	Lipoproteína de baja densidad
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7</i>
MOS	<i>Metal-oxide-semiconductor</i>
MS	<i>Mass spectrometry</i>
MTT	Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenitetrazolio
NF1	Grupo de Nutrición y Ciencia de los Alimentos
OCR	<i>Oxygen Consumption Rate</i>
OPG	Osteoprotegerina
p53	<i>protein p53</i>
PAI	Plan Andaluz de Investigación
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PLS-DA	<i>Partial Least Square-Discriminant Analysis</i>
ppm	Partes por millón
ppt	Partes por trillón
PREDIMED	Prevención con Dieta Mediterránea
Q-TOF MS	<i>Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i>
REGICOR	Registre Gironí del Cor
RMN	Resonancia magnética nuclear
RT-PCR	<i>Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction</i>
SCI	<i>Science Citation Index</i>
SDE	<i>Simultaneous Distillation and Extraction</i>
SFE	<i>Supercritical Fluid Extraction</i>
SPME	<i>Solid Phase Microextraction</i>
SPME-GC	<i>Solid Phase Microextraction-Gas chromatography</i>
SPME-GC-FID	<i>Solid Phase Microextraction-Gas chromatography with Flame-Ionization</i>

SSR	<i>Simple sequence repeats</i>
TBARS	<i>Thiobarbituric acid reactive substances</i>
TLC	<i>Thin Layer Chromatography</i>
TNF- α	<i>Tumor Necrosis Factor - alpha inhibitors</i>
UCO	Universidad de Córdoba
UCOLIVO	Recursos genéticos y mejora del Olivo
UPOV	Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales
UV	Ultravioleta

Variedades de olivo: catalogación, certificación y registro de variedades comerciales

1

Isabel Trujillo Navas

Departamento de Agronomía, Universidad de Córdoba, Córdoba, España

Breve reseña del grupo de investigación

En el año 1989 se constituye el grupo de investigación PAI (Plan Andaluz de Investigación) “AGR- 157”, actualmente se denomina “Recursos genéticos y mejora del Olivo” (UCOLIVO) y está vinculado al Departamento de Agronomía de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y de Montes (E.T.S.I.A.M) de la Universidad de Córdoba (UCO).

Tres son las principales líneas de investigación del grupo: 1) Catalogación, Conservación y Utilización de los Recursos Genéticos en Olivo; 2) Mejora Genética del Olivo y 3) Olivar en Seto.

Entre los hitos alcanzados por el grupo hay que destacar que UCOLIVO es considerado a nivel internacional un grupo pionero en la catalogación, evaluación y conservación de los recursos genéticos en olivo. Sus actividades en esta línea se inician en la década de los 70 del siglo pasado. Dicho grupo es responsable del Banco de Germoplasma Mundial de Variedades de Olivo (BGMO) localizado en el Campus de Rabanales de la UCO, así como del Reservorio de aislamiento de Variedades Comerciales de Olivo que garantiza a los viveristas material inicial sano y auténtico para la producción de planta certificada. Estas colecciones actualmente conservan más de 600 variedades de olivo de todo el mundo y sirven como punto de partida y colaboración a numerosos grupos de investigación que desarrollan proyectos centrados en el olivar y el aceite de oliva.

Desde 1991 el Grupo de Pomología lidera la mejora de olivo para la obtención de nuevas variedades adaptadas a las necesidades de la nueva olivicultura. En 2008 el programa UCO-IFAPA registró su primera variedad de olivo, ‘Sikitita’, adaptada a sistemas plantación superintensivos y registrada en la Unión Europea y en otros 9 países.

Recientemente, se han puesto en marcha nuevas líneas del programa de mejora, desarrolladas exclusivamente por la UCO y con financiación privada. La empresa Todolivo S.L. financia una línea de mejora que busca variedades de olivo con buenas características para su utilización en olivar en seto y proporcionen diferentes tipos de aceite. Fruto de esta línea se ha iniciado el registro de 38 nuevas selecciones que van a ampliar en gran medida la disponibilidad varietal en este prometedor sistema de plantación. La Interprofesional del Aceite de Oliva Español financia una línea de mejora que trata de obtener nuevas variedades de olivo tolerantes a *Verticillium dahliae*, la enfermedad más preocupante para el olivar de nuestro país. Recientemente, y en el marco del proyecto europeo LIFE-Resilience, el grupo UCOLIVO busca la obtención de nuevas variedades resistentes a *Xylella fastidiosa*. Desde su inicio el programa de mejora ha evaluado más de 30.000 genotipos, unas 300 preselecciones y 31 selecciones avanzadas cuya evaluación en campo prosigue para registrar nuevas variedades comerciales próximamente.

Los miembros del Grupo UCOLIVO han publicado más de 150 artículos en revistas internacionales (SCI), ejecutados 36 proyectos de investigación públicos nacionales e internacionales y liderado más de 50 proyectos con empresas privadas relacionadas con el sector oleícola. Hay que destacar en el apartado de publicaciones, los libros publicados por miembros de este grupo sobre variedades de olivo (Andalucía, España y mundial) y “El Cultivo del Olivo” que, con sus 7 ediciones en español y una en inglés, pasa por ser el libro agrícola con mayor difusión de nuestro país.

Miembros del grupo UCOLIVO han sido socios promotores de tres empresas de base tecnológica (Fertinyet S.L., Idolive S.L., Pomología S.L.) que han permitido comercializar investigaciones y patentes propias.

El grupo UCOLIVO ha acreditado su capacidad de formación de científicos y tecnólogos que actualmente desempeñan su actividad en universidades, centros de investigación, administración pública y en empresas, cooperativas y otras sociedades del sector oleícola nacional e internacional. Esta experiencia ha proporcionado una plataforma susceptible de promover relaciones público -privadas para la innovación del sector oleícola.

En la actualidad los convenios con el Consejo Oleícola Internacional (COI), Ministerio de Agricultura, Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria, Pesquera, Alimentaria y de la Producción Ecológica (IFAPA) y Consejería de Agricultura han permitido que el BGMO de Córdoba sea el Banco Internacional de Referencia de la Red

COI, que incluye Bancos en 22 países. La autenticación de la totalidad de accesiones del Banco, encomendada por el COI a la UCO, permitirá la autenticación y catalogación de la totalidad de accesiones de la Red.

Se ha iniciado el registro de dos nuevas variedades para su utilización en olivar en seto. Su adjudicación por concurso público está en trámite de próxima publicación y resolución. La continuación de las líneas enumeradas proporcionará variedades para la nueva olivicultura en los próximos años, en particular de variedades tolerantes a *Verticillium dahliae* y *Xylella fastidiosa*. Se ha iniciado una nueva línea de evaluación y obtención de variedades con pocas necesidades de frío para su floración y fructificación. Esta línea proporcionará materiales para la adaptación al cambio climático en el Mediterráneo y a nuevas áreas de cultivo. La reciente publicación del genoma de olivo permitirá a la nueva generación de investigadores desarrollar herramientas de selección genética que acortará plazos, reducirá precozmente genotipos indeseables y permitirá ganar en precisión en la obtención de nuevas variedades. La obtención de los nuevos materiales y su adaptación a diferentes ambientes se llevará posiblemente a cabo en consorcios público- privados.

1.1 Introducción

El cultivo del olivo se ha desarrollado desde hace aproximadamente 6000 años en la Cuenca del Mediterráneo, donde se localiza el 98% del patrimonio oleícola. Su hábitat está determinado precisamente por el clima mediterráneo, caracterizado por inviernos relativamente suaves y veranos secos y calurosos. Las áreas pertenecientes a este tipo climático se localizan entre los paralelos 30° y 45° de ambos hemisferios. A principios del siglo XVI, el olivo sale de su hábitat natural y se difunde en primer lugar al continente americano y en particular a Sudamérica y Centroamérica (Argentina, Chile, México y Perú). Más tarde, en el siglo XVIII el olivo también es llevado a Norteamérica (California) por los monjes franciscanos. En la actualidad, su cultivo ha continuado su expansión en estos países, así como a otros nuevos (Australia, Brasil, Nueva Zelanda, China y Japón, entre otros).

Durante los últimos años determinadas zonas de España sin tradición olivarera están interesadas en establecer el cultivo del olivo. Es el caso de Galicia, región donde el olivo

ha estado presente desde antiguo formando parte de su cultura. Si bien, este no ha sido objeto de su cultivo con fines comerciales hasta hace escasos años.

En lo que respecta al conocimiento del material vegetal existente en dicha zona, hay que destacar que durante los últimos años se han puesto en marcha iniciativas para conocer del patrimonio genético local en dicha especie e interesantes estudios donde se evalúa el factor variedad en la singularidad de aceites de oliva virgen extra (AOVE) ecológicos obtenidos a partir de sus variedades. Los resultados obtenidos hasta la fecha han sido publicados por Reboredo-Rodríguez y col., (2018) y Gago y col., (2019). El primero de dichos estudios se centró en comprobar la autenticidad varietal de variedades supuestamente locales que se cultivan para la producción ecológica de aceites de calidad (AOVE) y su influencia en las singularidades de los mismos. El estudio realizado por Gago y col., (2019) se centró en recolectar y catalogar árboles singulares y/o centenarios que hay diseminados en diferentes zonas de Galicia y donde juegan un papel ornamental y paisajístico. A diferencia del estudio anterior los ejemplares localizados no eran objeto de cultivo. Los resultados obtenidos en este trabajo fueron similares a los obtenidos en estudios realizados sobre árboles singulares en nuestro grupo (Muñoz y col., 2011). Algunos de los ejemplares localizados coincidieron con variedades supuestamente locales de la zona. Otros ejemplares, se correspondían con variedades importantes y procedentes del país limítrofe Portugal, algo muy común en el olivo (Belaj y col., 2001, 2004; Trujillo y col., 1995, 2005, 2014). Y finalmente, otros ejemplares eran desconocidos, estos no se correspondían con ninguna variedad conocida hasta la fecha. En estos casos no se debe descartar la posibilidad de que pudieran tratarse de formas ferales (ejemplar originado a partir de una semilla de una variedad o procedente de la hibridación entre un cultivar y acebuche), suceso bien conocido en el olivo (Angiolillo y col., 1999; Besnard y Bervillé, 2001; Lumaret y col., 2004; Muñoz y col., 2011; Zohary y Hopf, 1994). En estos últimos casos convendría completar su catalogación antes de elevarlos al rango de variedad cultivada, lo que exige que el material haya sido propagado y establecido en plantaciones comerciales (ver definiciones de olivo singular y variedad cultivada, en el epígrafe 3.1).

En este capítulo se resume la ponencia de Isabel Trujillo “Catalogación de Variedades Cultivadas de Olivo” impartida en la jornada divulgativa “As bondades do consumo de aceite de oliva virxe” celebrada el 7 de marzo de 2019 en el Campus de Ourense de la Universidad de Vigo. Dicha jornada iba dirigida a toda la sociedad, comunidad científica y técnicos involucrados en el naciente sector oleícola gallego.

Merece destacar el interés suscitado por dicho sector en conocer las principales características del material cultivado en esta especie y cómo abordar la catalogación de sus variedades. En el presente capítulo, se abordan todos estos aspectos desde la experiencia (más de 40 años) de investigadores del grupo de investigación UCOLIVO de la Universidad de Córdoba al cual pertenezco desde su creación en el año 1989.

1.2 Los recursos genéticos en olivo

Los recursos fitogenéticos comprenden la diversidad genética correspondiente al mundo vegetal que se considera poseedora de un valor para el presente o el futuro. Bajo esta definición se incluyen normalmente las categorías siguientes: variedades de especies cultivadas, tanto tradicionales como comerciales; especies silvestres o asilvestradas afines a las cultivadas o con un valor actual o potencial, y materiales obtenidos en trabajos de mejora genética (Esquinas- Alcázar, 2005).

El olivo pertenece a la especie *Olea europaea* L. donde se incluyen todas las variedades de olivo cultivado, el olivo silvestre o acebuche y las formas ferales (individuos originados a partir de semillas de variedades cultivadas y a los procedentes de la hibridación entre éstas últimas y olivos silvestres (Zohary y Hopf, 1994).

Hay diferencias de opinión sobre cómo clasificar dentro de la especie, pero generalmente se considera que los olivos cultivados pertenecen a la subespecie *sativa* y los olivos silvestres (o acebuches) a la subespecie *sylvestris* (Rappoport, 2018).

La diversidad varietal es una pauta común en todos los países tradicionalmente olivareros, algunos autores estiman que puedan existir alrededor de 2000 variedades en el mundo (Lavee y col., 1994). Esta gran diversidad es debida a que el olivo es una especie preferentemente alógama, el olivo cultivado y silvestre son interfértiles y hasta fechas muy recientes el cultivo no ha sido objeto de una presión de selección importante por el hombre. El proceso que explicaría el origen de tal diversidad se ilustra en la Figura 1.1 (Rallo y col., 2005). Debido a la presencia de bosques de acebuche a lo largo de la cuenca mediterránea, en cada zona se debieron seleccionar los individuos más sobresalientes en cuanto a su productividad, tamaño del fruto, oleosidad y adaptación al medio. Posteriormente, gracias a la clonación (propagación vegetativa) de estos individuos seleccionados se originarían las primeras variedades. La reiteración de este procedimiento: difusión de cultivares-hibridación-selección de descendencia-clonación

ha originado una gran diversidad de cultivares autóctonos, productos del azar, en todas las zonas oleícolas del mundo inclusive en América, donde es probable que en el inicio del cultivo se utilizaran además de la propagación vegetativa la sexual. En el último caso, en la descendencia originada de los cruzamientos (hibridaciones) se debieron seleccionar y clonar nuevas variedades que son diferentes de las cultivadas en la cuenca del mediterráneo tal y como lo evidencian estudios realizados en países de Latinoamérica como Argentina (Cólica, 2008, Hoffman y col., 2008) y Chile (Tapia, 2001 y Trujillo y Tapia, 2005).

Otras características de la estructura varietal son la antigüedad y limitada difusión de las variedades fuera de sus posibles zonas de origen. Cabe destacar también la acusada homogeneidad genética que existe dentro de las variedades cultivadas (ausencia de variabilidad intracultivar) debida a los procedimientos de propagación vegetativa o asexual utilizados y a la muy baja frecuencia de mutaciones en esta especie (Trujillo y col., 2014), a diferencia de otros frutales donde gran parte de las variedades se han originado por mutaciones somáticas, buen ejemplo de ello son los cítricos y la vid (Cabello y col., 2012, Hidalgo Fernández-Can y Hidalgo Togores, 2011; Hueso y Cuevas, 2014).

En olivo a diferencia de otras especies frutales, la obtención de nuevas variedades por mejora genética es aún muy limitada.

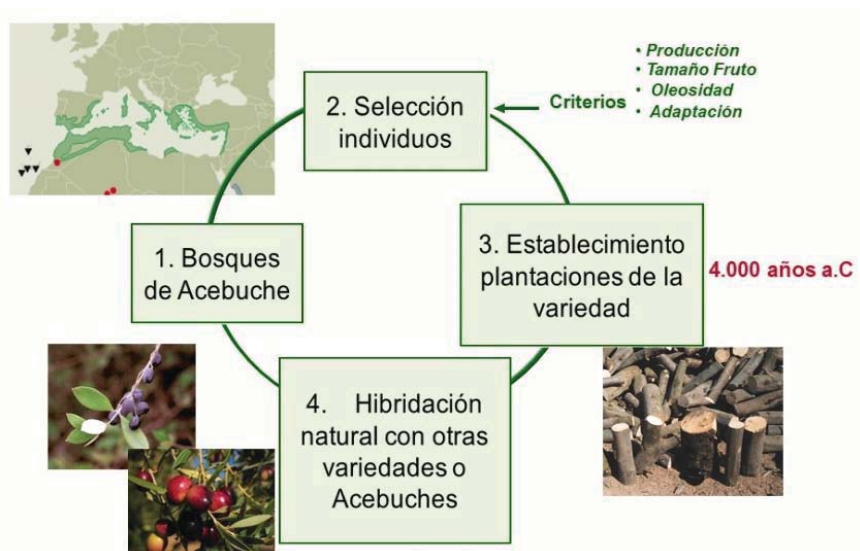


Figura 1.1 Esquema del ciclo de selección de las variedades de olivo tradicionales (Fuente: Rallo y col., 2005).

El largo periodo juvenil de esta especie y los escasos conocimientos sobre su genética ha limitado la obtención de novedades varietales por mejora. Los primeros programas de mejora genética en olivo se inician a finales del siglo pasado y en la actualidad existen interesantes programas de mejora en los diferentes países olivareros. Sin embargo, el número y difusión de las nuevas variedades obtenidas hasta la fecha en los mismos es aún limitado (de la Rosa y León, 2019).

Por ello, se puede decir que los recursos genéticos en el olivo lo componen fundamentalmente las variedades tradicionales originadas por azar y seleccionadas durante siglos por infinidad de olivareros anónimos (Figura 1.1).

1.3 Catalogación de variedades de olivo: experiencia UCOLIVO

El olivo es una especie donde existe una gran casuística debida: a) la existencia de un gran número de variedades y de cómo estas se han ido originando a lo largo de tiempo; b) los criterios genéricos utilizados para denominar a las variedades y c) el empleo de metodologías muy heterogéneas y diversas.

Todos ellos representan los principales inconvenientes que han dificultado el conocer las variedades cultivadas en la mayoría de los países olivareros, estudios pendientes de ser completados aún. España se puede decir que es el país que mejor conoce a sus variedades. Ello se debe en gran medida al esfuerzo y dedicación que vienen realizando desde finales siglo pasado, investigadores pertenecientes al grupo de investigación UCOLIVO de la UCO.

El estudio de los recursos genéticos de olivo junto con la mejora genética representa las principales líneas del citado grupo. Este está reconocido nacional e internacionalmente como el grupo pionero y líder en el estudio de las variedades de olivo. Fue el primer grupo en abordar de forma sistemática en olivo la catalogación varietal iniciada con la prospección varietal (Barranco y Rallo, 1984). Para ello fue necesario desarrollar y optimizar protocolos metodológicos adecuados para tal fin.

Los estudios realizados por UCOLIVO marcan un antes y un después en la catalogación varietal en olivo, ello se debe a sus resultados y repercusión en el mundo oleícola. Los resultados más relevantes se han materializado en la elaboración de diferentes catálogos utilizando sistemáticamente la misma metodología, aspecto de suma importancia como ya mencionaré más adelante. “Las Variedades de Olivo Cultivadas en Andalucía” se

corresponde con el primer catálogo publicado por Barranco y Rallo, (1984). Dicha obra incentivó a estudios similares otras regiones olivareras de España como son Cataluña, (Tous y Romero, 1993) y Valencia (Iñiguez y col., 2001). Posteriormente, se publicó la catalogación completa de las variedades cultivadas en nuestro país (Libro I “Elaiografía Hispánica” (Barranco y col., 2005). Libro contenido en la obra “Las Variedades Cultivadas de España” (Rallo y col., 2005). He de destacar que dicha obra obtuvo el premio “El Mejor Libro Agrario del año 2005” en la Feria Agraria de San Miguel de Lérída. Dicha feria se celebra anualmente y es el punto de encuentro de las empresas líderes del sector agrario. Sus distintivos de calidad, innovación y experiencia la avalan como la feria del sector frutícola de referencia nacional y europea.

En el ámbito internacional hay que destacar la publicación de el “Catálogo Mundial de Variedades de Olivo”. Primer catálogo existente en el mundo de tales características. Esta obra fue traducida a 4 idiomas (español, francés, inglés e italiano) y reconocida internacionalmente por la American Society for Horticultural Science- a la calidad de este libro en la revista HortScience, 36(6):1171 (2001) por ser el catálogo más completo y sistemático realizado hasta la fecha e impulsar la elaboración de catálogos nacionales realizados países miembros (en total 23) del COI.

También son diversos los estudios realizados en la catalogación de variedades conservadas en colecciones o bancos de germoplasma establecidos en diferentes países entre los que se incluyen: Argentina (Hoffmann y col., 2008), Chipre (Emmanouilidou y col., 2018), España (Trujillo y col., 2014), Italia (Bracci y col., 2009, Erre y col., 2010), Túnez (Fendri y col., 2010). De ellos quiero destacar los estudios de catalogación llevados a cabo en el BGMO de Córdoba, por ser el estudio más completo en cuanto al número de variedades se refiere y su aportación metodológica. Y además los resultados obtenidos han repercutido positivamente en otras actividades de investigación como por ejemplo la mejora genética. Y no es menos importante su repercusión en actividades de transferencia de conocimiento al sector productivo en lo referente a la importancia de producir comercialmente planta de calidad como las máximas garantías sanitarias y de identidad varietal.

El BGMO de Córdoba representa el banco más completo y mejor identificado de los 22 bancos existentes en olivo en el mundo. En el año 2015 fue reconocido “Banco de Referencia Internacional” por el COI. El banco inicialmente fue establecido en el Centro Alameda del Obispo del IFAPA, en Córdoba. Posteriormente y por seguridad se

establecieron dos copias. Una de ellas se ubicó en el Campus Universitario de la Universidad de Córdoba (año 2011) y la segunda copia en el IFAPA de Mengíbar (Jaén). Los resultados que a continuación detallo corresponden a los obtenidos en la catalogación del BGMO-IFAPA, Córdoba, de cuya identificación fui responsable hasta el año 2011. La labor de catalogación de una colección de este tipo requiere de tiempo y experiencia dado el elevado número de individuo a analizar y a la casuística que nos podemos encontrar en la misma. Junto a los inconvenientes inherentes a la catalogación en olivo (sinónimias, homonimias, etc) están los errores que pueden cometerse durante el proceso de catalogación, iniciado desde que una accesión es introducida en el banco hasta su establecimiento en los invernaderos y campo. Ello exige que tengan que ser evaluados cada uno de los árboles establecidos en el banco.

Los principales hitos alcanzados en dichos estudios y su repercusión se resumen en:

■ **Elaboración y optimización un protocolo para catalogar de variedades de olivo.**

Este se corresponde con el protocolo propuesto para la catalogación de las 22 colecciones que integran la Red de Bancos del COI y para llevar a cabo proyecto *True healthy olive cultivars* (THOC) (Trujillo y col., 2019). Ambas iniciativas del COI con los objetivos de completar la catalogación en olivo e impulsar esquemas de certificación varietal que permitan la circulación de material comercial con las máximas garantías sanitarias y de autenticidad varietal.

■ **Establecer la dúplica del BGMO en el Campus Universitario de Rabanales de la UCO partiendo de las variedades ya identificadas y autenticadas.** Para que una colección o banco de germoplasma pueda cumplir sus objetivos como son: Conservación, Utilización e Intercambio de material es imprescindible que su material esté identificado y autenticado.

■ **Creación de una Base de Datos.** La información generada de la descripción morfológica y molecular de las diferentes variedades incluidas en el BGMO-IFAPA permitió crear la base de datos más completa de las existentes en olivo. Una base de datos representa un instrumento básico e imprescindible para abordar la identificación y autenticación de las variedades de olivo tal y como se verá más adelante. La ampliación de esta es continua pues permanentemente se está identificando nuevo material que se incluye en el banco. En la actualidad contiene 577 perfiles morfológicos y moleculares SSRs.

En los siguientes epígrafes se describen los fundamentos y conceptos que hay que saber diferenciar para abordar cualquier estudio sobre material vegetal en el olivo. La metodología y criterios utilizados durante las diferentes etapas del proceso de la catalogación varietal: caracterización, identificación, autenticación y denominación (establecimiento de los nombres) utilizados por el grupo UCOLIVO.

1.3.1 Fundamentos y conceptos

Para realizar una correcta catalogación del material cultivado de una especie es imprescindible conocer bien la estructura varietal de esa especie y como se han originado sus variedades. El asumir para el olivo lo que sucede en otras especies hace cometer errores importantes, lo que impide concluir correctamente el proceso de catalogación. Un claro ejemplo de ello es la comparación con la vid, cultivo tan antiguo como el olivo. Entre ambas especies existen analogías como su elevado número de variedades y la presencia de sinonimias y homonimias. No obstante, existe una importante diferencia entre ambas y es cómo se han originado sus diferentes variedades. En la vid, la mayoría de las variedades se han originado mutaciones somáticas suceso bastante frecuente en la vid (Hidalgo Fernández-Can y Hidalgo Togores, 2011). Por el contrario, la frecuencia de mutación es muy baja en el olivo y sus variedades, la mayoría se han originado por hibridación al azar (Figura 1.1) o dirigidas en el caso de las variedades obtenidas en programas de mejora genética.

Otro aspecto importante que hay que considerar es saber diferenciar los conceptos y terminología asociada a los procesos de catalogación. El uso incorrecto de estos ha impedido y sigue impidiendo abordar de forma correcta la catalogación varietal en olivo. Por esta razón, en el presente documento y en base a nuestra experiencia hemos incluido las definiciones de los conceptos y terminología más relevante y fuente de mayor confusión, curiosamente persistentes en trabajos muy recientes realizados en olivo. En algunos casos junto a la definición se añade una nota aclaratoria que ayuda a diferenciar algunos términos que son utilizados erróneamente como sinónimos.

■ **Accesión.** Término asociado al material conservado en los bancos de germoplasma (colecciones de variedades) y hace referencia a cada una de las introducciones de material que se incluyen en el mismo pertenezca a material cultivado o silvestre.

Cada accesión está representada por un árbol o más árboles, los cuales deben proceder de propágulos del mismo árbol. Este término es confundido con cierta frecuencia con el

de variedad. Para evitar dicha confusión, es conveniente aclarar que una misma variedad puede estar representada por más de una accesión en una colección y que cada una de ellas ha sido introducida a la colección independientemente.

■ **Autenticación varietal.** Proceso mediante el cual se confirma que una variedad se corresponde con la variedad original cultivada en su principal zona de cultivo y/o de origen.

■ **Caracterización varietal.** Descripción de una variedad a cualquier nivel sea este morfológico, agronómico y/o molecular.

■ **Homonimia.** El mismo nombre utilizado para diferentes variedades.

■ **Identificación varietal.** Proceso que nos permite clasificar a una variedad diferente (única) del resto de las variedades con las que esta ha sido comparada.

■ **Nombre de la variedad.** Nombre asignado a una variedad después de su identificación y autenticación. Este término es frecuentemente confundido con el de variedad (ver definición variedad).

■ **Olivo singular.** Se corresponde con un ejemplar de olivo cultivado, forma feral (individuo originado a partir de una semilla de una variedad o procedente de la hibridación entre un cultivar y acebuche) u olivo silvestre (acebuche) que destaca, por su tamaño, edad, producción e interés estético, histórico o cultural. Se localizan como árboles aislados y no son objeto de plantaciones regulares (Muñoz y col., 2011).

■ **Variedad cultivada o cultivar.** Conjunto de plantas cultivadas que se distingue claramente de otras de su especie por cualquier carácter (morfológico, fisiológico, citológico, químico, etc.) y que reproducido sexualmente (caso las legumbres) o asexualmente (caso olivo) conserva sus caracteres distintivos (Sociedad Española de Ciencias Hortícolas, 1999).

1.3.2 Metodología

Gran parte del esfuerzo realizado por el grupo UCOLIVO se ha centrado en el desarrollo y optimización de protocolos metodológicos universales que permitieran abordar la catalogación varietal en olivo. Los principales atributos que debían de cumplir dichos protocolos se resumen en la selección de caracteres: a) mínimamente influenciados por factores ambientales y de cultivo, b) con elevada capacidad discriminante, capaces de

diferenciar muchas variedades, c) universales o fácilmente transferibles y d) que fueran asumibles en tiempo y costes.

Inicialmente se desarrollaron esquemas pomológicos basados en caracteres morfológicos y/o agronómicos (Barranco y Rallo, 1984) previamente seleccionados de acuerdo a los criterios arriba mencionados. En la década de los años 90 del siglo pasado y gracias a los avances tecnológicos ocurridos en esta década, se fueron incorporando al esquema pomológico los marcadores moleculares conforme se iban desarrollando en olivo.

El protocolo actualmente que utilizamos se basa en el empleo integrado de 24 caracteres morfológicos y 17 marcadores SSRs. La necesidad de integrar ambas metodologías se ve justificada para resolver cierta casuística que nos hemos encontrado. Un ejemplo de ello se ilustra en la Figura 1.2, donde se muestran los frutos y endocarpos (huesos) de las variedades ‘Zarza’ y ‘Lechín de Sevilla’. A nivel morfológico las diferencias morfológicas son evidentes. En cambio, las diferencias a nivel de ADN son inapreciables. También nos hemos encontrado variedades sin diferencias morfológicas y muy diferentes a nivel de ADN (Trujillo y col., 2014).



Figura 1.2 Frutos y endocarpos de las variedades ‘Zarza’ y ‘Lechín de Sevilla’, los cuales presentan claras diferencias morfológicas y muy pequeñas diferencias (índice de similitud de 0,96) a nivel de su ADN (Fuente: Barranco y col., 2005).

■ **Descriptor morfológico.** El esquema pomológico incluye los 24 caracteres pertenecientes al árbol (vigor, porte y densidad de la cobertura foliar), hoja (longitud, anchura, relación longitud/anchura y curvatura del eje longitudinal, fruto (peso, relación longitud/ anchura (A), sobre color en plena madurez, simetría (A), forma del ápice (A), presencia de mucrón, forma de la base (A), y endocarpo o hueso (peso, relación longitud/

anchura, simetría (A), simetría (B) forma del ápice (A), presencia de mucrón, forma de la base (A), rugosidad de la superficie, número de surcos fibrovasculares desde la base, distribución de los surcos fibrovasculares en la base) (Figura 1.3). Todos los caracteres se corresponden están reconocidos como obligatorios (señalizados con un asterisco) por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) para realizar los exámenes técnicos de distinción, homogeneidad y estabilidad en olivo (DHE) (UPOV, 2011). El incluir en el esquema caracteres adoptados internacionalmente como es el caso es exigible para el registro de variedades comerciales y variedades protegidas. Son caracteres que han sido consensuados internacionalmente en base a la experiencia de expertos representantes de cada país.

Hay que resaltar la contribución de investigadores del grupo UCOLIVO en la elaboración y consenso de dicho documento. Los 24 caracteres se corresponden con los definidos por Barranco y Rallo (1984) y utilizados en la elaboración de los catálogos varietales (Barranco y col., 2000; 2005).

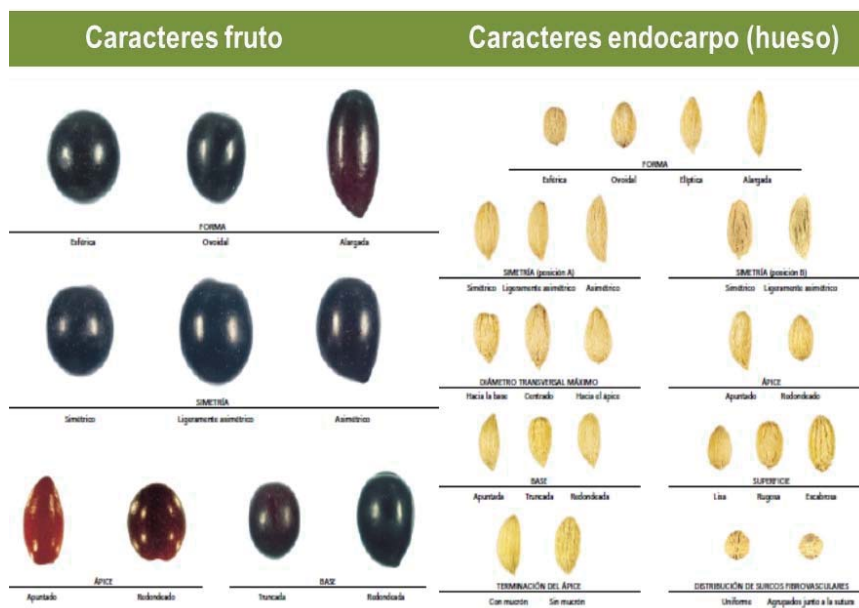


Figura 1.3 Ejemplos de los caracteres morfológicos del fruto y endocarpo (hueso), indicando en cada caso las diferentes categorías establecidas para cada uno de los caracteres (Fuente: “Elaiografía Hispánica”, Barranco y col., 2005).

Como en otros frutales de hueso, los frutos y en particular los caracteres del endocarpo son los más recomendados para la catalogación. Sus principales atributos residen en 1)

una menor influencia ambiental, 2) mayor capacidad para discriminar variedades, 3) permitir una identificación discriminante segura, rápida y económica y 4) su conservación es fácil y prolongada en el tiempo.

Por el contrario, los caracteres de la hoja son muy fluctuantes (dependientes del medio ambiente) y muy poco discriminantes en olivo (son capaces de diferenciar pocas variedades), de ahí que la UPOV considere sólo 4.

■ **Marcadores microsatelites o simple sequence repeats (SSRs).** El protocolo incluye un set de 17 SSRs (UDO99-043, *ssrOeUA-DCA9*, *ssrOeUA-DCA16*, *ssrOeUA-DCA3*, *GAPU101*, *ssrOeUA-DCA11*, *ssrOeUA-DCA4*, *GAPU103*, UDO99-005, *ssrOeIGP7*, *GAPU89*, *ssrOeUA-DCA18*, *ssrOeUA-DCA8*, *ssrOeUA-DCA10*, *GAPU82*, UDO99-042 and *ssrOeUA-DCA15*). Los criterios establecidos para su selección fueron a) su elevada capacidad discriminante (Figura 1.4); b) baja probabilidad de confusión y c) elevada reproducibilidad y facilidad de interpretación.

El tejido utilizado para extraer el ADN y proceder a los análisis de los respectivos SSRs procede de la hoja. Las condiciones de análisis de cada uno de los 17 SSRs están descritas en (Trujillo y col., 2014).

1.3.3 Caracterización

En esta etapa se procede a describir el material para los 24 caracteres morfológicos y 17 marcadores SSRs. Para la descripción morfológica es importante realizarla en una muestra representativa de árbol objeto de estudio. En este sentido el protocolo de toma de muestras (zona del árbol, edad, época) está descrito en detalle en el documento TG/99/4 de la UPOV y en Barranco y col., 2005).

Resultado de dicha descripción es la obtención para cada muestra caracterizada de sus perfiles morfológicos y moleculares. Los cuales, se definen en base a las categorías que exhiba dicha muestra para los 24 caracteres morfológicos y por los alelos que presente para los 17 marcadores SSRs respectivamente.

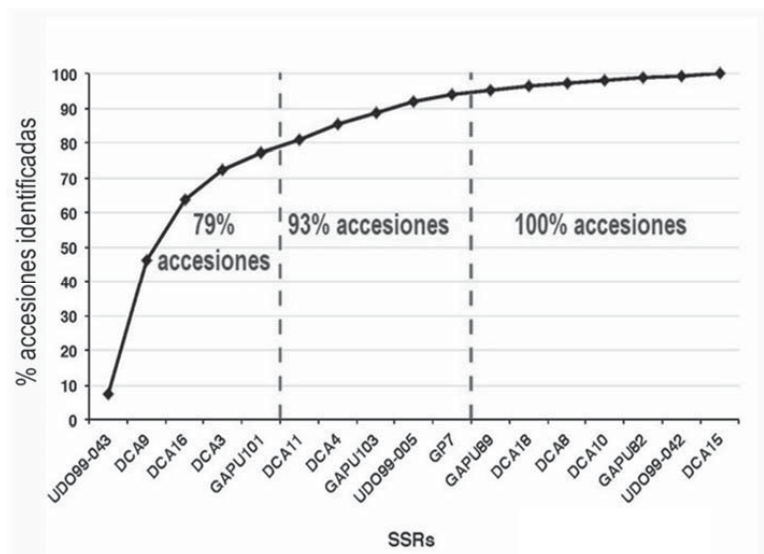


Figura 1.4 Incremento en el porcentaje de accesiones identificadas del BGMO-IFAPA conforme se van adicionando los 17 SSRs seleccionados (Fuente: Trujillo et al., 2005).

1.3.4 Identificación

La identificación nos permite clasificar o diferenciar a una variedad del conjunto de las variedades con las que ésta ha sido comparada. Junto con la autenticación son requisitos obligatorios para que un banco de germoplasma o una colección de variedades pueda intercambiar sus variedades. Así mismo, junto con la sanidad son también requisitos obligatorios para la producción comercial de plantas de olivo con la categoría de certificada.

En la Figura 1.5, se esquematiza como realizamos el proceso de identificación. Una vez caracterizada la muestra procedemos a la comparación de sus perfiles moleculares y morfológicos con los perfiles incluidos en la base de datos disponible por UCOLIVO.

Una vez realizada la comparación puede ocurrir: 1) que los perfiles definidos en la muestra objeto de identificación no coinciden con ninguno de los incluidos en la base de datos. En este caso la muestra se corresponde con una nueva variedad que hemos identificado y 2) que los perfiles coincidan con alguno de los incluidos en la base. En este caso se trata de un duplicado perteneciente a una variedad que ya ha sido identificada antes y por tanto no es una variedad nueva identificada.



Figura 1.5 Esquema que ilustra el proceso de identificación de una muestra de olivo.

1.3.5 Autenticación

Proceso por medio del cual se confirma que una variedad se corresponde con la variedad original cultivada supuestamente en su principal zona de cultivo y/o de origen. Tal y como se ha mencionado antes, el tener certeza de la autenticidad varietal junto con la sanidad son requisitos obligatorios para comercializar una planta de olivo con la categoría de planta certificada.

La autenticación varietal se realiza mediante el contraste de los perfiles SSRs y/o con muestras control auténticas de endocarpos y/o perfiles SSRs tal y como se describe en Trujillo y col., 2014. En este aspecto, el BGMO-UCO, dispone de una amplia colección de muestras de endocarpos de referencia, procedentes de los trabajos de prospección realizados en España (Barranco y Rallo, 1984; Barranco y col., 2005) y de las principales variedades procedentes de 18 países (326 variedades). También se dispone de una colección de muestras de ADN de las 326 variedades autenticadas conservadas a -20 °C (Figura 1.6).



Figura 1.6 Colección de endocarpos y de muestras de ADN auténticas conservadas en el laboratorio de Elaiografía y Marcadores moleculares del Departamento de Agronomía de la UCO.

1.3.6 Establecimiento de los nombres

Una vez finalizada la identificación y autenticación se procede a asignarle a la variedad su nombre definitivo, y definir sus sinonimias, homonimias y denominaciones erróneas. Todo ello, forma parte del establecimiento del índice de denominaciones para el material evaluado, proceso con el que se concluye la catalogación varietal.

En el caso del olivo, los criterios utilizados a lo largo del tiempo para nombrar a las variedades han originado un elevado número homonimias y sinonimias. Este hecho junto al elevado número de variedades existentes en esta especie representa las principales dificultades que suponen los trabajos de inventario y catalogación de variedades de olivo.

Parece ser que cuando el olivicultor primitivo seleccionó las primeras variedades de olivo, este procedió sin duda a darles nombre. Los criterios de designación debieron hacer referencia a características utilitarias o llamativas de las mismas. Con el tiempo las variedades serían más conocidas y se difundirían a lugares próximos. De este modo surgirían nuevos nombres para la misma variedad (sinonimias). Por otro lado, la coincidencia en los criterios de designación, más genéricos que específicos, conduciría a la aparición de homonimias, es decir el mismo nombre para variedades distintas (Rallo y col., 2005).

Para esclarecer toda esta confusión es prioritario el utilizar procedimientos y criterios capaces de poner orden en los nombres con los que son conocidas las diferentes variedades. Por ejemplo, hay que diferenciar el nombre que se adopta o asigna a una

variedad una vez ha sido identificada y autenticada “nombre definitivo” del nombre inicial (original) con el que esta fue localizada.

En primer lugar, se parte del nombre inicial, que es el que se corresponden con el nombre con el que la variedad es conocida en la zona donde se localizó. Una vez identificada y autenticada se establece el nombre definitivo de acuerdo con lo recomendado por el Código Internacional de Nomenclatura de Plantas Cultivadas (Zielinski, 1995). En general, siempre que sea posible, se ha de mantener el nombre inicial y sólo en el caso de existir una imprecisión y no poderse eliminar adoptando denominaciones previamente citadas por otros autores, ésta imprecisión se resuelve añadiendo a la denominación original apelativos referentes a las zonas de origen. A continuación, se describen algunos ejemplos de las situaciones que nos hemos encontrado durante la catalogación del material cultivado en España y como se han resuelto (Figura 1.7) (Barranco y col., 2005).

■ **Muestras pertenecientes a la misma variedad:**

- a) Con nombres idénticos. Este se mantiene como el nombre definitivo.
- b) Con nombres diferentes y comúnmente aceptados. Se adopta, como nombre definitivo al más extendido en la/s zona/s de cultivo/s y el resto de los nombres se consideran sinonimias.

■ **Muestras pertenecientes a variedades diferentes:** con denominaciones iguales (homonimias) y con distinta importancia. En este caso, la variedad más importante conserva su nombre original como el definitivo y para las de menor importancia se les añade un apelativo relativo a la zona de origen o alguna característica peculiar.

■ **Denominaciones erróneas:** muestras recogidas con una denominación correspondiente a una variedad bien definida que han podido identificarse como pertenecientes a otra variedad.

Índice de denominaciones	
<p>'Hojiblanca'</p> <p>Varietal principal</p> <p>Muestras de Alcalá la Real, Antequera, Archidona, Atarfe, Benamejt, Cabra, Campillos, Écija, Estepa, Fernán-Núñez, Jayena, La Roda de Andalucía, Loja, Lucena, Montefrío, Osuna y Setenil.</p> <p>Sinonimias:</p> <p><i>Casta de Lucena</i> en Cabra.</p> <p><i>Lucentino</i> en Baena, Cabra y Castro del Río.</p> <p>Denominaciones erróneas:</p> <p><i>Picudo</i> en Arcos de la Frontera.</p> <p><i>Zorzariga</i> en Osuna.</p> <p>Posibles clones:</p> <p><i>Casta de Cabra</i> en Cabra.</p> <p><i>Hojiblanca de Fruto Grueso</i> en Benamejt.</p> <p><i>Hojiblanca de Fruto Grueso</i></p> <p>Posible clon de 'Hojiblanca' en Benamejt.</p> <p>'Hojiblanca de Aracena'</p> <p>Varietal local</p> <p>Sinonimia: <i>Hojiblanca</i> en Aracena.</p> <p>'Imperial'</p> <p>Varietal difundida</p> <p>Muestras de El Carpio, Porcuna y Pozoblanco.</p> <p>'Imperial de Jaén'</p> <p>Varietal local</p> <p>Muestra de la Estación de Olivicultura, Jaén.</p> <p><i>Injerta</i></p> <p>Homonimia de:</p> <p>'Empeltre' en Barbastro.</p> <p>'Gordal Sevillana' en Arenas de San Pedro, Cebreros y</p>	<p>'Lechin de Granada'</p> <p>Varietal principal</p> <p>Sinonimias:</p> <p><i>Caera</i> en Tabernas.</p> <p><i>Comin</i> en Elche y Lorca.</p> <p><i>Cuquillana</i> en Chelva.</p> <p><i>Cuquillera</i> en Chelva.</p> <p><i>Cuquillo</i> en Jumilla, Orihuela, Villena y Yeste.</p> <p><i>de Aceite</i> en Huércal-Overa, Lorca y Vélez-Rubio.</p> <p><i>Lechin</i> en Alhama, Atarfe, Beas de Segura, Cabra, Dúrcal, Mancha Real, Orcera y Yeste.</p> <p><i>Manzanilla</i> en Caravaca de la Cruz, Cieza, Jumilla, Órgiva y Orihuela.</p> <p><i>Menuda</i> en Ayora y Hellín.</p> <p><i>Minuera</i> en Ábila.</p> <p><i>Negreta</i> en Concentaina.</p> <p><i>Onil</i> en Alcaraz.</p> <p>'Lechin de Sevilla'</p> <p>Varietal principal</p> <p>Sinonimias:</p> <p><i>Alameño</i> en Estepa.</p> <p><i>Cordobés</i> en Ilerena.</p> <p><i>Etjano</i> en La Carlota, Hinojosa del Duque y Pozoblanco.</p> <p><i>Lechin</i> en Antequera, Archidona, Campillos, Castro del Río, Cazalla de la Sierra, Écija, Fernán-Núñez, Lora del Río, La Roda de Andalucía, Marchena, Montilla, Morón de la Frontera, Posadas y Ronda.</p> <p><i>Lechino</i> en Grazalema, Olvera y Setenil.</p> <p><i>Manzanilla Serrana</i> en Tocina.</p> <p><i>Zorzaleño</i> en Algodonales, Arcos de la Frontera,</p>

Figura 1.7 Ejemplos de sinonimias, homonimias y denominaciones erróneas incluidas en el índice de denominaciones de las variedades cultivadas en España (Fuente: “Elaiografía Hispánica”, Barranco y col., 2005).

Referencias bibliográficas

- Angiolillo, A., Mencuccini, M., Baldoni, L. (1999). Olive genetic diversity assessed using amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical Applied Genetics*, 98, 411-421.
- Barranco, D., Rallo L. (1984). *Las variedades de olivo cultivadas en Andalucía*. Madrid (Spain): Ministerio de Agricultura, Junta de Andalucía.
- Barranco, D., Cimato, A., Fiorino, P., Rallo, L., Touzani, A., Castañeda, C., Serafini, F., Trujillo, I. (2000). *World Catalogue of Olive Varieties*. International Olive Oil Council, Madrid, España, 360 pp.
- Barranco, D., Trujillo, I., Rallo, L. (2005). Elaiografía Hispánica. Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J.M., Del Río, C., Martín, A., Tous, J., Trujillo, I. (Eds), *Las variedades de Olivo en España*. Junta de Andalucía. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación. Ediciones Mundi- Prensa, Madrid. 478 pp.

- Belaj, A., Trujillo, I., de la Rosa, R., Rallo, L., Gimenez, M.J. (2001). Polymorphism and discrimination capacity of randomly amplified polymorphic markers in an olive germplasm bank. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 126, 64–71.
- Belaj, A., Satovic, Z., Rallo, L., Trujillo, I. (2004). Optimal use of RAPD markers for identifying varieties in olive (*Olea europaea* L.) germplasm collections. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129, 266-270.
- Besnard, G., Baradat, P., Bervillé, A. (2001). Genetic relationships in the olive *Olea europaea* L. reflect multilocal selection of cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 251-258.
- Bracci, T., Sebastiani, L., Busconi, M., Fogher, C., Belaj, A., Trujillo, I. (2009). SSR markers reveal the uniqueness of olive cultivars from the Italian region of Liguria. *Scientia Horticulturae*, 122, 209–215.
- Cabello Sáenz de Santa María, F., Ortiz Marcide, J., Muñoz Organero, G., Rodríguez Torres, I., Benito Barba, A., Rubio de Miguel, C., García Muñoz, S., Sáiz Sáiz, R. (2012). *Varietades de vid en España*. (pp. 504). Madrid: IMIDRA.
- Cólica, J.J. (2008). *Prospección y Caracterización de Varietades de Olivo Cultivadas en la Provincia de Catamarca (Rep. Argentina)*. Máster of Science en Olivicultura y Elaiotecnía. E.T.S.I.A.M. Universidad de Córdoba.
- de la Rosa, R., León, L. (2019). *Nuevas varietades de olivo. De donde venimos y a dónde vamos*. Mercacei 100. Especial Post-Expoliva, 62-67.
- Diez, C.M., Trujillo, I., Barrio E., Belaj, A., Barranco, D., Rallo, L. (2011). Centennial olive trees as a reservoir of genetic diversity. *Ann Bot*, 108, 797-807.
- Emmanouilidou, M.G., Kyriacou, M.C., Trujillo, I. (2018). Characterization and Identification of Indigenous Olive Germplasm from Cyprus Using Morphological and Simple Sequence Repeat Markers. *HortScience*, 53, 1306-1313.
- Erre, P., Chessa I., Muñoz-Diez, C., Belaj, A., Rallo, L., Trujillo, I. (2010). Genetic diversity and relationships between wild and cultivated olives in Sardinia as assessed by SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 57, 41-54.
- Esquinas-Alcázar, J. (2005). Protecting crop genetic diversity for food security: political, ethical and technical challenges. *Nature Reviews*, 6, 946-953.

- Fendri, M., Trujillo, I., Trigui, A., Rodríguez-García, M.I., Alché, J.D. (2010). SSR identification and endocarp characterization of olive tree accessions in a Tunisian germplasm collection. *HortScience*, 45, 1429–1436.
- Gago, P., Santiago, J. L., Boso, S., Martínez, M. C. (2019). The forgotten, ancient olive trees of the Spanish northwest: A first molecular and botanical analysis. *Spanish Journal of Agricultural Science*, 17, e0702.
- Hidalgo Fernández-Can, L. y Hidalgo Togores, J. (2011). *Tratado de viticultura*. (4th ed.). Madrid: Mundi-Prensa.
- Hoffmann, S., Martínez, L.E., Masuelli, R., García Lampasona, W.S., Trujillo, I. (2008). *Identificación and clasificación of main olive germplasm established in national collections of Argentina*. VI International Symposium on Olive Growing. Abstracts del Congreso. Évora, Portugal.
- Hueso, J.J., Cuevas, J. (2014). *La fruticultura del siglo XXI en España*. Cajamar Caja Rural, 404 pp.
- Iñiguez, A., Paz, S., Illa, F.J. (2001). *Variedades de olivo cultivadas en la Comunidad Valenciana*. Valencia: Conselleria d'Agricultura, Peixca i Alimentació. Generalitat Valenciana.
- Lavee, S. (1994). ¿Porqué la necesidad de nuevas variedades de olivos? *Fruticultura*, 62, 29–37.
- Lumaret, R., Ouazzani, N., Michaud, H., Vivier, G., Deguilloux, M.F., Di Giusto, F. (2004). Allozyme variation of oleaster populations wild olive tree *Olea europaea* L. in the Mediterranean Basin. *Heredity*, 92, 343-351.
- Noormohammadi, Z., Hosseini-Mazinani, M., Trujillo, I., Belaj, A., Romero, L., Sadeghizadeh, M. (2007). Identification and Classification of Main Iranian Olive Cultivars Using Microsatellite Markers. *HortScience*, 42, 545–1550.
- Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J.M., Martín, A., del Río, C., Tous, J., Trujillo, I. (2005). *Variedades de Olivo cultivadas en España*. Junta de Andalucía, Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación y Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Rapoport, H.F., Moreno, I. (2018). Botánica y Morfología. Barranco, D., Fernández-Escobar, R., Rallo, L. (Eds), *El cultivo del olivo* (37-64). Madrid: Mundi-Prensa y Junta de Andalucía.

- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J., Trujillo I. (2018). Genotypic and Phenotypic Identification of Galician olive cultivars and characterization of their Extra Virgin Olive Oils by fatty acid composition and their minor compounds. *Scientia Horticulturae*, 232, 269-279.
- Sociedad Española de Ciencias Hortícolas (SECH). (1999). *Diccionario de Ciencias Hortícolas*. Madrid: Mundi-Prensa.
- Tapia Contreras, F.A. (2001). *Prospección y caracterización morfológica de las variedades de olivo cultivadas en las regiones III y IV de Chile*. Máster of Science en Olivicultura y Elaiotecnía. E.T.S.I.A.M. Universidad de Córdoba.
- Tous, J., Romero, A. (1993). *Variedades de olivo. Con especial referencia a Cataluña*. Barcelona: Fundación ‘La Caixa’-AEDOS.
- Trujillo, I., Rallo, L., Arus, P. (1995). Identifying olive cultivars by isozyme analysis. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 120, 318–324.
- Trujillo, I., Morales, A., Belaj, A., Valpuesta, V., Botella, M.A., Rallo, P., Martín, A., Dorado, G. (2005). Identificación de variedades de olivo por marcadores moleculares. In: Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J.M., Del Rio, C., Martín, A., Tous, J., Trujillo, I. (Eds), *Variedades de olivo en España*. Madrid: Mundi-Prensa.
- Trujillo, I., Ojeda, M.A., Urdiroz, N.M., Potter, D., Barranco, D., Rallo, L., Diez C.M. (2014). Identification of the Worldwide Olive Germplasm Bank of Cordoba (Spain) using SSR and morphological markers. *Tree Genetics & Genomes*, 10, 141–155.
- Trujillo, I., Barranco, D., Cabello, D., Gordon, A., Morello, P., Diez CM., Rallo, L. (2019, October). *Proposal of a Guide for the cataloging, sanitation and management of the Germplasm Banks of the IOC Network (UCOLIVO). The IOC network of germplasm banks and the true healthy olive cultivars Project*. International seminar, Cordoba (Spain).
- UPOV. (2011). Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales. TG/99/4. Olivo. Directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad, 36.
- Zielinski, Q.B. (1955). *Modern systematic pomology*. W.C. Brown, Co. Dubuque.
- Zohary, D., Hopf, M. (1994). *Domestication of plants in the Old World*. (2nd ed.). Oxford, UK: Clarendon Press.

Aroma del aceite de oliva virgen, interpretación química de la percepción sensorial

2

Ana Lobo-Prieto¹, Ramón Aparicio-Ruiz², Noelia Tena Pajuelo², Clemente Ortiz Romero¹, Enrique Díaz Montaña², María T. Morales Millán² y Diego L. García-González¹

¹Instituto de la Grasa (CSIC), Campus Universidad Pablo de Olavide, Sevilla, España, ²Departamento de Química Analítica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, Sevilla, España

Breve reseña del grupo de investigación

El grupo “Trazabilidad y calidad de alimentos” está formado por miembros del Departamento de Caracterización y Calidad de Lípidos del Instituto de la Grasa (CSIC, Sevilla) y de la Universidad de Sevilla (Departamento de Química Analítica). La actividad investigadora del grupo está centrada en la caracterización química de alimentos, su autenticación y en estudios avanzados de su calidad, con un interés especial en la fracción lipídica y la calidad sensorial. En este ámbito, el grupo posee experiencia en aceites comestibles y productos cárnicos. La identificación de marcadores químicos que expliquen los atributos sensoriales y la aceptación de los alimentos por los consumidores son objetivos prioritarios del grupo. Por otra parte, el grupo también desarrolla técnicas basadas en espectroscopía (FTIR, Fluorescencia, etc.) con diversas aplicaciones en calidad y autenticidad, con interés especial en el estudio de la degradación oxidativa de alimentos grasos. Miembros del grupo colaboran activamente como expertos en organizaciones de ámbito internacional. Así mismo, el grupo viene participando en proyectos internacionales centrados en el desarrollo de nuevas estrategias analíticas en caracterización y trazabilidad de alimentos y en estudios de la relación composición química-flavor desde una perspectiva multidimensional que abarca la caracterización química, la biosíntesis de los compuestos de flavor, su impacto en los procesos de olfacción y en la percepción por parte de panelistas y consumidores.

2.1 Calidad del aceite de oliva virgen. Importancia del aroma

La calidad sensorial determina en un alto grado la aceptabilidad de cualquier alimento, siendo el color y el “flavor” las principales sensaciones que contribuyen a la aceptación por parte de los consumidores. Es por esta razón que la caracterización objetiva de la calidad sensorial de un determinado producto es un problema analítico en muchas industrias, siendo en la industria alimentaria donde quizás adquiere una mayor importancia. En el caso concreto del aceite de oliva virgen, esta importancia es evidente debido a que la calidad sensorial, junto con sus conocidos efectos beneficiosos sobre la salud, constituyen elementos diferenciadores de este aceite con respecto a otros aceites comestibles, posicionándolo en un lugar preferente en el Mercado.

El aceite de oliva virgen es en realidad el zumo de la aceituna y se consume sin un proceso de refinación adicional, lo cual da lugar a que se conserven los compuestos minoritarios que proporcionan un aroma y sabor particular caracterizado con notas sensoriales positivas frutadas. La clasificación de los aceites de oliva vírgenes en categorías de calidad depende de su evaluación sensorial y de parámetros químicos y físico-químicos (por ejemplo, acidez libre, índice de peróxidos y absorbancia UV) de acuerdo con la normativa vigente de la Unión Europea (CE, 1991 y actualizaciones) y el COI (2019b).

El aroma, sin duda, tiene una gran influencia en la evaluación sensorial de los aceites de oliva vírgenes por parte de panelistas expertos. Por otra parte, el aroma influye de forma relevante en los consumidores al decidir si un aceite de oliva virgen es de su agrado o no. La olfacción humana, que resulta de la actividad de ~1000 tipos de receptores diferentes, puede detectar y discriminar muchos olores. Pero más allá de la detección, la identificación de los aromas por su nombre puede plantear problemas (Yeshurun y Sobel, 2010). Por otra parte, los humanos pueden decidir de forma clara si un olor es o no desagradable (García-González et al., 2011). Sin embargo, esta hedonicidad depende de la intensidad del olor y la familiaridad con él, que varía según los individuos y las culturas, y puede estar influenciada significativamente por la información visual y verbal (Yeshurun y Sobel, 2010). De hecho, los olores desconocidos son más difíciles de discriminar que los familiares, y la capacidad de discriminar olores en una mezcla parece estar limitada a cuatro (Livermore y Laing, 1998).

Los compuestos responsables de las percepciones de aromas en alimentos, y en particular en el aceite de oliva virgen, son compuestos químicos volátiles que son transportados por el aire inhalado al epitelio olfativo donde, tras interactuar con proteínas específicas de los receptores olfativos, dan lugar a una sensación de olor. Estos componentes volátiles, que están presentes en bajas concentraciones (de ppm a ppt), influyen decisivamente en el disfrute y la aceptación de los alimentos. Independientemente de la componente hedónica del aroma, más asociada a la percepción por parte de los consumidores, estos compuestos volátiles son también los responsables de la detección de defectos sensoriales por parte de los panelistas de un panel de cata cuando llevan a cabo la evaluación para clasificar un aceite fuera de la categoría virgen extra, la cual debe poseer ausencia total de estos defectos.

Los compuestos volátiles son compuestos de bajo peso molecular (<300 Da) caracterizados por tener una alta presión de vapor y, por tanto, se volatilizan a temperatura ambiente. Los volátiles comparten dos características comunes como tener (i) suficiente hidrosolubilidad para difundirse en la mucosa que cubre los receptores olfativos sensibles y (ii) buen grado de liposolubilidad para disolverse en lípidos de membrana contiguos a los receptores de proteínas (Leffingwell, 2001). García-González y cols. (2011) explican el vínculo entre los receptores olfativos y las neuronas que da como resultado la aceptabilidad de los aceites de oliva vírgenes.

Con respecto al origen de los compuestos volátiles en el aceite de oliva virgen, estos se producen principalmente debido a la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (Harwood y Aparicio, 2013). Las enzimas vegetales endógenas, principalmente a través de la cascada de lipoxigenasa, dan lugar a compuestos volátiles que son responsables del aroma agradable (percepción positiva del aroma) (Aparicio et al., 1996; Salas et al., 1999; Morales et al., 1999), mientras que la oxidación química (Morales et al., 1997) y las enzimas exógenas, principalmente debido a la actividad microbiana (por ejemplo, a través de la fermentación en las aceitunas), son responsables del aroma desagradable (defectos sensoriales) (Morales et al., 2005).

Desde una perspectiva metodológica, el aroma del aceite de oliva virgen se puede evaluar a través de la evaluación sensorial llevado a cabo por un panel de cata o mediante el análisis de los compuestos volátiles responsables del aroma. El primero es el método oficial incluido en las normas europeas e internacionales del COI (2018) y ha permitido

un control de la calidad sensorial del producto y establecer categorías comerciales de diferente calidad en el mercado. Este método tiene la desventaja de ser una metodología larga y costosa cuyo resultado final podría verse afectado por cierta subjetividad inherente, lo que ha llevado a la búsqueda de alternativas instrumentales (García-González y Aparicio, 2002a). El análisis de los volátiles en el espacio de cabeza del aceite de oliva virgen mediante cromatografía de gases y el uso de quimiosensores o nariz electrónica se han presentado como métodos de apoyo al panel de cata (García-González y Aparicio, 2002a; Aparicio et al., 2012).

El objetivo principal de analizar compuestos volátiles es explicar desde un punto de vista químico y objetivo los atributos sensoriales del aceite de oliva virgen. Pero el impacto de cada compuesto en el aroma requiere estudios adicionales más allá de la identificación y cuantificación de los compuestos. De esta forma, algunas características de los compuestos volátiles como la volatilidad, la hidrofobia, la estructura conformacional y la posición de los grupos funcionales afecta de forma significativa en la percepción sensorial. Por otra parte, el valor de la actividad del olor (Grosch, 1994) de cada volátil y su sinergia y antagonismo son claves para conocer no solo la contribución de los volátiles al aroma (Aparicio et al, 1996), sino también la actividad neuronal de los consumidores cuando prueban aceite de oliva virgen (García-González et al., 2011). Los resultados recientes en la evaluación de atributos sensoriales, y la investigación sobre la actividad cerebral inducida por aromas agradables y desagradables del aceite de oliva virgen, están ayudando a los investigadores a comprender en mayor medida la calidad sensorial del aceite de oliva, definir mejor sus atributos positivos y posibles defectos sensoriales y explicar las razones químicas y fisiológicas de la percepción sensorial.

2.2 Defectos sensoriales del aceite de oliva virgen

El aceite de oliva virgen extraído de aceitunas frescas y sanas, y procesado de manera apropiada, se caracteriza por poseer un único y delicado *flavor* que es y ha sido, desde tiempos remotos, altamente apreciado por los consumidores. Por otra parte, la clasificación del aceite de oliva virgen en diferentes categorías de calidad (virgen extra, virgen, lampante) está basado en atributos positivos (frutado, amargo, picante) junto con una larga lista de posibles defectos sensoriales que pueden aparecer en el aceite y que deben estar ausentes en el caso del aceite de oliva virgen extra. Por ese motivo, los

defectos sensoriales tienen un especial interés en lo que respecta a entender las razones tecnológicas y bioquímicas por las que aparecen, conocer los compuestos responsables de esos aromas y definir en mayor grado la percepción sensorial de esos defectos.

Cuando se parte de aceitunas defectuosas o bien se aplican prácticas inapropiadas en el procesado, almacenamiento o distribución, aparecen defectos sensoriales. Algunos de los más comunes son rancio, atrojado, avinado-avinagrado, borras, moho-humedad, aceituna helada (COI, 2018) debido a diversas causas. De forma general, se puede decir que la razón principal de estos defectos es la presencia de elevadas concentraciones de ciertos compuestos volátiles producidos por procesos fermentativos (por ejemplo, en los defectos atrojado y avinado-avinagrado), o la oxidación de los ácidos grasos insaturados (por ejemplo, en el defecto rancio). Los procesos fermentativos se suelen dar cuando las aceitunas se almacenan durante un largo período de tiempo antes de la extracción de aceite. Por lo tanto, el perfil de los volátiles en un aceite de oliva virgen con defectos sensoriales es muy diferente al de un aceite de oliva virgen extra. En el caso de la oxidación, hay que tener en cuenta que el aceite de oliva virgen es un material lipídico, y como tal, está sujeto a oxidación desde el mismo momento de la extracción, y por eso debe almacenarse y distribuirse en condiciones adecuadas. Estos compuestos volátiles pueden servir como marcadores de estos defectos sensoriales y están vinculados a las causas tecnológicas y bioquímicas.

El defecto rancio es sin duda uno de los defectos sensoriales más comunes y más estudiado. El número y concentración de los compuestos volátiles asociados a este defecto dependen del tipo y la intensidad de la alteración (Morales et al., 1997). Por lo tanto, las altas concentraciones de aldehídos se producen principalmente por oxidación de los ácidos grasos insaturados, mientras que la presencia de ácidos se debe a la oxidación de los aldehídos previamente formados; una alta concentración de ácidos indica un alto nivel de alteración de la muestra de aceite, ya que estos compuestos aparecen al final de un proceso oxidativo (Morales et al., 2005).

La actividad de los microorganismos, tales *Aerobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Clostridium* y *Serratia*, que se encuentran en las aceitunas después de un largo tiempo de almacenamiento, da como resultado la presencia de compuestos volátiles distintos a los habituales, que son responsables del defecto atrojado. En este defecto destacan elevadas

concentraciones de octano, butanoato de etilo, ácidos butanoico y propanoico y 3-metil-1-butanol.

El defecto avinado-avinagrado también se debe a la contaminación microbiana de las aceitunas. Concretamente, bacterias productoras de ácido láctico (*Lactobacillus*) y del ácido acético (*Acetobacter*) en aceitunas pueden dar lugar a un proceso fermentativo en las mismas dando lugar a la producción de etanol, acetato de etilo y ácido acético, que son los principales volátiles responsables de este defecto.

El defecto moho-humedad se debe a la presencia de varias especies del género *Aspergillus* junto con ascomicetos, *Penicillium notatum* y otros hongos (*Alternaria*, *Fusarium*, *Rhizopus*) en aceitunas almacenadas en condiciones de alta humedad (Morales et al., 2005). Estos microorganismos tienen la capacidad de oxidar los ácidos grasos libres, produciendo compuestos volátiles como las metilcetonas (2-heptanona, 2-nonanona). Además, estos microorganismos producen compuestos volátiles de 8 átomos de carbonos (por ejemplo, 1-octen-3-ol, 1-octen-3-ona) que son responsables de la nota sensorial moho-humedad.

2.3 Compuestos volátiles en el aceite de oliva virgen

El aceite de oliva virgen puede presentar casi doscientos compuestos volátiles, pertenecientes a varias clases químicas. La Tabla 2.1 muestra una lista de compuestos que han sido descritos en varias revisiones (Morales y Tsimidou, 2000; Angerosa, 2002; Angerosa et al., 2004; Kalua et al., 2007), algunos de los cuales han sido identificados por estándares o GC-MS. La calidad del aceite de oliva virgen, en términos de aroma se atribuye, en general, a aldehídos, alcoholes, ésteres, cetonas, furanos, e hidrocarburos. No obstante, hay que tener en cuenta que los volátiles identificados dependen en gran medida del método utilizado, además de la calidad del aceite. Por otra parte, también pueden existir compuestos volátiles con un umbral de olor muy bajo aún por identificar que pueden contribuir al aroma.

Tabla 2.1. Compuestos volátiles identificados en aceite de oliva virgen.

Compuestos Volátiles			
<i>Aldehídos</i>	<i>Alcoholes</i>	<i>Ésteres</i>	<i>Ácidos carboxílicos</i>
Acetaldehído	Etanol	Acetato de metilo	Ácido acético
Butanal	Butan-2-ol	Acetato de etilo	Ácido propanoico
3-Metilbutanal	Propan-1-ol	Propanoato de etilo	Ácido butanoico
2-Metilbutanal	2-Metil-3-butenol	Butanoato de etilo	Ácido 3-Metilbutírico
Pentanal	2-Metilpropan-1-ol	Isobutirato de etilo	Ácido pentanoico
Hexanal	Pentanol	2-Metilbutanoato de etilo	Ácido hexanoico
E-2-Pental	Butan-1-ol	3-Metilbutanoato de etilo	Ácido heptanoico
Z-3-Hexenal	1-Penten-3-ol	Acetato de butilo	Ácido octanoico
Heptanal	3-Penten-2-ol	Butanoato de propilo	Hidrocarburos
E-2-Hexenal	2-Metil butan-1-ol	2-Metilpropil butanoato	Octano
E-2-Heptenal	3-Metil butan-1-ol	Acetato de hexilo	Etilbenceno
Octanal	Heptan-2-ol	Acetato de Z-3-hexenilo	Limoneno
2,4-Hexadienal	Hexanol	Etil ciclohexil carboxilato	Otros
Nonanal	E-3-Hexen-1-ol	Cetonas	4-Metoxi-2-metil-2-butanotiol
E-2-Octenal	Octan-1-ol	Butan-2-ona	Guayacol
2,4-Heptadienal	Octen-3-ol	1-Penten-3-ona	
Decanal	Z-3-Hexenol	3-Pentanona	
Z-2-Nonenal	E-2-Hexen-1-ol	4-Metilpentan-2-ona	
E-2-Nonenal	Octan-2-ol	Heptan-2-ona	
E-2-Decenal	6-Metil-5-hepten-2-ol	3-Octanona	
2,4-Decadienal	Nonan-1-ol	Octan-2-ona	
E,E-2,4-Nonadienal		Z-1,5-Octadien-3-one	
E,Z-2,4-Decadienal		1-Octen-3-ona	
E,E-2,4-Decadienal		6-Metil-5-hepten-2-ona	
E-4,5-Epoxy-E-2-decanal		2-Nonanona	
		E- β -Damascenona	

Sin embargo, hay que tener en cuenta que, de todos estos compuestos volátiles, hay que seleccionar aquellos que tienen una contribución al aroma, y además entender su interpretación sensorial. Esto último implica conocer su origen (bioquímico, químico y la razón tecnológica de su aparición) y conocer si contribuye con notas positivas o negativas. En cuanto al origen, los principales compuestos se producen enzimáticamente a partir de ácidos grasos poliinsaturados a través de la vía de la lipoxigenasa (Harwood y Aparicio, 2013) cuando los aceites de oliva se obtienen de aceitunas sanas, se cosechan correctamente en su grado de madurez óptimo y se procesan con tecnología adecuada. Así, el aroma de estos aceites contiene abundante acumulación de aldehídos C6, alcoholes C6 y sus ésteres correspondientes (Aparicio et al., 1997; Aparicio y Morales, 1998; Kalua

et al., 2007) junto con pequeñas cantidades de compuestos C5 (Morales et al., 1999). Hexan-1-ol, hexanal, E-2-hexenal y 3-metilbutan-1-ol, por ejemplo, se han encontrado en los aceites de oliva virgen extra más comunes de la cuenca mediterránea (Aparicio y Luna, 2002) aunque los perfiles varían cuando se plantan cultivares autóctonos del Mediterráneo en otras regiones geográficas (Tena et al., 2007). Por ejemplo, la var. Arbequina cultivada en diferentes condiciones ambientales (por ejemplo, áreas geográficas) (García-González et al., 2010a; 2010b).

Los aceites de oliva vírgenes de peor calidad, que presentan defectos sensoriales, generalmente contienen concentraciones más bajas de compuestos C6 y C5 que los detectados en los aceites de alta calidad, pero tienen un perfil mucho más complejo, con un mayor número de volátiles. Al mismo tiempo, algunos volátiles como aldehídos y alcoholes ramificados C5, dienales C6-C10, aldehídos monoinsaturados C7-C11, o cetonas C8 pueden contribuir con notas sensoriales negativas (Morales et al., 2005). La Tabla 2.2 muestra un resumen de los compuestos volátiles que son marcadores de defectos sensoriales. Estos marcadores han sido estudiados desde diferentes perspectivas (analítica, bioquímica, tecnológica, y sensorial) por el grupo SEXIA en el Instituto de la Grasa (CSIC) durante varias décadas. El resultado, es una información científica que permite establecer aplicaciones prácticas para el control de la calidad de los aceites de oliva virgen mediante la identificación de marcadores de calidad. No todos los defectos sensoriales tienen la misma complejidad. En el caso del defecto helada, se pueden distinguir dos tipos de defectos sensoriales dependiendo si las bajadas de temperatura se dan rápidamente (varios ciclos helada-descongelación) o de forma gradual. No obstante, es un ejemplo de defecto complejo, porque a veces aparecen los dos tipos de perfiles sensoriales de este defecto mezclados. Igualmente, es típico encontrar 2 o más defectos sensoriales al mismo tiempo en la misma muestra, aunque predomine uno sobre los otros.

Tabla 2.2 Principales defectos sensoriales del aceite de oliva virgen, compuestos volátiles marcadores de los mismos, y causa de su aparición.

<i>Defecto sensorial</i>	<i>Compuestos Volátiles</i>	<i>Razón de la aparición del defecto sensorial</i>
Atrojado-borras	Octano Butanoato de etilo Ácido butanoico Ácido propanoico 3-Metil-1-butanol 2-Metil-1-propanol	Aceites obtenidos de aceitunas que sufren fermentación anaeróbica debido a su almacenamiento en pilas (trojes) durante largo tiempo o en contacto con sedimentos fermentados (lodos de decantación) de los depósitos.
Avinado-Avinagrado	Ácido acético Acetato de etilo 3-Metil-1-butanol	Aceites obtenidos de aceitunas que sufren fermentación aeróbica por la presencia de acetobacterias y levaduras debido a un largo almacenamiento.
Moho-humedad-tierra mojada	1-Octen-3-ol 1-Octen-3-ona Acetato de etilo 2-Heptanol Ácido acético E-2-Heptenal Ácido propanoico	Aceites obtenidos de aceitunas que sufren invasión por hongos como <i>Aspergillus</i> o <i>Penicillium</i> tras almacenamiento a baja temperatura y elevada humedad y/o recogidas con tierra o barro y procesadas sin lavar.
Rancio	Pentanal Hexanal Heptanal E-2-Heptenal Octanal Nonanal	Proceso autooxidativo del aceite debido a prolongado contacto con aire, favorecido por un exceso de temperatura, luz y presencia de metales.
Helada	2-Metilbutanoato de etilo Propanoato de etilo Pentanal Octanal	Aceite obtenido de aceitunas dañadas por heladas en el propio árbol. Se dan diferencias en el perfil sensorial dependiendo si las bajadas de temperatura se dan rápidamente (varios ciclos helada-descongelación) o de forma gradual. Perfil tipo 1: jabonoso, fresa, compota, vainilla, madera. Perfil tipo 2: madera, humedad. <i>Nota:</i> Los dos primero compuestos indicados estarían más relacionados con el tipo 1, mientras que los dos últimos estarían más asociados con el tipo 2.

El impacto sensorial de cada compuesto volátil se interpreta atendiendo a su umbral de olor (expresado en unidades de concentración) y su relación con la concentración en la que se encuentra en el aceite (Grosch, 1994; Guth y Grosch, 1991; Reiners y Grosch, 1998). De esta forma, si las concentraciones de los volátiles están por debajo de su umbral olfativo, no contribuyen al aroma del aceite de oliva virgen, aunque pueden ser interesantes como marcadores de trazabilidad de la aceituna y de problemas en la producción.

2.4 Análisis de compuestos volátiles

El panel de cata actualmente es el único método oficial para la evaluación sensorial del aceite de oliva virgen. Este método permite la calificación sensorial de los aceites (virgen extra, virgen, lampante) y la evaluación de todas las percepciones sensoriales en un único análisis. Este sistema de análisis, muy usado en la industria alimentaria, tiene como fin conseguir datos objetivos de caracterización sensorial (incluyendo la caracterización olfativa) a través de datos procedentes de las valoraciones de los miembros del panel. Dichas valoraciones pueden estar sujetas a cierta subjetividad, y para evitarla son necesarias una definición y terminología exacta y unificada de los posibles atributos sensoriales, el uso de sesiones de entrenamiento, el control del personal del panel, y la aplicación de procedimientos estadísticos para la evaluación de los datos. Por este motivo, existen normas que describen todo el procedimiento para normalizar la actividad de todos los paneles de cata (COI, 2018; 2019a). Aun así, a veces no se consigue la eliminación total de la subjetividad, o bien se da el caso de muestras que están en el límite de dos categorías (virgen extra y virgen, o virgen y lampante). Además, el análisis sensorial tiene otros inconvenientes: es costoso, requiere un tiempo de análisis largo, no se puede realizar con elevada frecuencia y el número de muestras en una sesión de cata debe ser limitado para evitar fatiga en la evaluación.

Una alternativa es el análisis de compuestos volátiles mediante cromatografía de gases (por ejemplo, SPME-GC), en aplicación durante mucho tiempo, y que permite obtener una información objetiva de la calidad. Un método analítico para determinar los volátiles involucra todos los pasos del proceso analítico, tales como muestreo, preparación de muestras, separación, identificación, cuantificación y análisis de datos. Cuatro son los puntos que deben considerarse antes de abordar el análisis de volátiles (Morales et al., 1992; 1994):

1. Se obtendrá una pequeña cantidad incluso de una gran cantidad de muestra porque la concentración de volátiles en el aceite de oliva virgen es normalmente baja.
2. La fracción volátil comprende muchos componentes de diferentes pesos moleculares y naturalezas químicas, y sus concentraciones pueden variar ampliamente.

3. No existe una relación directa entre la incidencia de cada compuesto en el aroma de los alimentos y su concentración en la fracción aromática porque los umbrales de detección varían mucho.

4. La formación de artefactos debe evitarse durante el análisis porque pueden interferir y producir resultados incorrectos.

Se requieren métodos que incluyan una fase de aislamiento y preconcentración. Estos métodos son:

- Destilación-extracción (SDE)
- Espacio de cabeza dinámico (DHS, por ejemplo, usando trampa de TENAX)
- Espacio de cabeza estático con preconcentración (por ejemplo, SPME)
- Extracción mediante fluidos supercríticos (SFE)
- Extracción por absorción sobre barras agitadoras (“stir bar sorptive extraction”, HSSE)

La Figura 2.1 muestra un cromatograma de compuestos volátiles típico.

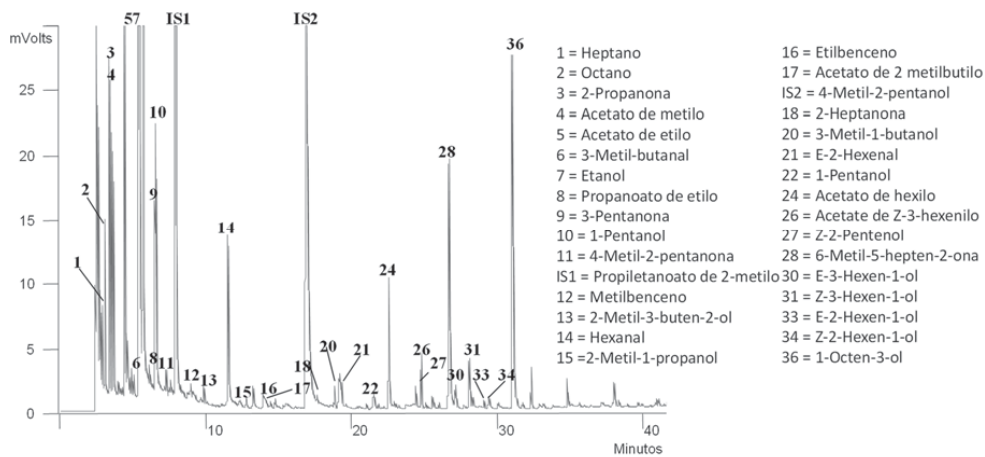


Figura 2.1 Cromatograma de compuestos volátiles (SPME-GC-FID) de un aceite de oliva virgen.

Sin embargo, las técnicas cromatográficas pueden evaluar la calidad sensorial en análisis de rutina, pero no pueden utilizarse en procesos “en línea” debido a la necesidad de un pretratamiento de la muestra o a un paso de preconcentración. Una alternativa es el uso de sensores, ampliamente utilizados en muchos campos de la Química Analítica, que

generalmente no requieren un paso de preparación de la muestra, aunque en algunos casos se necesita algún procedimiento de preconcentración, como SPME.

Un sensor es un dispositivo que puede dar una señal proporcional a la propiedad física o química a la que responde. La integración electrónica de varios sensores dentro de un conjunto constituye una matriz de sensores que puede estar integrada en una nariz electrónica.

Hoy en día, varios sensores comerciales están disponibles en el mercado además de una gran cantidad de prototipos diseñados por grupos de investigación. Todos estos tipos de sensores exhiben interacciones físicas y químicas con los compuestos químicos cuando fluyen o están en contacto con los sensores. La variedad de sensores es, por lo tanto, bastante amplia. Se han usado sensores MOS (sensores de gases de óxido metálicos basados en semiconductores dopados o sin dopar), sensores de polímeros, sensores acústicos o biosensores. Los sensores MOS se han aplicado con éxito para detectar los defectos más comunes en los AOV (por ejemplo, defectos avinado-avinagrado, rancio y atrojado) incluso antes de la evaluación sensorial oficial o prueba de panel (García-González y Aparicio, 2002b). Por lo tanto, se ha demostrado la hipótesis de que la respuesta del sensor depende de la cantidad y composición de los compuestos volátiles al analizar los defectos sensoriales (García-González y Aparicio, 2002c; 2003; 2004).

Los procesos fisiológicos implicados en la percepción olfativa y gustativa, como resultado de los estímulos químicos, se han comenzado a estudiar y son parte de la “caja negra” asociada con la evaluación sensorial y la decisión de los consumidores (García-González et al., 2011). Se están desarrollando nuevos enfoques para medir la respuesta hemodinámica del cerebro durante el proceso de olfato y degustación mediante imágenes de resonancia magnética funcional (fMRI). La aplicación de esta técnica podría abrir una nueva área de investigación para una comprensión completa de las percepciones sensoriales y las decisiones de los consumidores.

Nuevas investigaciones basadas en enfoques químicos, sensoriales y fisiológicos están perfeccionando este conocimiento, y ayudarán al desarrollo de una metodología de apoyo al panel de cata para dar coherencia y unidad a la evaluación sensorial, evitando así la confusión que, en ocasiones, se da en la evaluación sensorial de algunas muestras.

Referencias bibliográficas

- Angerosa, F. (2002). Influence of volatile compounds on virgin olive oil quality evaluated by analytical approaches and sensor panels. *European Journal of Lipid Science Technology*, 104, 639-660.
- Angerosa, F., Servili, M., Selvaggini, R., Taticchi, A., Esposto, S., Montedoro, G. F. (2004). Volatile compounds in virgin olive oil: occurrence and their relationship with the quality. *Journal of Chromatography A*, 1054, 17-31.
- Aparicio, R., Morales, M. T., Alonso, M. V. (1996). Relationship between volatile compounds and sensory attributes of olive oils by sensory wheel. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73, 1253-1264.
- Aparicio, R., Morales, M. T., Alonso, V. (1997). Authentication of European virgin olive oils by their chemical compounds, sensory attributes, and consumers' attitudes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1076-1083.
- Aparicio, R., Morales, M. T. (1998). Characterization of olive ripeness by green aroma compounds of virgin olive oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1116-1122.
- Aparicio, R., Luna, G. (2002). Characterisation of monovarietal virgin olive oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 104, 614-627.
- Aparicio, R., Morales, M. T., García-González, D. L. (2012). Towards new analyses of aroma and volatiles to understand sensory perception of olive oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 1114-1125.
- CE (1991). *Diario Oficial de la Unión Europea*. Reglamento (CEE) N° 2568/91, L 248, 5 de septiembre (y actualizaciones).
- COI (2018). *Sensory analysis of olive oil. Method for the organoleptic assessment of virgin olive oil*. COI/T.20/Doc. N° 15/Rev.10, International Olive Oil Council, Buenos Aires (Argentina), June 2018.
- COI (2019a). *Guidelines for the accomplishment of requirements of standard ISO 17025 of sensory testing laboratories with particular reference to virgin olive oil*. COI/T.28/Doc. N° 1/Rev.5, International Olive Oil Council, Madrid, November 2019.

- COI (2019b). *Trade standard applying to olive oils and olive pomace oils*. COI/T.15/Doc. N° 3/Rev.14, International Olive Oil Council, Madrid, November 2019.
- García-González, D. L., Aparicio, R. (2002a). Sensors: From biosensors to the electronic nose. *Grasas y Aceites*, *53*, 96–114.
- García-González, D. L., Aparicio, R. (2002b). Detection of defective virgin olive oils by metal-oxide sensors. *European Food Research and Technology*, *215*, 118-123.
- García-González, D. L., Aparicio, R. (2002c). Detection of vinegary defect in virgin olive oils by metal oxide sensors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 1809-1814.
- García-González, D. L., Aparicio, R. (2003). Virgin olive oil quality classification combining neural network and MOS sensors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 3515-3519.
- García-González, D. L., Aparicio, R. (2004). Classification of different quality virgin olive oils by metal-oxide sensors. *European Food Research and Technology*, *218*, 484-487.
- García-González, D. L., Romero, N., Aparicio, R. (2010a). Comparative study of olive oil quality from single varieties cultivated in Chile and Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 12899-12905.
- García-González, D. L., Tena, N., Aparicio, R. (2010b). Quality characterization of the new virgin olive oil var. Sikitita by phenols and volatile compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *58*, 8357-8364.
- García-González, D. L., Vivancos, J., Aparicio, R. (2011). Mapping brain activity induced by olfaction of virgin olive oil aroma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *59*, 10200-10210.
- Grosch, W. (1994). Determination of potent odourants in foods by aroma extract dilution analysis (AEDA) and calculation of odour activity values (OAVs). *Flavour and Fragrance Journal*, *9*, 147-158.
- Guth, H., Grosch, W. (1991). A comparative study of the potent odourants of different virgin olive oils. *Fat Science Technology*, *93*, 335-339.

- Harwood, J., Aparicio, R. (2013). *Handbook of Olive Oil: Analysis and Properties*. (2nd ed.). New York: Springer Publisher.
- Kalua, C. M., Allen, M. S., Bedgood Jr, D. R., Bishop, A. G., Prenzler, P. D., Robards, K. (2007). Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: A critical review. *Food Chemistry*, *100*, 273-286.
- Leffingwell, J. C. (2001). Olfaction II. In *Leffingwell Reports No. 4*, Vol. 1 (pp. 1-26).
- Livermore, A., Laing, D. G. (1998). The influence of odour type on the discrimination and identification of odourants in multicomponent odour mixtures. *Physiology and behavior*, *65*, 311-320.
- Morales, M. T., Aparicio, R., Gutiérrez, F. (1992). Técnicas de aislamiento y concentración de volátiles de aceites vegetales. *Grasas y Aceites*, *43*, 164-173.
- Morales, M. T., Aparicio, R., Rios, J. J. (1994). Dynamic headspace gas chromatographic method for determining volátiles in virgin olive oil. *Journal of Chromatography A*, *668*, 455-462.
- Morales, M. T., Rios, J. J., Aparicio, R. (1997). Changes in the volatile composition of virgin olive oil during oxidation: flavours and off-flavours. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *45*, 2666-2673.
- Morales, M. T., Angerosa, F., Aparicio, R. (1999). Effect of the extraction conditions of virgin olive oil on the lipoxygenase cascade: chemical and sensory implications. *Grasas y Aceites*, *50*, 114-121.
- Morales, M. T., Tsimidou, M. (2000). The role of volatile compounds and polyphenols in olive oil sensory quality. In Harwood, J., Aparicio, R. (eds), *Handbook of olive oil* (pp. 393-458). Springer, Boston: MA (Aspen Publishers).
- Morales, M. T., Luna, G., Aparicio, R. (2005). Comparative study of virgin olive oil sensory defects. *Food Chemistry*, *91*, 293-301.
- Reiners, J., Grosch, W. (1998). Odourants of virgin olive oils with different flavour profiles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 2754-2763.

Salas, J. J., Williams, M., Harwood, J. L., Sanchez, J. (1999). Lipoxygenase activity in olive (*Olea europaea*) fruit. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76, 1163-1168.

Tena, N., Lazzez, A., Aparicio-Ruiz, R., García-González, D. L. (2007). Volatile compounds characterizing Tunisian Chemlali and Chétoui virgin olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7852-7858.

Yeshurun, Y., Sobel, N. (2010). An odour is notworth a thousand words: from multidimensional odours to unidimensional odour objects. *Annual review of psychology*, 61, 219-241.

Compuestos fenólicos y otros compuestos bioactivos del aceite de oliva: ¿Por qué es importante cuantificarlos correctamente?

3

Lucía Olmo García, Aadil Bajoub, Romina P. Monasterio y
Alegría Carrasco Pancorbo

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada, España

Breve reseña del grupo de investigación

El grupo de investigación FQM-297 “Control Analítico Ambiental, Bioquímico y Alimentario” se fundó en 1996 en el seno del departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada. Desarrolla su labor centrándose mayormente en dos líneas de investigación. Una de ellas es la de *Técnicas Separativas avanzadas en el ámbito alimentario*, que se ocupa de la extracción de compuestos bioactivos y/o sus metabolitos de matrices vegetales y alimentarias (y biológicas, en algunos casos), y la posterior caracterización de los mismos empleando herramientas analíticas innovadoras. La otra, que podríamos denominar *Nanotecnología Analítica*, se dedica al desarrollo y la caracterización de nanomateriales multifuncionales para la simplificación y mejora de metodologías analíticas de aplicación en control biomédico, industrial y alimentario.

3.1 Contextualización del capítulo y objetivo de los autores

La presente contribución tiene por objeto plasmar los aspectos más importantes de la conferencia que impartimos en la Jornada "Las bondades del consumo de aceite de oliva virgen" (Marzo de 2019), cita excelentemente organizada por el Grupo de Investigaciones Agroambientales y Alimentarias de la Universidad de Vigo. La ponencia tuvo por título el mismo que le ha sido asignado a este capítulo (“Compuestos fenólicos y otros compuestos bioactivos del aceite de oliva: ¿Por qué es importante cuantificarlos correctamente?”), en el que comenzaremos hablando muy brevemente de la composición

del aceite de oliva virgen, intentando poner de manifiesto la importancia de sus compuestos minoritarios. Tras ello, expondremos nuestra visión acerca de por qué es tan necesario desarrollar herramientas analíticas fiables que permitan caracterizar la fracción minoritaria del aceite (y otras matrices oleícolas) y qué papel podría tener en este contexto la Metabolómica de alimentos. Un posterior bloque temático se dedicará a los compuestos fenólicos (de importancia innegable), comentando qué métodos pueden emplearse para determinarlos, cuáles son las principales dificultades que surgen y algunas aplicaciones llevadas a cabo por nuestro grupo de investigación. Terminaremos identificando algunas de las tendencias más en boga en el sector: tanto en relación al desarrollo de metodologías innovadoras, como en lo referente a la caracterización profunda de matrices inexploradas en búsqueda de nuevos posibles productos funcionales.

Hemos intentado que el presente capítulo sea lo más divulgativo posible, sin perder por ello rigor y persiguiendo que represente una pieza de fácil y agradable lectura. Queríamos, de igual modo, mostrar parte del trabajo que desarrolla nuestro equipo de la Universidad de Granada y compartir con los lectores nuestra experiencia y publicaciones más recientes.

3.2 Composición de la fracción insaponificable del aceite de oliva.

Relevancia de los compuestos minoritarios

El aceite de oliva es una de las grasas comestibles más apreciadas a nivel mundial, tanto por su valor nutritivo como gastronómico. A pesar de su alto contenido calórico (9 Kcal/g, como cualquier grasa alimentaria), está considerada una “grasa saludable” debido a su alta proporción de ácidos grasos monoinsaturados y a los compuestos bioactivos que contiene, que lo convierten en un extraordinario “alimento funcional” (Uylaşer y Yildiz, 2014; Stark y Madar, 2002). Aproximadamente, el 98% en peso del aceite de oliva está constituido por triglicéridos con un perfil de ácidos grasos característico. El 2% restante, corresponde a la fracción insaponificable que incluye gran variedad de compuestos minoritarios, responsables de la estabilidad oxidativa de los aceites, así como de sus características organolépticas y gran parte de sus propiedades saludables (Mariotti y Peri, 2014). Entre los componentes minoritarios, cabe destacar a los compuestos fenólicos, los tocoferoles, los triterpenos pentacíclicos y los esteroides, entre otros (Figura 3.1).

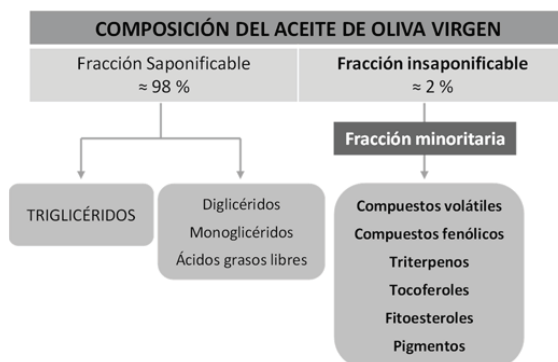


Figura 3.1 Composición del aceite de oliva, indicando las familias de compuestos que integran las fracciones saponificable e insaponificable, respectivamente.

Sólo el aceite de oliva virgen, obtenido únicamente por procedimientos mecánicos (lavado, decantación, centrifugación y filtrado) mantiene intactos los componentes de esta fracción, ya que la mayoría de ellos se eliminan drásticamente durante los procesos de refinación (como ocurre en los aceites de semillas) (Visioli y Galli, 1998). Además, la composición de esta matriz alimentaria se ve influenciada por una serie de factores (tanto humanos como naturales) que determinan la biosíntesis y degradación de determinados componentes y, por tanto, influyen de forma decisiva en el perfil composicional final del aceite. Entre los factores más influyentes se encuentran la variedad, las prácticas agronómicas adoptadas, el grado de madurez de la aceituna en el momento de la recolección y los procesos tecnológicos de extracción (Cerretani y Cerni, 2005). Esos y otros factores se resumen en la Figura 3.2, donde además, se intenta poner de manifiesto la importancia de las sustancias que componen la fracción minoritaria del aceite de oliva.

¿De qué factores depende la composición del aceite de oliva y por qué es tan importante la fracción minoritaria?

Su composición se ve afectada por:

- Factores agronómicos
 - Variedad
 - Riego
 - Estado sanitario
 - Grado de maduración
- Factores climático-ambientales
- Factores tecnológicos
 - Molienda
 - Batido
 - Separación
 - Conservación

Influyen considerablemente en:

- La calidad del aceite de oliva
 - Estabilidad oxidativa (*Shelf-life*)
 - Características organolépticas
 - Valor nutricional
- Sus propiedades saludables
 - Poder antioxidante
 - Antiinflamatorio
 - Anticancerígeno
 - Antimicrobiano
 - Cardio-protector...



Figura 3.2 Principales factores de los que depende la composición del aceite de oliva y trascendencia de los compuestos minoritarios de esta matriz.

Comentaremos muy brevemente en los siguientes párrafos, algunos de los aspectos más relevantes de las familias de compuestos minoritarios a las que nuestro grupo de investigación les ha prestado más atención durante los últimos años.

Los compuestos fenólicos son uno de los grupos de fitoquímicos más abundantes en las plantas, donde participan en procesos vitales como el crecimiento y la reproducción. Estos compuestos contribuyen a la estabilidad oxidativa del aceite de oliva y son, en gran parte, responsables de su amargor, picor y astringencia (Bendini y col., 2007); además, han sido objeto de numerosas investigaciones como consecuencia de los efectos saludables que exhiben (*in vitro e in vivo*) (Cicerale y col., 2010; Martín-Peláez y col., 2013). Se trata de una familia heterogénea, formada por diferentes subgrupos de compuestos, incluyendo fenoles simples, ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos y secoiridoides. Estos últimos suelen denominarse como fenoles complejos y se caracterizan estructuralmente por la presencia de ácido elenólico, unido a un fenol simple en algunos casos, como en la oleuropeína y el ligustrósido, sus formas agliconas y sus derivados dialdehídicos (el oleocantal y la oleaceína). La complejidad y heterogeneidad de esta familia de compuestos pues observarse en la Figura 3.3.

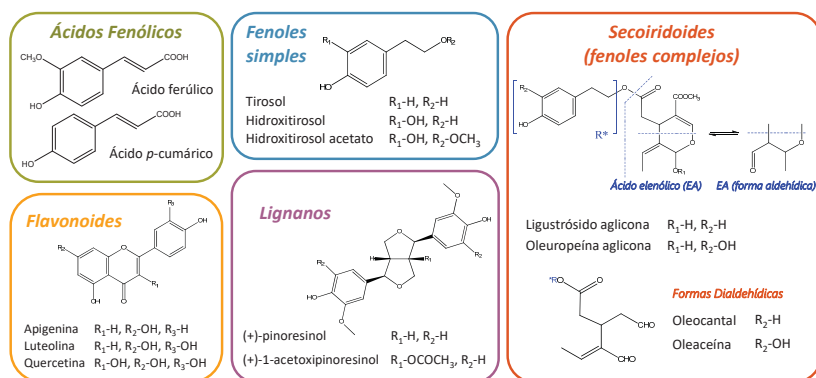


Figura 3.3 Sub-clases o familias de compuestos pertenecientes a la fracción fenólica del aceite de oliva.

Los tocoferoles, conocidos comúnmente como vitamina E, son antioxidantes a nivel celular, puesto que poseen una cadena lateral hidrofóbica que les permite atravesar membranas biológicas (Shahidi y De Camargo, 2016). Son los que previenen las reacciones de peroxidación y enranciamiento en el aceite de oliva.

Los triterpenos pentacíclicos son metabolitos excretados por las plantas como agentes protectores, de ahí que habitualmente se encuentren en las ceras cuticulares que rodean la superficie de los vegetales. Pueden tener esqueletos tipo lupano, oleanano o ursano, siendo los más importantes los ácidos maslínico y oleanólico. Se les han atribuido numerosas propiedades saludables (Sánchez-Quesada y col., 2013); es por ello por lo que se usan con frecuencia como ingredientes en suplementos dietéticos y nutraceuticos.

Por último, los fitosteroles, son la familia de compuestos más abundante de la fracción insaponificable en aceites vegetales. El β -sitosterol, Δ^5 -avenasterol, estigmasterol y campesterol, son los que aparecen a concentraciones superiores en el aceite de oliva. Ejercen un papel fundamental en la regulación del colesterol sanguíneo, controlan la permeabilidad de las membranas celulares y regulan respuestas enzimáticas (Katan y col., 2003).

Sin duda alguna, todos y cada uno de estos compuestos en la proporción relativa en la que se hallen (y sus acciones antagónicas y sinérgicas) serán responsables, en mayor o menor medida, de las propiedades de un extracto o de un aceite; por tanto, determinarlos correctamente podría ser clave para explicar muchas de las interesantes propiedades que el oro líquido exhibe.

3.3 Necesidad de desarrollar métodos fiables para caracterizar la fracción minoritaria del aceite de oliva. Introducción a la metabolómica de alimentos

Los Reglamentos o Normas de los organismos que regulan la calidad del aceite de oliva (COI, Codex Alimentarius, Unión Europea), contemplan en torno a una treintena de parámetros físico-químicos y el análisis sensorial para clasificar los aceites en las diferentes categorías comerciales. Sin embargo, en relación a los compuestos minoritarios, sólo está legislado el contenido de esteroides.

En ausencia de métodos oficiales (o recomendados), surge la necesidad de desarrollar métodos fiables e innovadores que permitan la determinación de los compuestos minoritarios tanto en los laboratorios de control como de investigación. Los mayores obstáculos que el analista ha de superar tienen que ver con el hecho de que son sustancias con una gran diversidad de propiedades físico-químicas y que se encuentran presentes a

concentraciones relativamente bajas. En este contexto, la metabolómica de alimentos (*Food Metabolomics*) tiene mucho que aportar. La misma podría definirse como el empleo de herramientas ómicas para establecer la composición detallada de un determinado alimento con el fin último de evaluar la relación que existe entre el efecto que puede tener en nuestra salud el consumo de dicho alimento y su composición química. También podríamos formular la definición del siguiente modo: análisis exhaustivo de todos los metabolitos que están presentes en un alimento empleando herramientas avanzadas.

En el ámbito de la olivicultura, la Metabolómica se emplea, por ejemplo, en estudios de caracterización de la composición del aceite de oliva u otras matrices derivadas, y en la diferenciación de variedades o autenticación de orígenes geográficos. En cuanto al procesado industrial, la Metabolómica permite evaluar el efecto de ciertos parámetros agro-tecnológicos, asegurar la calidad del aceite de oliva obtenido y contribuye a la valorización de los subproductos generados. Por último, en el campo de la salud, la Metabolómica permite estudiar los efectos beneficiosos de determinados compuestos, así como monitorizar ensayos de biodisponibilidad y estudios de intervención nutricional.

3.4 Compuestos fenólicos del aceite de oliva: herramientas para llevar a cabo su determinación, dificultades e importancia de cuantificarlos correctamente

Además de por lo expuesto en secciones anteriores, la cuantificación de los compuestos fenólicos es particularmente relevante considerando que, tras aprobación por parte de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la Unión Europea permite desde 2012 el uso de una declaración de propiedades saludables en aceites con un contenido mínimo de 5 mg de hidroxitirosol y compuestos relacionados por cada 20 g de aceite (Commission Regulation (EU) No 432/2012). Su determinación implicará, lógicamente, la extracción de los compuestos de interés de la matriz que los contiene (en este caso, el aceite de oliva) y la identificación y cuantificación posterior (ver Figura 3.4).

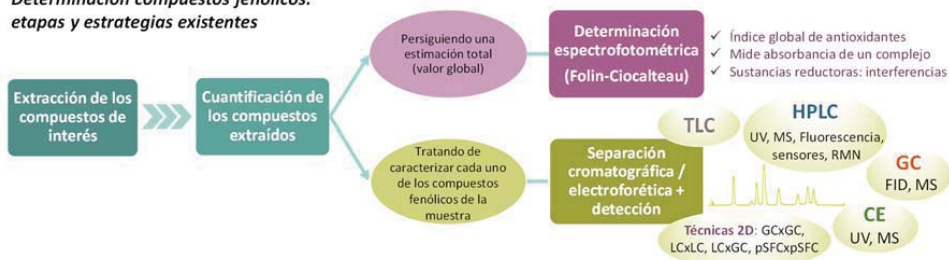
**Determinación compuestos fenólicos:
etapas y estrategias existentes**


Figura 3.4 Etapas principales en la determinación de compuestos fenólicos del aceite y estrategias analíticas que pueden emplearse para ello. Acrónimos más importantes usados en la figura (orden alfabético): CE, electroforesis capilar; FID, detector de ionización de llama; GC, cromatografía de gases; HPLC, cromatografía líquida de alta resolución; MS, espectrometría de masas; RMN, resonancia magnética nuclear; TLC, cromatografía en capa fina; UV, detección ultravioleta.

Dicha determinación puede perseguir la obtención de un valor o índice global o bien puede intentar caracterizar todos y cada uno de los compuestos fenólicos que hay en la muestra, asignándole un dato numérico (concentración) a cada uno de ellos (Bendini y col., 2007; Carrasco-Pancorbo y col., 2005). Esa misma idea se recoge en la Figura 3.4, donde se indica que la determinación de los fenoles puede realizarse, por ejemplo, espectrofotométricamente, obteniendo un índice global de antioxidantes, aplicando el método colorimétrico *Folin-Ciocalteu* (Carrasco-Pancorbo y col., 2005). También pueden aplicarse métodos separativos que nos darán información cualitativa y cuantitativa de todos y cada uno de los compuestos pertenecientes a la fracción fenólica; es posible, de hecho, recurrir a la cromatografía líquida, a la cromatografía de gases, a la electroforesis capilar (acopladas a distintos detectores) e incluso a otras opciones bi-dimensionales (2D). La cromatografía líquida es la opción que podría considerarse más conveniente (la metodología que recomienda el COI se basa, efectivamente, en el uso de la cromatografía líquida).

A la vista de todas las herramientas existentes, la lógica pregunta que cualquier analista podría plantearse sería: “¿cuál es el método más fiable?; ¿qué metodología debería usar en mi laboratorio?”. En relación a esto, vale la pena mencionar que nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo un reciente estudio donde se comparaban pormenorizadamente los resultados cuantitativos obtenidos tras aplicar diferentes herramientas analíticas para determinar los compuestos fenólicos del aceite de oliva (Olmo-García y col., 2019a). Nos parecía que era absolutamente necesario abordar esta problemática, ya que hay gran controversia en la comunidad científica a la hora de

identificar con claridad qué método es el más recomendable. Comparamos métodos específicos (LC-MS) y enfoques más globales (método *Folin-Ciocalteu*, método HPLC recomendado por el COI y una metodología basada en la hidrólisis (rotura) de fenoles complejos y su posterior determinación por HPLC-DAD); todos ellos se usaron para analizar 50 aceites de oliva vírgenes extra que fueron especialmente seleccionados para cubrir todos los rangos cuantitativos posibles. Nuestro objetivo no fue el de alcanzar la metodología óptima, sino establecer una comparación exhaustiva entre los métodos más extendidos. Así, se discutieron meticulosamente los datos obtenidos y se buscaron factores de equivalencia entre los resultados de todos los métodos, pero, sobre todo, se demostró la gran variabilidad que puede encontrarse en bibliografía a la hora de expresar los resultados del contenido fenólico. Del mismo modo, se identificaron los principales puntos de reflexión, con especial énfasis en la necesidad de reformular la declaración de propiedades saludables de la EFSA asociada al hidroxitirosol y sus derivados.

Aunque es difícil formular unas conclusiones generales del trabajo que recojan todas las comparaciones realizadas de manera breve, parece pertinente resaltar algunos mensajes globales:

- Es evidente que la determinación más exacta es la caracterización individual mediante LC-MS empleando todos los patrones de los analitos cuantificados.
- Todos los métodos globales subestiman en mayor o menor medida el valor de la suma de fenoles individuales.
- Si sólo nos interesa cuantificar los compuestos a los que hace alusión la declaración de propiedades saludables, la hidrólisis y los métodos colorimétricos podrían considerarse buenas alternativas.

Llegados a este punto, es necesario explicitar que sea cual sea la técnica que se emplee, hay que solventar una serie de dificultades. Las más reseñables tienen que ver con:

- a) la ausencia de patrones puros;
- b) el hecho de que lograr una separación completa (de línea base) de todos los compuestos fenólicos es muy complejo; y
- c) hay varias sustancias fenólicas que presentan diversas formas isoméricas (además, éstas pueden generarse “artificialmente” durante la preparación de la muestra o durante la separación si no se toman las precauciones pertinentes).

El problema más serio es el primero de los mencionados -la ausencia de patrones-, que nos dificulta considerablemente la identificación y la cuantificación de los compuestos de interés. Si disponemos de patrón puro, identificar el compuesto bajo estudio es relativamente simple (en base al tiempo de retención y respuesta), si no, hemos de buscar otras alternativas: el estudio de espectros de absorbancia; espectros de MS; datos bibliográficos, etc. Cuando pretendemos cuantificar, el no tener a disposición el correspondiente patrón puro también representa un grave problema, ya que en tal caso el analista sólo podrá aspirar a alcanzar una cuantificación aproximada. Sin embargo, cuando lo único que queremos es comparar muestras, posiblemente, el no lograr una cuantificación absoluta no es tan grave. Por contra, sí que podría representar un problema cuando:

- queramos conocer la composición de distintas muestras de manera exhaustiva;
- estemos realizando estudios sobre el metabolismo de compuestos fenólicos y queramos evaluar su biodisponibilidad de modo preciso (qué cantidad de compuesto y en forma de qué metabolito llega al órgano o tejido donde ejercerá su acción);
- en el caso en el que nuestro objetivo sea explicar la bioactividad de diferentes compuestos/extractos sabiendo la concentración y composición exactas de los mismos.

Algunos otros ejemplos concretos de investigaciones realizadas por nuestro equipo investigador centradas en compuestos fenólicos podrían ser: (Bajoub y col., 2015a, b). En la primera de ellas, se describía la puesta a punto de un potente método LC-MS capaz de determinar unos 30 compuestos fenólicos en menos de 30 min. Dicho método resultó ser útil para establecer el contenido fenólico promedio (considerando 3 campañas consecutivas) de aceites de oliva virgen extra de la variedad *Picholine marocaine* (Bajoub y col., 2015a), así como para discriminar aceites de una misma variedad (unas 160 muestras) en función del origen geográfico (7 regiones diferentes) (Bajoub y col., 2015b).

En otro de los estudios que hemos materializado recientemente (Olmo-García y col., 2019b), los compuestos fenólicos resultaron ser los principales marcadores para discriminar aceites provenientes de distintas Denominaciones de Origen Protegidas (DOPs) o Indicaciones Geográficas Protegidas (IGPs). En dicho trabajo, se analizaron 126 aceites provenientes de 6 indicaciones geográficas de 4 países distintos (España, Marruecos, Italia, Grecia) (ver Figura 3.5a). Cabe resaltar que la implementación de DOPs o IGPs es una de las estrategias de diferenciación más usadas en el mercado oleícola, por ello, es muy importante disponer de metodologías que permitan autenticar

el origen declarado de los aceites. Los datos provenientes de LC-MS se sometieron a tratamiento estadístico (análisis de componentes principales (PCA) y PLS-DA (*partial least square-discriminant analysis*)). Más allá de la complejidad del tratamiento de datos, el mensaje importante es que el objetivo de la aplicación de PLS-DA fue construir modelos de 2 clases, que permitieran identificar “marcadores” para específicos para cada indicación geográfica. Así, “enfrentamos” las muestras de cada indicación geográfica a las de las demás, construyendo diversos modelos estadísticos (que condujeron a gráficas como las de la Figura 3.5b); lo fundamental era ver qué compuestos tenían más influencia para lograr la separación entre clases.

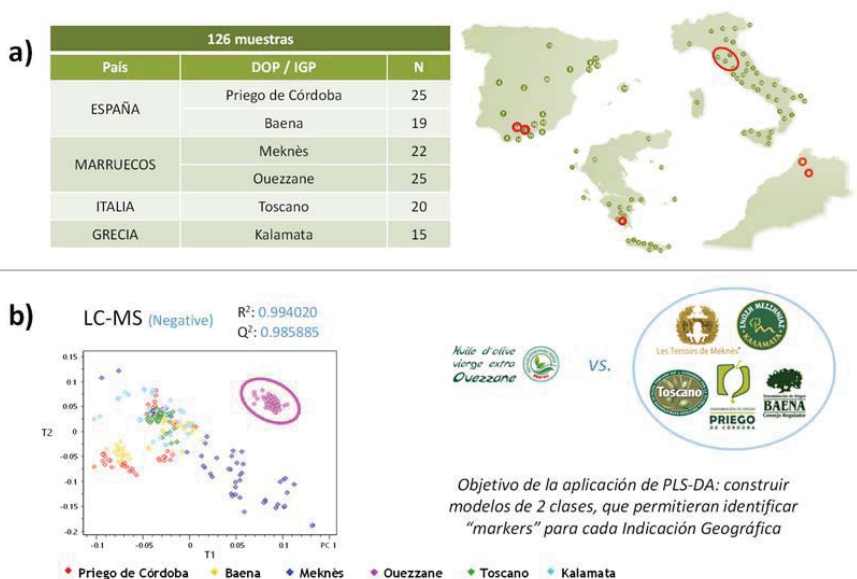


Figura 3.5 a) Detalles de las muestras incluidas en el estudio (Olmo-García y col., 2019b) (país de origen, nombre de la DOP o IGC, número de aceites y localización geográfica); b) ejemplo de las representaciones gráficas que se obtenían al construir modelos PLS-DA de 2 clases (el de la figura es el resultado de enfrentar las muestras de *Ouazzane* a las provenientes de otras indicaciones geográficas).

El estudio profundo de los resultados de todos los modelos, nos hizo observar, por ejemplo, que niveles altos de oleocantal y oleaceína y bajos de hidroxitirosol fueron características típicas de los aceites de Priego de Córdoba, mientras que un patrón opuesto fue distintivo de los aceites de Baena. Baena mostró también niveles muy elevados de flavonoides, mientras que los aceites marroquíes se caracterizaron por niveles bajos o

muy bajos de esta familia de compuestos. Prominentes concentraciones de oleocantal, oleaceína y acetoxipinoresinol fueron halladas en todos los aceites de la DOP Toscano.

Es absolutamente necesario decir (sin que vaya en detrimento de los resultados obtenidos en este estudio) que estos marcadores han de ser validados, usando más muestras provenientes de otras campañas y zonas geográficas dentro de las diferentes DOPs e IGP's seleccionadas.

3.5 Tendencias en el análisis de metabolitos secundarios del aceite de oliva (y otras matrices relacionadas): métodos multi-clase y algunas de sus aplicaciones

La mayor parte de las metodologías analíticas descritas en bibliografía para la determinación de compuestos de la fracción minoritaria del aceite de oliva podrían encuadrarse dentro de la categoría de métodos “*targeted*” o dirigidos. En ellos, lo que el analista persigue es determinar un conjunto de compuestos no muy numeroso con alta selectividad y exactitud. Sin embargo, hay grupos de investigación y laboratorios de análisis muy interesados en el desarrollo de potentes metodologías “*non-targeted* o *untargeted*” (no dirigidas), que a diferencia de las anteriores, son capaces de darnos información acerca de diferentes familias de compuestos en un solo análisis. Son sin duda herramientas mucho más ambiciosas, que requieren protocolos de preparación de muestra no selectivos y un tratamiento de datos posterior bastante más complejo. Estas ideas han tratado de reflejarse en la Figura 3.6.

Tendencias: desde los métodos «targeted» hacia los métodos «non-targeted»

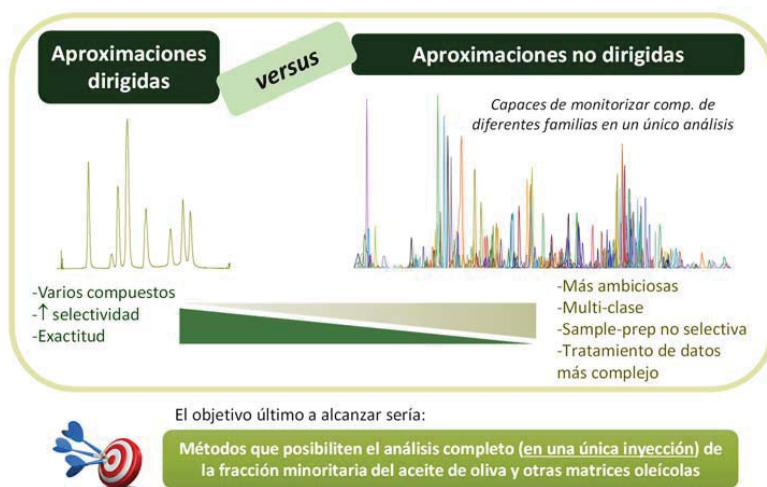


Figura 3.6 Esquema que representa las diferentes estrategias analíticas que pueden ser empleadas en la caracterización de la fracción minoritaria de matrices oleícolas.

En este contexto, hemos de mencionar que nuestro equipo ha puesto a punto recientemente dos métodos “multi-clase” (empleando LC-MS y GC-MS) capaces de determinar simultáneamente más de 45 compuestos pertenecientes a la fracción minoritaria del aceite de oliva (y otras matrices relacionadas) (Olmo-García y col., 2018a). Estas aproximaciones metodológicas posibilitan la caracterización de distintas familias químicas (compuestos fenólicos y triterpénicos, ácidos grasos libres, tocoferoles y esteroides) en un único análisis cromatográfico, lo que representa un importante hito en este campo (Figura 3.7). En una primera fase del estudio, se optimizó un tratamiento de muestra poco selectivo, con altos porcentajes de recuperación y buena repetibilidad. La extracción líquido-líquido nos pareció la estrategia más adecuada. Primero seleccionamos el agente extractante, y de entre distintos disolventes (y mezclas de los mismos a diferentes porcentajes) ensayados, la mezcla etanol/agua (80:20, v/v) resultó ser la más prometedora para la extracción de la mayoría de clases químicas excepto para los compuestos más polares, los fenoles simples. Estos se extrajeron mejor con mezclas compuestas con un 40% de agua; por dicho motivo, se decidió añadir al protocolo un paso de extracción con una mezcla de etanol/agua (60:40, v/v). A continuación se optimizó el volumen de disolvente y el número de ciclos necesarios. Con 3 pasos de 6 mL de etanol/agua (80:20, v/v) y uno adicional de etanol/agua (60:40, v/v) se obtuvieron

porcentajes recuperación satisfactorios para todas las clases químicas evaluadas, con muy buena repetibilidad (no superando la desviación estándar relativa el 5.7% en ningún caso).

Desarrollo de los primeros métodos «multi-class» en el ámbito oleícola

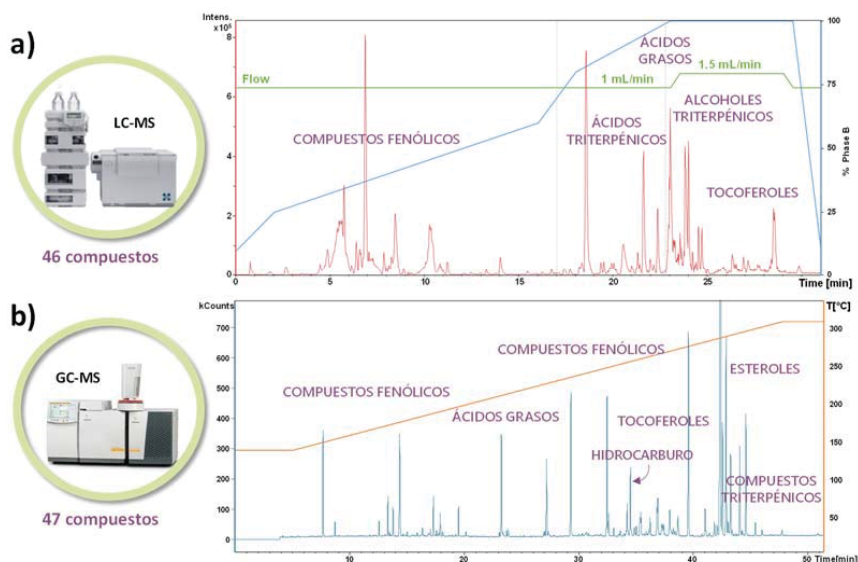


Figura 3.7 a) Base Peak Chromatogram (BPC) en LC-MS de un extracto de aceite de oliva virgen de la variedad Cayon. Las condiciones cromatográficas óptimas implicaron el uso de un gradiente de composición de fase móvil y de un gradiente de flujo. b) BPC obtenido para la misma muestra en GC-MS al aplicar las condiciones óptimas de separación y detección. En ambos casos, se indican las zonas de elución de cada clase de compuestos minoritarios.

Tras optimizar la etapa de extracción, se ajustaron las condiciones de separación y detección, persiguiendo que fueran adecuadas para analitos tan diferentes en términos de polaridad y estructura como los compuestos fenólicos y triterpénicos, los ácidos grasos libres y los tocoferoles en el caso de LC-MS, y todos los mencionados más esteroides e hidrocarburos en el caso de GC-MS. El tiempo de análisis fue de 31 y 50 minutos, para LC y GC, respectivamente. Se realizó una comparación detallada de las prestaciones analíticas de las dos metodologías, considerando coste, simplicidad, tiempo de análisis, adecuación para determinar cada familia de metabolitos, etc.

En términos generales, se observó que LC-MS deparaba mejores límites de detección y tiempo de análisis, siendo más conveniente para la determinación de ciertas familias de sustancias como fenoles simples, secoiridoides, flavonoides, ácidos triterpénicos, etc.; mientras que GC-MS, a pesar de requerir un paso previo de derivatización, resultó ser

más robusto, y particularmente recomendable para la determinación de ácidos grasos, tocoferoles, esteroides y dialcoholes triterpénicos, entre otros.

Creemos interesante comentar muy brevemente otro trabajo en el que, aplicando los métodos apenas descritos, hemos caracterizado profundamente el perfil metabólico de ocho matrices derivadas del olivo, incluyendo tejidos vegetales (hojas, tallos, piel, pulpa y semilla de aceituna) y aceites (aceite de semilla de olivo, aceite de oliva virgen y aceite de oliva obtenido de frutos deshuesados y deshidratados) (Olmo-García y col., 2018b). En este caso, todas las condiciones experimentales se seleccionaron para asegurar la máxima cobertura del metaboloma de las muestras bajo estudio. El empleo de LC y GC con MS de alta resolución (Q-TOF MS) (a través de diferentes fuentes de ionización -ESI y APCI) y las estrategias de anotación incluidas en el software MetaboScape 3.0 (Bruker Daltonik) nos permitieron identificar alrededor de 150 compuestos en los perfiles, mostrando una gran complementariedad entre las plataformas analíticas evaluadas. Se realizó una comparación semi-cuantitativa del contenido de triterpenos, tocoferoles, esteroides, fenoles, etc. de las matrices seleccionadas, tal y como se muestra en la Figura 3.8.

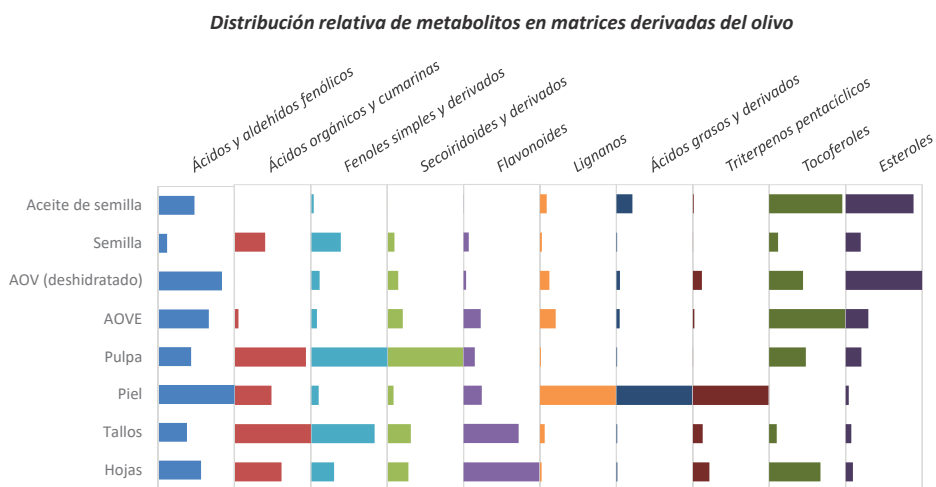


Figura 3.8 Diagramas de barras que dan idea de la distribución relativa de cada familia de metabolitos en las 8 matrices derivadas del olivo (variedad Picudo) que se consideraron en este estudio.

Vemos en la anterior figura, por ejemplo, cómo el aceite de semilla de olivo, destaca por su contenido en tocoferoles y esteroides. El aceite obtenido de aceitunas deshuesadas y deshidratadas (en comparación con el convencional) mostró niveles relativamente

elevados de tirosol, hidroxitirosol, hidroxitirosol acetilado y esteroides. El aceite convencional fue la matriz con mayor contenido relativo de dihidroxifenilglicol, agliconas de oleuropeína y ligstrósido, y α -tocopherol. La pulpa, resultó ser rica en ácidos orgánicos, fenoles simples y secoiridoides; sin embargo, la piel presentó las mayores cantidades relativas de ácidos fenólicos, lignanos, compuestos triterpénicos y ácidos grasos hidroxilados. Las cumarinas se encontraron casi exclusivamente en los tallos, y los flavonoides, fueron los compuestos más abundantes en las hojas.

3.6 Conclusiones

En la presente contribución se ha demostrado que, aunque representen en abundancia un porcentaje muy pequeño de la composición global del aceite de oliva, los compuestos minoritarios atesoran una gran importancia al tener influencia en la estabilidad oxidativa del aceite, sus características sensoriales y sus propiedades saludables. Determinar de manera rigurosa y fiable dichas sustancias no es en absoluto simple, ya que la fracción insaponificable del aceite contiene un gran número de compuestos químicamente muy heterogéneos, presentes en concentraciones muy variables (que pueden variar incluso en órdenes de magnitud). La Metabolómica de alimentos cuenta con herramientas innovadoras, robustas y potencialmente transferibles a los laboratorios oficiales de análisis, pudiendo aportar soluciones tangibles; en este contexto, la colaboración entre centros de investigación y el sector productivo es absolutamente necesaria para lograr objetivos comunes y mejorar las perspectivas del sector oleícola español. Una correcta caracterización de la fracción minoritaria del aceite de oliva (y matrices relacionadas) facilitaría, entre otras cosas: la diferenciación de variedades o autenticación de orígenes geográficos; evaluar la influencia de diversos parámetros agro-tecnológicos en la composición final del aceite; establecer la concentración de compuestos bioactivos de interés en diversas matrices, identificando posibles ingredientes funcionales; esclarecer la biodisponibilidad de compuestos de interés en estudios de intervención nutricional; y otorgar un posible valor añadido a algunos subproductos no rentabilizados por el momento.

Agradecimientos

Queremos mostrar nuestro más sincero agradecimiento al comité organizador de las Jornadas XAOV 2019 y a los editores de este libro por contar con nuestra participación. Asimismo, queremos agradecer a nuestros colaboradores de otras entidades nacionales y extranjeras su participación en los trabajos incluidos en este capítulo (Agro-pôle Olivier, Escuela Nacional de Agricultura (Meknès, Marruecos); Instituto de Biología Agrícola, CONICET (Mendoza, Argentina); UC Davis Olive Center (Davis, CA, EE. UU.); Bruker (Alemania); CM Europa; y Grupo Elayo (Jaén, España).

Referencias bibliográficas

- Bajoub, A., Carrasco-Pancorbo, A., Ajal, E.A., Ouazzani, N., Fernández-Gutiérrez, A. (2015a). Potential of LC-MS phenolic profiling combined with multivariate analysis as an approach for the determination of the geographical origin of north Moroccan virgin olive oils. *Food Chemistry*, 166, 292–300.
- Bajoub, A., Hurtado-Fernández, E., Ajal, E.A., Ouazzani, N., Fernández-Gutiérrez, A., Carrasco-Pancorbo, A. (2015b). Comprehensive 3-year study of the phenolic profile of Moroccan monovarietal virgin olive oils from the Meknès region. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 63, 4376–4385.
- Bendini, A., Cerretani, L., Carrasco-Pancorbo, A., Gómez-Caravaca, A.M., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., Lercker, G. (2007). Phenolic Molecules in Virgin Olive Oils: A Survey of Their Sensory Properties, Health Effects, Antioxidant Activity and Analytical Methods. An Overview of the Last Decade. *Molecules*, 12, 1679–1719.
- Carrasco-Pancorbo, A., Cerretani, L., Bendini, A., Segura-Carretero, A., Gallina-Toschi, T., Fernández-Gutiérrez, A. (2005). Analytical determination of polyphenols in olive oils. *Journal of Separation Science*, 28, 837-858.
- Cerretani, L., Cerni, S. (2005). Tecniche Estrattive Ed Influenza Sulle Caratteristiche Chimio-Fisiche Ed Organolettiche Degli Oli. *Dalle olive all'olio: Un viaggio alla scoperta del più nobile dei condimenti*, 33–47.
- Cicerale, S., Lucas, L., Keast, R. (2010). Biological Activities of Phenolic Compounds Present in Virgin Olive Oil. *International Journal Molecular Science*, 11, 458–479.

- Commission Regulation (EU) No 432/2012 of 16 May 2012 Establishing a list of permitted health claims made on foods, other than those referring to the reduction of disease risk and to child. https://www.fsai.ie/uploadedfiles/consol_reg432_2012.pdf (accessed on July 2019).
- Katan, M.B., Grundy, S.M., Jones, P., Law, M., Miettinen, T., Paoletti, R. (2003). Efficacy and Safety of Plant Stanols and Sterols in the Management of Blood Cholesterol Levels. *Mayo Clinic Proceedings*, 78, 965–978.
- Mariotti, M., Peri, C. (2014). The Composition and Nutritional Properties of Extra-Virgin Olive Oil. *The Extra-Virgin Olive Oil Handbook*. Chichester: Wiley, 21–34.
- Martín-Peláez, S., Covas, M.I., Fitó, M., Kušar, A., Pravst, I. (2013). Health Effects of Olive Oil Polyphenols: Recent Advances and Possibilities for the Use of Health Claims. *Molecular Nutrition and Food Research*, 57, 760–771.
- Olmo-García, L., Polari, J.J., Li, X., Bajoub, A., Fernández-Gutiérrez, A., Wang, S.C., Carrasco-Pancorbo, A. (2018a). A Deep insight into the minor fraction of virgin olive oil by using LC-MS and GC-MS multi-class methodologies. *Food Chemistry*, 261, 184-193.
- Olmo-García, L., Kessler, N., Neuweger, H., Wendt, K., Olmo-Peinado, J.M., Fernández-Gutiérrez, A., Baessmann, C., Carrasco-Pancorbo, A. (2018b). Unravelling the Distribution of Secondary Metabolites in *Olea europaea* L.: Exhaustive Characterization of Eight Olive-Tree Derived Matrices by Complementary Platforms (LC-ESI/APCI-MS and GC-APCI-MS). *Molecules*, 23, 2419.
- Olmo-García, L., Fernández-Fernández, C., Hidalgo, A., Vílchez, P., Fernández-Gutiérrez, A., Marchal, R., Carrasco-Pancorbo, A. (2019a). Evaluating the reliability of specific and global methods to assess the phenolic content of virgin olive oil: Do they drive to equivalent results?. *Journal of Chromatography A*, 1585, 56-69.
- Olmo-García, L., Wendt, K., Kessler, N., Bajoub, A., Fernández-Gutierrez, A., Baessmann, C., Carrasco-Pancorbo, A. (2019b). Exploring the capability of LC-MS and GC-MS multi-class methods to discriminate virgin olive oils from different geographical indications and to identify potential origin markers. *European Journal Lipid Science and Technology*, 121, 1800336.

- Sánchez-Quesada, C., López-Biedma, A., Warleta, F., Campos, M., Beltrán, G., Gaforio, J.J. (2013). Bioactive Properties of the Main Triterpenes Found in Olives, Virgin Olive Oil, and Leaves of *Olea Europaea*. *Journal Agriculture Food Chemistry*, *61*, 12173–12182.
- Shahidi, F., De Camargo, A.C. (2016). Tocopherols and Tocotrienols in Common and Emerging Dietary Sources: Occurrence, Applications, and Health Benefits. *International Journal Molecular Science*, *17*, 1–29.
- Stark, A.H., Madar, Z. (2002). Olive Oil as a Functional Food: Epidemiology and Nutritional Approaches. *Nutrition Reviews*, *60*, 170–176.
- Uylaşer, V., Yildiz, G. (2014). The Historical Development and Nutritional Importance of Olive and Olive Oil Constituted an Important Part of the Mediterranean Diet. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *54*, 1092–1101.
- Visioli, F., Galli, C. (1998). Olive Oil Phenols and Their Potential Effects on Human Health. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *46*, 4292–4296.

Efecto anti-tumoral de los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva virgen extra en la línea celular humana MCF-7

4

Patricia Reboredo-Rodríguez¹, Tamara Y Forbes-Hernández², Sadia Afrin³, Danila Cianciosi⁴, Francesca Giampieri⁴, María Figueiredo-González¹, Jesús Simal-Gandara¹ y Maurizio Battino^{2,4,5}

¹*Nutrition and Bromatology Group, Department of Analytical and Food Chemistry, Faculty of Science, University of Vigo, Ourense Campus, Ourense, Spain;* ²*Nutrition and Food Science Group, Department of Analytical and Food Chemistry, CITACA, CACTI, University of Vigo, Vigo, Spain;* ³*Department of Gynecology and Obstetrics, Johns Hopkins University, School of Medicine, Baltimore, USA;* ⁴*Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche ed Odontostomatologiche-Sez, Biochimica, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy;* ⁵*Centro Internacional de Investigación para los Alimentos, Nutrición y Seguridad. Universidad de Jiangsu, Zhenjiang, China.*

Breve reseña del grupo de investigación

Grupo de Nutrición y Bromatología (UVigo)

El Grupo de Investigaciones Agro-Ambientales y Alimentarias (AA1) tiene como objetivos generar conocimiento transferible en sus tres ejes estratégicos de investigación: (1) Producción primaria sostenible: Estudia el efecto de las actividades antropogénicas sobre el ámbito natural (suelo y agua, principalmente), que es el medio físico utilizado para la producción agro-alimentaria, con objeto de proponer prácticas de manejo sostenibles del sistema suelo-agua-cultivo; (2) Desarrollo de nuevos productos: La misión principal consiste en desarrollar productos alimentarios con nuevo valor añadido funcional, así como recuperar ingredientes bio-activos a partir de sub-productos de la industria agroalimentaria; (3) Calidad y seguridad alimentaria: Pretende promover la calidad de los alimentos (higiénica, sensorial y funcional), así como la de los productos para contacto alimentario (materiales plásticos, fundamentalmente), protegiendo a los consumidores de riesgos alimentarios de naturaleza química o biológica.

Grupo de Nutrición y Ciencia de los Alimentos (UVigo)

El Grupo de Nutrición y Ciencia de los Alimentos (NF1) es un grupo de reciente creación cuyos integrantes tienen una amplia experiencia en (1) el diseño, desarrollo, optimización y modelado matemático de bioproducciones para la obtención de compuestos de interés a partir de matrices naturales; (2) la hidrólisis química y enzimática; (3) la recuperación, separación y purificación de macromoléculas a partir de subproductos alimentarios haciendo uso de técnicas avanzadas de cromatografía, espectrometría de masas y sensores; (4) la evaluación de los efectos biológicos de compuestos de origen natural en el estrés oxidativo y la modulación de los genes implicados en las defensas antioxidantes, el metabolismo, la supervivencia y la proliferación celular, así como en los procesos inflamatorios y algunas enfermedades relacionadas.

Grupo de Bioenergética del *Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche ed Odontostomatologiche* (UnivPM)

El Grupo de Bioenergética de la UnivPM (Italia) está especializado en la búsqueda de los efectos e impactos de los compuestos bioactivos de la dieta en la salud humana. Es un grupo que ha dedicado especial atención a los mecanismos de desarrollo de las enfermedades crónico-degenerativas y cómo estos mecanismos pueden verse afectados por sustancias de origen natural. El estrés oxidativo y su control a nivel local y sistémico ha sido uno de los temas de estudio más interesante, aplicado a enfermedades periodontales, a sus conexiones con otras patologías como obesidad, diabetes, síndrome metabólico y enfermedades cardiovasculares. Alteraciones en la efectividad y eficiencia bioenergética en mitocondria de células cancerígenas o de pacientes con fibromialgia o síndrome de Papillon-Lefèvre han sido unos de los logros más importantes del grupo que hoy en día puede contar con 20 *Highly Cited Papers*.

4.1 Situación actual del cultivo del olivo en Galicia

España es el principal productor mundial de aceite de oliva. Dentro del mercado comunitario, la producción de aceite en España representó en torno a un 59% en la campaña 2014/15 y un 72% en la campaña 2018/19, siendo también el primer país productor comunitario seguido de Italia, Grecia, Portugal y Francia (COI, 2019). Si bien las principales áreas olivareras españolas se encuentran principalmente en Andalucía, en los últimos años están surgiendo nuevas regiones comprometidas con el cultivo de este

aceite vegetal y con la explotación de variedades autóctonas y/o foráneas para producir AOV de alta calidad. Este es el caso de los aceites producidos en Galicia donde el olivar se está convirtiendo en un cultivo alternativo, probablemente debido al cambio climático registrado en las últimas décadas, entre otros factores. En la actualidad, se están llevando a cabo dos políticas diferentes, por un lado se está fomentando la plantación de variedades de olivo ampliamente conocidas como Arbequina y Picual y, por otro, se están recuperando olivos centenarios de variedades autóctonas conocidas como Brava y Mansa de Figueiredo (Reboredo-Rodríguez y col., 2018a).

4.2 El papel del aceite de oliva en la Dieta Mediterránea

El aceite de oliva es el componente central de la Dieta Mediterránea y representa la principal fuente de lípidos, aportando el 2-3/3 del total de grasas vegetales (Trichopoulou y Dills, 2007), en donde las grasas totales proporcionan el 25-35% de la energía total (Serra-Majem y col., 2004; Willet y col., 1995).

El aceite de oliva es una matriz compleja que consta de una fracción saponificable (98-99% del peso total del aceite), representada sobre todo por triglicéridos, constituidos principalmente por ácidos grasos monoinsaturados. Los principales ácidos grasos son un ácido graso monoinsaturado (ácido oleico, 55-83%), un ácido graso saturado (ácido palmítico, 7,5-20%) y un ácido graso poliinsaturado (ácido linoleico, 2,5-21%) (Servili y col., 2004; Servili y col., 2007; EU 2015/1833). Los restantes componentes minoritarios (2% del peso del aceite), están divididos en fracciones insaponificables y solubles (Covas y col., 2006; Gunstone y col., 1994). Esta última fracción incluye más de 230 compuestos (incluidos pigmentos, alcoholes alifáticos y triterpénicos, esteroides, hidrocarburos, compuestos volátiles y compuestos fenólicos) (Servili y col., 2014). Los compuestos fenólicos presentes en el aceite de oliva incluyen alcoholes fenólicos (hidroxitirosol y tirosol); ácidos fenólicos (ácido vanílico, ácido *p*-cumarico y ácido cinámico); flavonoides (apigenina y luteolina); lignanos (pinosresinol y 1-acetoxipinosresinol) (Brenes y col., 2000; Oliveras-López y col., 2007; Romani y col., 2001) y secoiridoides (principalmente oleuropeína y ligustrósido agliconas) ligados a hidroxitirosol y tirosol (Artajo y col., 2007).

Recientes estudios epidemiológicos han confirmado el papel protector del aceite de oliva en la prevención de la incidencia y la mortalidad por enfermedades cardiovasculares

(Covas y col., 2009; Ruiz-Canela y Martínez-González, 2011), así como en los factores de riesgo asociados, tales como diabetes, síndrome metabólico y obesidad (Buckland y col., 2008; Pérez-Martínez y col., 2011; Viscogliosi y col., 2013). Además, el aceite de oliva está implicado en la prevención de algunos tipos de cáncer, con resultados prometedores para el cáncer de mama y del tracto intestinal, aunque los datos no son completamente consistentes y provienen principalmente de estudios caso-control.

Los efectos beneficiosos del aceite de oliva se han atribuido a componentes específicos que tienen una acción antihipertensiva, antitrombótica, antioxidante, antiinflamatoria y anticancerígena (Buckland y González, 2015). Experimentos *in vivo* e *in vitro* (en células humanas) han demostrado que el papel quimiopreventivo del aceite de oliva es atribuible a la capacidad que tienen los compuestos específicos como son el ácido oleico, el escualeno y los compuestos fenólicos para neutralizar las especies de oxígeno reactivo (EROs), reducir el estrés oxidativo y el daño oxidativo al ADN (Warleta y col., 2010). Actuando como antioxidantes, los componentes del aceite de oliva previenen la iniciación, la promoción y la progresión tumoral (López-Miranda y col., 2010), aumentando la expresión y la actividad de las enzimas de desintoxicación (Li y col., 2013). Además, los compuestos fenólicos son capaces de modular las respuestas endógenas, estimulando la actividad y la expresión de enzimas desintoxicantes (Li y col., 2013), las defensas antioxidantes y los sistemas de reparación de ADN.

En la campaña oleícola 2016-2017, nuestros Grupos de Investigación, a partir de los AOVE Brava y Mansa de Figueiredo obtenidos en un OLIOMIO 50 (Oliomio, Italia) tenían como objetivo, por un lado, caracterizar espectrofotométricamente los extractos fenólicos obtenidos siguiendo el método del COI (COI/T.20/Doc No 29/Rev.1) y, por otro lado, estudiar su acción en la viabilidad, bienestar y supervivencia celular de la línea celular humana de cáncer de mama MCF-7.

4.3 Caracterización espectrofotométrica de los extractos fenólicos de los AOVE Brava y Mansa de Figueiredo

Los extractos fenólicos de los dos AOVE provenientes de los olivos centenarios de las variedades autóctonas Brava y Mansa de Figueiredo se caracterizaron espectrofotométricamente mediante la evaluación del contenido en compuestos fenólicos totales, *o*-difenoles y capacidad antioxidante (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Caracterización de los extractos fenólicos de los AOVE Brava y Mansa de Figueiredo

Parámetros	Brava	Mansa de Figueiredo
Compuestos fenólicos totales (mg AG/kg)	489±7	371±6
<i>O</i> -difenoles (mg AG/kg)	148±4	93±5
Índice de amargor (K ₂₂₅)	8,03±0,04	3,90±0,11
DPPH (µM trolox/kg)	1972±19	949±45

AG: ácido gálico

En base al contenido total en compuestos fenólicos, los aceites de oliva pueden clasificarse en aceites con un "bajo contenido" (50-200 mg AG/kg), "medio contenido" (200-500 mg AG/kg) y "alto contenido" (500-1000 mg AG/kg) (Montedoro y col., 1992). Teniendo en cuenta esta clasificación, ambos aceites presentan un "contenido medio" en compuestos fenólicos (489±7 mg AG/kg para Brava y 371±6 mg AG/kg para Mansa), mostrando una mayor concentración el AOVE de la variedad Brava frente al Mansa de Figueiredo. Estos resultados son del orden o incluso superiores a aquellos que presentan algunos de los aceites de oliva más famosos del mundo como Cornicabra, España (464 mg AG/kg, Uceda y col., 2005), Leccino, Italia (338 mg AG/kg, Laddomada y col., 2013), Galega, Portugal (118 mg AG/kg, Gouvinhas y col., 2014), Koroneiki, Grecia (212 mg AG/kg, Laddomada y col., 2013) y Chemlal, África del Norte (33 mg AG/kg, Douzane y col., 2013). También en cuanto al contenido en *o*-difenoles es el AOVE Brava el que presenta un valor más elevado que el Mansa de Figueiredo (148±4 vs 94±5 mg AG/kg). Por último, se evaluó la capacidad antioxidante total mediante el ensayo DPPH. De nuevo el extracto fenólico del AOVE Brava mostró valores más elevados que el extracto fenólico del AOVE Mansa de Figueiredo. La notable capacidad antioxidante del extracto fenólico del AOVE Brava hace que este extracto sea un buen candidato para evaluarlo como un posible agente nutracéutico en un modelo *in vitro* usando células cancerígenas. Por esta razón, los experimentos *in vitro* posteriores se realizaron utilizando tan solo el extracto fenólico del AOVE Brava en la línea celular MCF-7.

4.4 Efecto del extracto fenólico del AOVE Brava en la línea celular de cáncer de mama MCF-7

4.4.1 Efecto citotóxico del extracto fenólico del AOVE Brava en la línea celular de cáncer de mama MCF-7

En un primer lugar, utilizando el ensayo MTT, se evaluó el posible efecto citotóxico del extracto fenólico del AOVE Brava a diferentes concentraciones (0,00; 0,01; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 0,60; 0,70; 0,75; 0,80; y 1,00 mg/mL) y a diferentes tiempos de incubación (24, 48 y 72 horas) (Figura 4.1). Las concentraciones utilizadas corresponden aproximadamente con 0,00; 6,41; 32,05; 64,10; 160,25; 320,50; 384,60; 448,70; 480,75; 512,80 y 641,00 μg de compuestos fenólicos/mL (considerando que la concentración total de compuestos fenólicos es 641 mg/kg al no tener en cuenta el ácido quínico y los derivados del ácido elenoico (Reboredo-Rodríguez y col., 2018b).

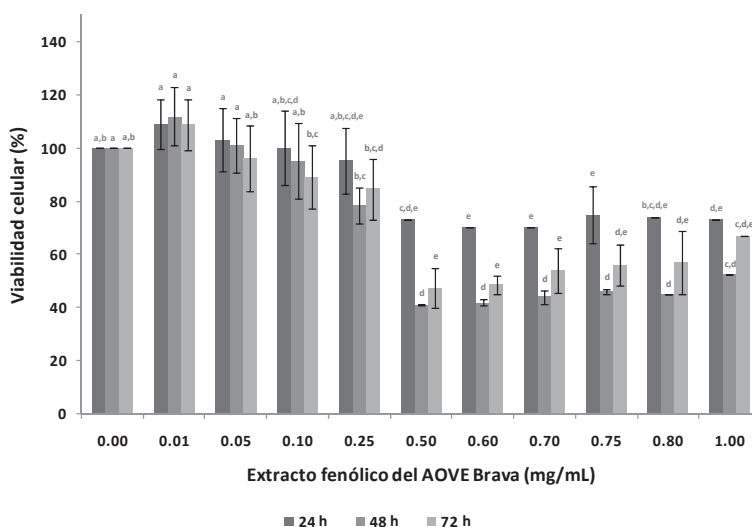


Figura 4.1 Capacidad del extracto fenólico del AOVE Brava para inhibir la proliferación de las células MCF-7 después de 24, 48 y 72 horas de tratamiento. Después de 24 h de siembra, las células MCF-7 se trataron con diferentes concentraciones (de 0 a 1 mg/mL) del extracto fenólico del AOVE Brava durante 24, 48 y 72 h. La viabilidad celular mediante el ensayo MTT (bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenitetrazolio). Los resultados se expresan como porcentaje de la viabilidad celular en comparación con el control (que contiene 1% de DMSO). Los datos se muestran como media \pm DE (n=3). Las columnas con varias letras sobrescritas son significativamente diferentes del control ($p < 0,05$).

A partir de los resultados obtenidos se calculó el IC₅₀, es decir, la concentración necesaria para reducir la viabilidad celular en un 50%. Como puede observarse en la Figura 4.1, con 24 horas de tratamiento no se logra la reducción de la viabilidad celular en un 50%, mientras que con 48 y 72 horas de tratamiento se obtiene una doble tendencia. Con el tratamiento a bajas concentraciones de extracto fenólico (de 0,00 a 0,25 mg/mL) no hay una reducción notable en la vitalidad mientras que con concentraciones más altas (de 0,50 a 1,00 mg/mL) se alcanza el 50%, siendo el IC₅₀ igual a 0,50 mg/mL. Por lo tanto, para todos los análisis posteriores, se eligió el rango más bajo de concentraciones de extracto fenólico (de 0,01 a 0,50 mg/mL) que dio mejores resultados en términos de viabilidad celular y reproducibilidad a un determinado período de incubación (48 horas).

4.4.2 Determinación de la producción de EROs

Las EROs son productos secundarios del metabolismo aeróbico e incluyen el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno y el radical hidroxilo (Espinosa-Díez y col., 2015). Las EROs tienen un doble efecto contra un tumor: por un lado pueden desempeñar un papel carcinogénico o inducir la iniciación del tumor mientras que, por otro lado, pueden tener un efecto quimioterapéutico al suprimir el crecimiento del tumor, promover la apoptosis y la muerte celular (Liou y Storz, 2010). Que puedan desempeñar uno u otro papel, depende de las concentraciones relativas en los microambientes celulares y del estado metabólico de las mismas células. Para determinar la producción intracelular de EROs, las células MCF-7 se trataron con diferentes concentraciones del extracto fenólico del AOVE Brava (0,00; 0,01; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50 mg/mL) durante 48 horas y se analizó con el kit de análisis CellROX® Orange y el citómetro basado en imágenes (Tali, Life Technologies) (Figura 4.2).

Tal y como puede observarse, la mayor producción de EROs intracelulares se obtiene después del tratamiento con 0,50 mg/mL de extracto fenólico (con un aumento del 9,8% respecto al control), mostrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) con el control y con otras concentraciones del extracto fenólico. Estos resultados sugieren que el extracto fenólico del AOVE Brava induce la producción de EROs, lo que a su vez, suprime el crecimiento de estas células. Efectos similares, recientemente, se han demostrado con el oleocantal que parece desempeñar un papel antitumoral en las células de cáncer de hígado y colon humano generando EROs (Cusimano y col., 2017).

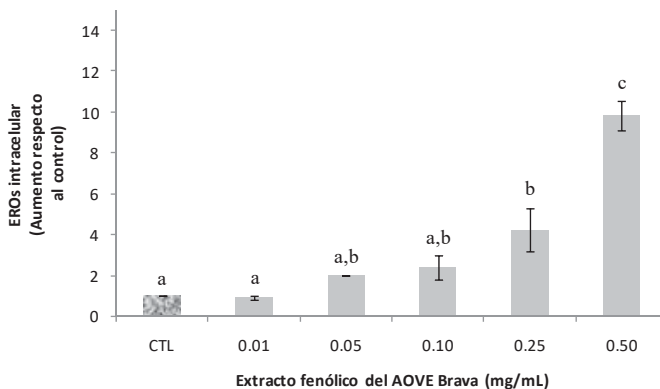


Figura 4.2. El extracto fenólico del AOVE Brava induce la producción de EROs en las células MCF-7. Las células se trataron con las concentraciones de extracto fenólico indicadas (0,00; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50) durante 48 horas. Los niveles intracelulares de EROs se evaluaron con el kit CellRox® Orange y se utilizó el citómetro basado en imágenes Tali® para cuantificar la inducción de EROs (% de positividad de yoduro de propidio) en células MCF-7 con el tratamiento descrito anteriormente. Los datos se expresan como media±DE de tres experimentos independientes (n=3). Las columnas con varias letras sobrescritas son significativamente diferentes del control ($p<0,05$).

4.4.3 Determinación de los niveles de apoptosis

La apoptosis se puede definir como un mecanismo celular caracterizado por una serie de diferentes cambios bioquímicos y morfológicos, que incluyen niveles aumentados de EROs, activación de caspasas, estrechamiento celular, condensación de cromatina y degradación del ADN (Forbes-Hernández y col., 2014). La apoptosis juega un papel crucial en la prevención de la hiperproliferación celular (Halder y col., 2008), por lo que la inducción de la apoptosis representa una estrategia efectiva en quimioterapia para evaluar y diseñar nuevos agentes quimioterapéuticos (Taraphdar y col., 2001). Para determinar los niveles de células vivas, muertas y en fase de apoptosis, las células MCF-7 se trataron con diferentes concentraciones del extracto fenólico del AOVE Brava (0,00; 0,01; 0,05; 0,10; 0,25 y 0,50 mg/mL) durante 48 horas y se analizaron con el citómetro basado en imágenes Tali® (Figura 4.3).

Tal y como se muestra en la Figura 4.3, la adición del extracto fenólico del AOVE Brava produce una reducción significativa en los niveles de células vivas en comparación con el control ($p<0,05$) y un aumento significativo en los niveles de células muertas en comparación con el control ($p<0,05$). Con respecto a los niveles de apoptosis, se observan

diferencias significativas con respecto al control ($p < 0,05$), solo con concentraciones de 0,01 y 0,05 mg/mL. Una posible explicación puede ser que el tratamiento con compuestos fenólicos a las concentraciones más altas conlleva como efecto indirecto e inmediato la muerte celular probablemente debido a múltiples factores.

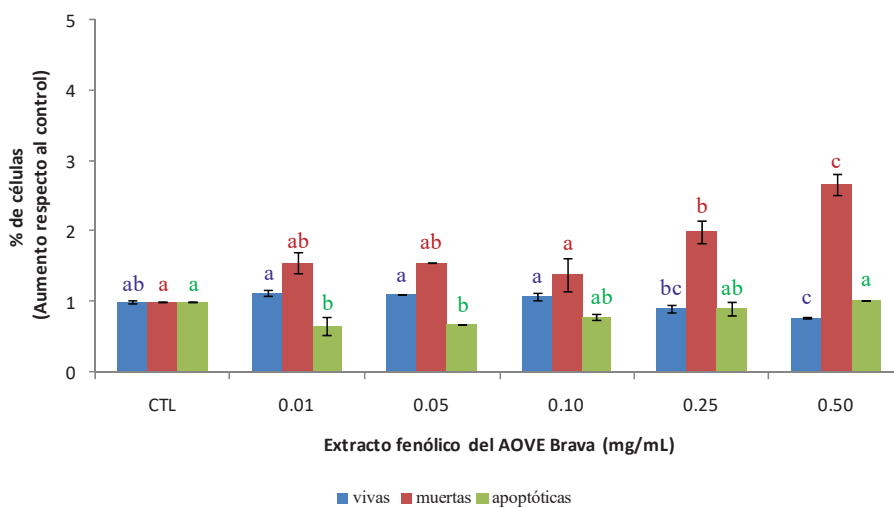


Figura 4.3. Niveles de células MCF-7 vivas, muertas y apoptóticas después de ser tratadas con las concentraciones del extracto fenólico del AOVE Brava indicadas (0,00; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50) durante 48 horas. El citómetro basado en imágenes Tali® se utilizó para cuantificar las células vivas, muertas y apoptóticas después del tratamiento anteriormente descrito. Los datos se expresan como media \pm DE de tres experimentos independientes ($n=3$). Las columnas con varias letras sobrescritas son significativamente diferentes del control ($p < 0,05$).

4.4.4 Efecto de los extractos fenólicos del AOVE Brava en los niveles de señalización de ARNm relacionados con la apoptosis intrínseca y extrínseca en células MCF-7

El mecanismo molecular por el cual el extracto fenólico del AOVE Brava indujo la apoptosis se evaluó adicionalmente mediante la expresión de varios marcadores apoptóticos. Se han descrito al menos cuatro diferentes vías de activación de las caspasas en las células humanas, siendo las más importante la vía intrínseca (o mitocondrial) y la extrínseca (Wong, 2011). La activación del supresor de tumores p53 y la principal caspasa, la caspasa-3 confirmó la inducción de la apoptosis por el extracto fenólico del AOVE Brava (Figura 4.4). Además, el tratamiento con este extracto fenólico aumentó los

niveles de Bax/Bcl2 en una forma dosis-dependiente activando, por lo tanto, la vía intrínseca de la apoptosis (Figura 4.4).

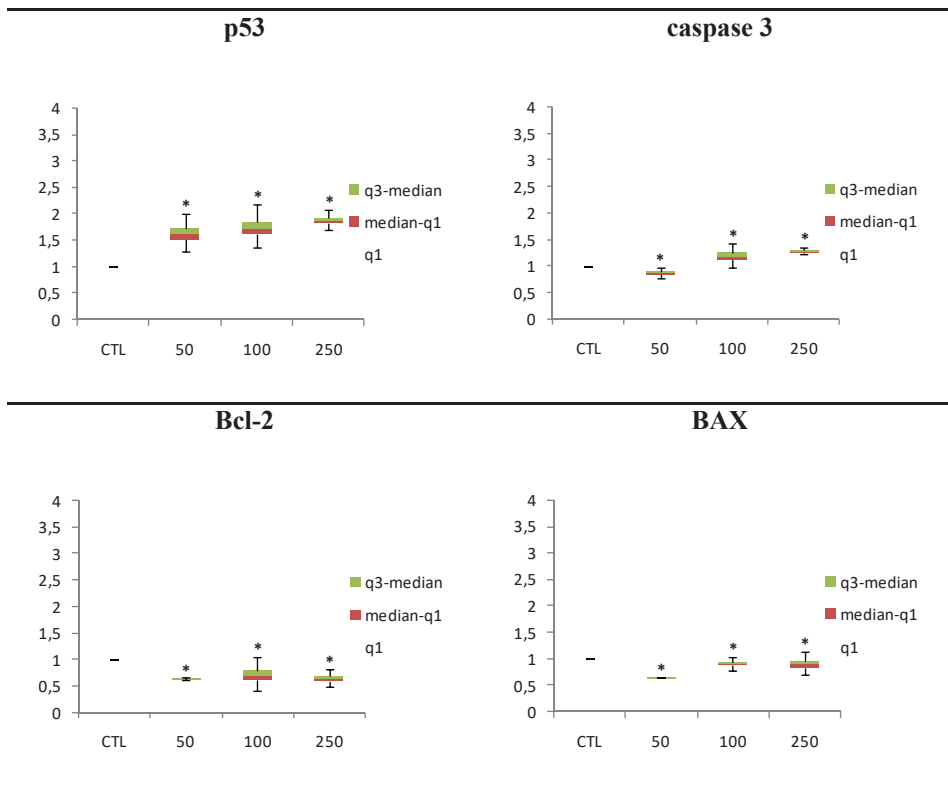


Figura 4.4 Efecto de los extractos fenólicos del AOVE Brava en los niveles de señalización de ARNm relacionados con la apoptosis intrínseca y extrínseca en células MCF-7. Las células MCF-7 se trataron previamente con o diferentes concentraciones de extracto fenólico del AOVE Brava durante 48 h. Los niveles de ARNm de p53, caspasa-3 y Bax/Bcl2 se analizaron mediante RT-PCR y los datos se normalizaron con los niveles de ARNm de GADPH. Los resultados se expresan como mediana, primer cuartil, tercer cuartil, valores mínimos y máximos y se expresan como la media±DE (n=3). * $p < 0,05$ vs. grupo control.

4.4.5 Efecto de los extractos fenólicos del AOVE Brava en los niveles de señalización de ARNm relacionados con la autofagia en células MCF-7

La autofagia se encarga de modular la homeostasis celular en los organismos eucariotas a través de la degradación de las macromoléculas y orgánulos que se encuentren dañados o que sean disfuncionales para la célula (Prieto-Dominguez y col., 2017). La maquinaria molecular que permite la formación del autofagosoma y su maduración está constituida

por las proteínas reguladoras de la autofagia (Atg) (Tanida, 2011a; Tanida, 2011b). En la Figura 5.1 se muestra cómo el tratamiento con el extracto fenólico elevó los niveles de p62, Beclin-1, ATG5 y LC3 en una forma dosis-dependiente activando, por lo tanto, la maquinaria involucrada en este proceso de muerte celular.

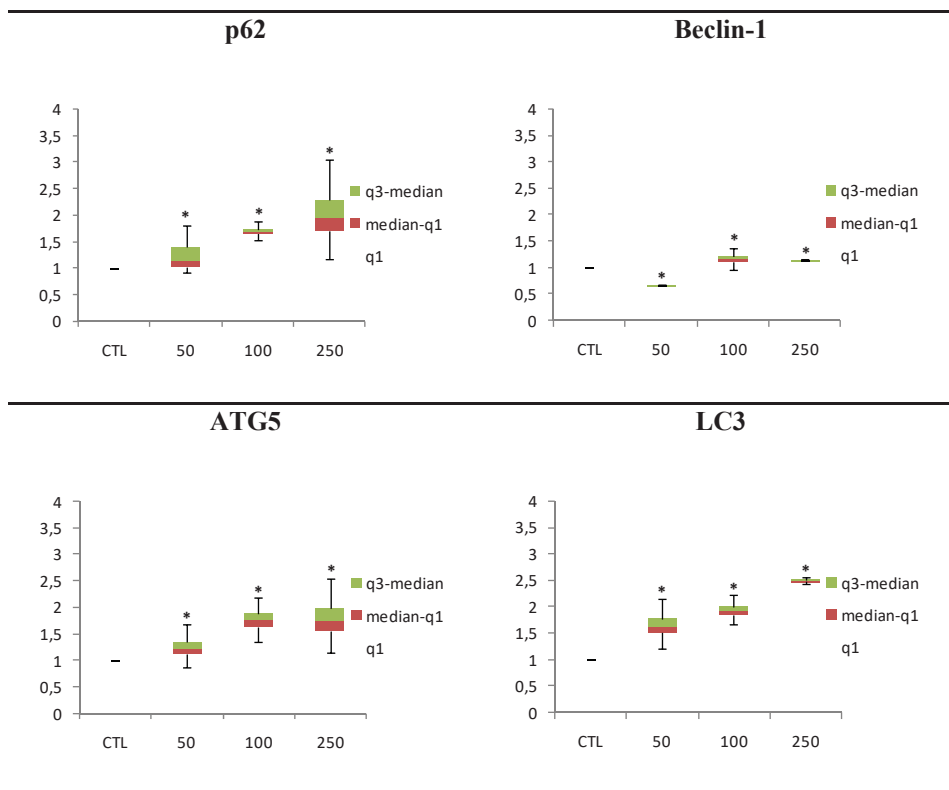


Figura 4.5 Efecto de los extractos fenólicos del AOVE Brava en los niveles de señalización de ARNm relacionados con la autofagia en células MCF-7. Las células MCF-7 se trataron previamente con diferentes concentraciones de extracto fenólico del AOVE Brava durante 48 h. Los niveles de ARNm de p62, Beclin-1, ATG5 y LC3 se analizaron mediante RT-PCR y los datos se normalizaron con los niveles de ARNm de GADPH. Los resultados se expresan como mediana, primer cuartil, tercer cuartil, valores mínimos y máximos y se expresan como la media±DE (n=3). * $p < 0,05$ vs. grupo control.

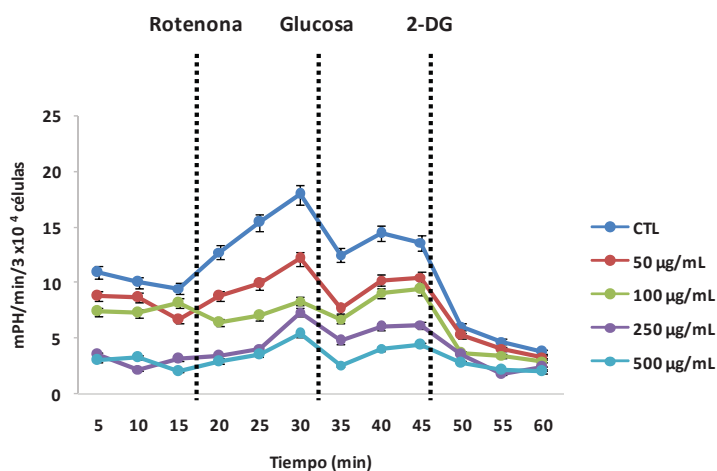
4.4.6 Alteración del fenotipo metabólico después del tratamiento con los extractos fenólicos del AOVE Brava en células de cáncer de mama MCF-7

Con el objetivo de evaluar si los extractos fenólicos del AOVE Brava son capaces de afectar negativamente a la funcionalidad mitocondrial alterando el metabolismo de las células tumorales, se determinó en tiempo real la tasa de consumo de oxígeno (*Oxygen*

Consumption Rate, OCR) y la tasa de acidificación celular (*Acid Efflux Rate*, ECAR) mediante la utilización del analizador de flujo extracelular Seahorse Bioscience XF24 (Agilent, EE.UU). El OCR es un indicador de la respiración mitocondrial mientras que el ECAR es una medida del proceso glicolítico, ambas constituyen las dos principales vías de producción de energía de la célula.

Tal y como se observa en la Figura 4.6, las células tratadas con diferentes concentraciones del extracto fenólico del AOVE Brava tienen un metabolismo alterado con respecto al control. Se produce una reducción en la tasa de ECAR y, consecuentemente, una reducción en la capacidad glicolítica, ruta metabólica ampliamente utilizada por las células tumorales para la producción de energía para sostener el crecimiento celular (Figura 4.6a). También hay una reducción en la OCR y, por lo tanto, en la respiración mitocondrial (Figura 4.6b). Esta tendencia indica la capacidad de los compuestos fenólicos para socavar el metabolismo mitocondrial y su funcionamiento, lo que a su vez puede influir en otros procesos celulares importantes para la progresión del tumor.

a) Glicolisis



b) Respiración mitocondrial

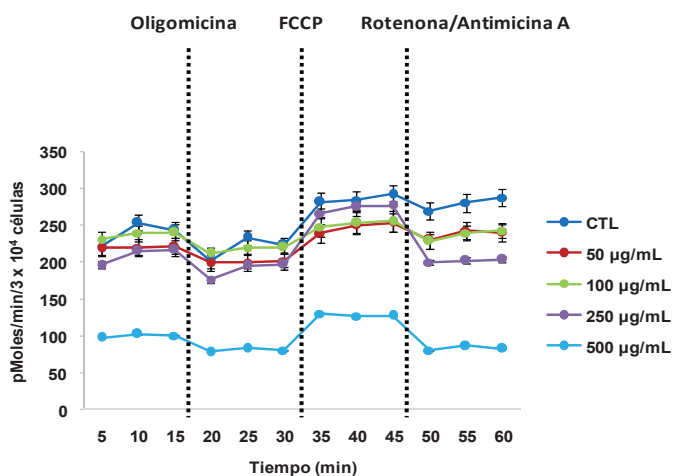


Figura 4.6 (a) Reducción de la glicolisis por los extractos de AOVE en las células MCF-7. **(b)** Regulación de la respiración mitocondrial por los extractos de AOVE en las células MCF-7. Las células MCF-7 se trataron con extractos de AOVE a distintas concentraciones (0,00, 0,50, 100, 250, 500 µg/mL) durante 48 h. Los datos se muestran como la media±DE de tres experimentos independientes (n=3).

Finalmente, tal y como se observa en la Figura 4.7, las células MCF-7 sin tratamiento presentaron un fenotipo energético, mientras que la exposición a los extractos fenólicos del AOVE Brava condujo a un notable cambio hacia el fenotipo inactivo (metabólicamente inactivo). Bajas concentraciones del extracto fenólico del AOVE Brava

desplazan el fenotipo metabólico a la vía de la glicolisis, quizás para superar los altos niveles de ATP exigidos debido a la proliferación celular no controlada (Figura 4.7).

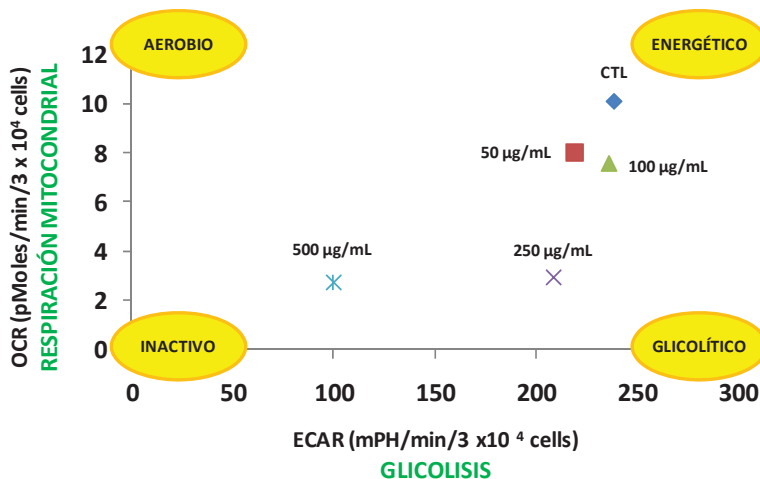


Figura 4.7 Efecto del extracto fenólico del AOVE Brava en el fenotipo metabólico de las células MCF-7. Las células MCF-7 se trataron previamente con diferentes concentraciones de extracto fenólico del AOVE Brava durante 48 h.

4.5 Conclusiones

Los extractos fenólicos de los AOVE obtenidos a partir de las variedades autóctonas Brava y Mansa de Figueiredo presentan un contenido medio en compuestos fenólicos totales y una alta capacidad antioxidante. Estas características los hacen buenos candidatos para ser evaluados como un posible agente nutracéutico. El tratamiento con distintas concentraciones del extracto fenólico del AOVE Brava mismo en la línea celular MCF-7 de cáncer de mama provoca una disminución de la viabilidad celular, un incremento en la producción intracelular de EROs, así como una modulación de la expresión de los genes involucrados en los dos tipos de muerte celular estudiados en el presente trabajo, apoptosis y autofagia en una forma dosis-dependiente. A su vez, el extracto fenólico del AOVE Brava produce una reducción en las dos vías de producción de energía de la célula, tanto en la capacidad glicolítica como en la respiración mitocondrial. Además, altas concentraciones del extracto fenólico del AOVE Brava condujo a un notable cambio hacia el fenotipo metabólicamente inactivo. Estos resultados apuntan a posibles beneficios para la salud, considerando los AOVE gallegos posibles candidatos para el desarrollo de alimentos nutracéuticos o funcionales.

Agradecimientos

Patricia Reboredo-Rodríguez y María Figueiredo-González quieren agradecer a la Xunta de Galicia la financiación de sus contratos post-doctorales.

Referencias bibliográficas

- Artajo, L.S., Romero, M.P., Suárez, M., Motilva, M.J. (2007). Partition of phenolic compounds during the virgin olive oil industrial extraction process. *European Food Research and Technology*, 225, 617-625.
- Brenes, M., Hidalgo, F.J., García, A., Rios, J.J., García, P., Zamora, R., Garrido, A. (2000). Pinoresinol and 1-Acetoxypinoresinol, two new phenolic compounds identified in olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 77, 715-720.
- Buckland, G., Bach, A., Serra-Majem, L. (2008). Obesity and the Mediterranean diet: a systematic review of observational and intervention studies. *Obesity Reviews*, 9, 582-593.
- Buckland, G., Gonzalez, C.A. (2015). The role of olive oil in disease prevention: A focus on the recent epidemiological evidence from cohort studies and dietary intervention trials. *British Journal of Nutrition*, 113, S94-S101.
- COI/T.20/Doc.Nº29. (2009). Determination of biophenols in olive oils by HPLC.
- COI (2019). http://www.internationaloliveoil.org/estaticos/view/131-world-olive-oil-figures%3Flang=es_ES Accessed 25 June 2019.
- Commission Implementing Regulation (EU) 2015/1833 of 12 October 2015 Amending Regulation (EEC) No 2568/91 on the Characteristics of Olive Oil and Olive-Residue Oil and on the Relevant Methods of Analysis.
- Covas, M.I., Ruiz-Gutiérrez, V., De La Torre, R., Kafatos, A., Lamuela-Raventós, R.M., Osada, J., Owen, R.W., Visioli, F. (2006). Minor components of olive oil: Evidence to date of health benefits in humans (Review). *Nutrition Reviews*, 64, S20-S30.
- Covas, M.I., Konstantinidou, V., Fitó, M. (2009). Olive oil and cardiovascular health. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 54, 477-482.

- Cusimano, A., Balasus, D., Azzolina, A., Augello, G., Emma, M.R., Di Sano, C., Gramignoli, R., Strom, S.C., McCubrey, J.A., Montalto, G., Cervello, M. (2017). Oleocanthal exerts antitumor effects on human liver and colon cancer cells through ROS generation. *International Journal of Oncology*, *51*, 535-544.
- Douzane, M., Tamendjari, A., Abdi, A.K., DAAS, M-S., Mehdid, F., Bella, M.M. (2013). Phenolic compounds in mono-cultivar extra virgin olive oils from Algeria. *Grasas y Aceites*, *64*, 285-294.
- Espinosa-Diez, C., Miguel, V., Mennerich, D., Kietzmann, T., Sánchez-Pérez, P., Cadenas, S., Lamas, S. (2015). Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology*, *6*, 183-187.
- Forbes-Hernández, T.Y., Giampieri, F., Gasparini, M., Mazzoni, L., Quiles, J.L., Alvarez-Suarez, J.M., Battino, M. (2014). The effects of bioactive compounds from plant foods on mitochondrial function: a focus on apoptotic mechanisms. *Food and Chemical Toxicology*, *68*, 154-182.
- Gouvinhas, I., Machado, J., Gomes, S., Lopes, J., Martins-Lopes, P., Barros, A. (2014). Phenolic Composition and Antioxidant Activity of Monovarietal and Commercial Portuguese Olive Oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *91*, 1197-1203.
- Gunstone, F.D., Harwood, J.L., Padley, F.B. (1994). *The lipid handbook*. (2nd ed.). London: Chapman and Hall.
- Halder, B., Bhattacharya, U., Mukhopadhyay, S., Giri, A.K. (2008). Molecular mechanism of black tea polyphenols induced apoptosis in human skin cancer cells: involvement of Bax translocation and mitochondria mediated death cascade. *Carcinogenesis*, *29*, 129-138.
- Laddomada, B., Colella, G., Tufariello, M., Durante, M., Angiuli, M., Salvetti, G., Mita, G. (2013). Application of a simplified calorimetric assay for the evaluation of extra virgin olive oil quality. *Food Research International*, *54*, 2062-2068.
- Li, P., Jia, J., Zhang, D., Xie, J., Xu, X., Wei, D. (2013). In vitro and in vivo antioxidant activities of a flavonoid isolated from celery (*Apium graveolens* L. var. dulce). *Food & Function*, *5*, 50-56.
- Liou, G.Y., Storz, P. (2010). Reactive oxygen species in cancer. *Free Radical Research*, *44*, 479-496.

- López-Miranda, J., Pérez-Jiménez, F., Ros, E., De Caterina, R., Badimón, L., Covas, M.I., Escrich, E., Ordovás, J.M., Soriguer, F., Abiá, R., de la Lastra, C.A., Battino, M., Corella, D., Chamorro-Quirós, J., Delgado-Lista, J., Giugliano, D., Esposito, K., Estruch, R., Fernandez-Real, J.M., Gaforio, J.J., La Vecchia, C., Lairon, D., López-Segura, F., Mata, P., Menéndez, J.A., Muriana, F.J., Osada, J., Panagiotakos, D.B., Paniagua, J.A., Pérez-Martínez, P., Perona, J., Peinado, M.A., Pineda-Priego, M., Poulsen, H.E., Quiles, J.L., Ramírez-Tortosa, M.C., Ruano, J., Serra-Majem, L., Solá, R., Solanas, M., Solfrizzi, V., de la Torre-Fornell, R., Trichopoulou, A., Uceda, M., Villalba-Montoro, J.M., Villar-Ortiz, J.R., Visioli, F., Yiannakouris, N. (2010). *Olive oil and health: summary of the II international conference on olive oil and health consensus report*, Jaén and Córdoba (Spain) 2008. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 20, 284-94.
- Montedoro, G., Servili, M., Baldioli, M., Miniati, E. (1992). Simple and hydrolyzable phenolic compounds in virgin olive oil. 1. Their extraction, separation, and quantitative and semiquantitative evaluation by HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40, 1571-1576.
- Oliveras-López, M.J., Innocenti, M., Giaccherini, C., Ieri, F., Romani, A., Mulinacci, N. (2007). Study of the phenolic composition of spanish and Italian monocultivar extra virgin olive oils: Distribution of lignans, secoiridoidic, simple phenols and flavonoids. *Talanta*, 73, 726-732.
- Pérez-Martínez, P., García-Ríos, A., Delgado-Lista, J., Pérez-Jiménez, F., López-Miranda, J. (2011). Mediterranean diet rich in olive oil and obesity, metabolic syndrome and diabetes mellitus. *Current Pharmaceutical Design*, 17, 769-777.
- Prieto-Dominguez, N., García-Mediavilla, M.V., Sánchez-Campos, S., Mauriz, J.L., González-Gallego, J. (2018). Autophagy as a molecular target of flavonoids underlying their protective effects in human disease. *Current Medicinal Chemistry*, 25, 814-838.

- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Simal-Gándara, J., Trujillo, I. (2018a). Genotypic and phenotypic identification of olive cultivars from north-western Spain and characterization of their extra virgin olive oils in terms of fatty acid composition and minor compounds. *Scientia Horticulturae*, 232, 269-279.
- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Forbes-Hernández, T.Y., Gasparri, M., Afrin, S., Cianciosi, D., Carrasco-Pancorbo, A., Simal-Gándara, J., Giampieri, F., Battino, M. (2018b). Characterization of phenolic extracts from Brava extra virgin olive oils and their cytotoxic effects on MCF-7 breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, 119, 73-85.
- Romani, A., Pinelli, P., Mulinacci, N., Galardi, C., Vincieri, F.F., Liberatore, L., Cichelli, A. (2001). HPLC and HRGC analyses of polyphenolics and secoiridoid in olive oil. *Chromatographia*, 53, 279-284.
- Ruiz-Canela, M., Martínez-González, M.A. (2011). Olive oil in the primary prevention of cardiovascular disease. *Maturitas*, 68, 245-250.
- Serra-Majem, L., Trichopoulou, A., De La Cruz, J.N., Cervera, P., Alvarez, A.G., La Vecchia, C., Lemtouni, A., Trichopoulos, D. (2004). Does the definition of the Mediterranean diet need to be updated? (Conference Paper). *Public Health Nutrition*, 7, 927-929.
- Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G., Morozzi, G. (2004). Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: Agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054, 113-127.
- Servili, M., Esposto, S., Lodolini, E., Selvaggini, R., Taticchi, A., Urbani, S., Montedoro, G., Serravalle, M., Gucci, R. (2007). Irrigation effects on quality, phenolic composition, and selected volatiles of virgin olive oils cv. Leccino. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 6609-6618.
- Servili, M., Sordini, B., Esposto, S., Urbani, S., Veneziani, G., Di Maio, I., Selvaggini, R., Taticchi, A. (2014). Biological Activities of Phenolic Compounds of Extra Virgin Olive Oil. *Antioxidants*, 3, 1-23.
- Tanida, I. (2011a). Autophagy basics. *Microbiology and Immunology*, 55, 1-11.

- Tanida, I. (2011b). Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy. *Antioxidants & Redox Signaling*, *14*, 2201-14.
- Taraphdar, A.K., Roy, M., Bhattacharya, R.K. (2001). Natural products as inducers of apoptosis: implication for cancer therapy and prevention. *Current science*, *80*, 1387-1396.
- Trichopoulou, A., Dills, V. (2007). Olive oil and longevity. *Molecular Nutrition and Food Research*, *51*, 1275-1278.
- Uceda, M., Beltrán, G., Jiménez, A. (2005). Composición del aceite (Banco de Germoplasma de Córdoba). *Las Variedades de Olivos Cultivados en España*, Libro II: Variabilidad y Selección, ed. by Rallo, L., Barranco, D., Caballero, J., Martín, A., Del Río, C., Tous, J., et al. Junta de Andalucía/MAPA/ediciones (pp. 365-372). Madrid:Mundi-Prensa.
- Viscogliosi, G., Cipriani, E., Liguori, M.L., Marigliano, B., Saliola, M., Ettorre, E., Andreozzi, P. (2013). Mediterranean dietary pattern adherence: associations with prediabetes, metabolic syndrome, and related microinflammation. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, *11*, 210-216.
- Warleta, F., Campos, M., Allouche, Y., Sánchez-Quesada, C., Ruiz-Mora, J., Beltrán, G., Gaforio, J.J. (2010). Squalene protects against oxidative DNA damage in MCF10A human mammary epithelial cells but not in MCF7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*, *48*, 1092-1100.
- Willett, W.C., Sacks, F., Trichopoulou, A., Drescher, G., Ferro-Luzzi, A., Helsing, E., Trichopoulos, D. (1995). Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *American Journal of Clinical Nutrition*, *61*, 1402S-1406S.
- Wong, R.S.Y. (2011). Apoptosis in cancer: From pathogenesis to treatment. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, *30*, 87.

Efectos del aceite de oliva virgen sobre el envejecimiento

5

José L. Quiles¹, María D. Navarro-Hortal¹, Maurizio Battino^{2,3,4}, Tamara Y. Forbes-Hernández³, José M. Romero-Márquez¹, M Soledad Ferreiro⁵ y Alfonso Varela-López¹

¹Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix Verdú”. Centro de Investigación Biomédica. Departamento de Fisiología. Universidad de Granada, Granada, España; ²Dipartimento di Scienze Cliniche Specialistiche ed Odontostomatologiche-Sez, Biochimica, Università Politecnica delle Marche, Ancona, Italy; ³Nutrition and Food Science Group, Department of Analytical and Food Chemistry, CITACA, CACTI, University of Vigo, Vigo, Spain; ⁴Centro Internacional de Investigación para los Alimentos, Nutrición y Seguridad. Universidad de Jiangsu, Zhenjiang, China; ⁵Azienda Ospedaliera-Ospedali Riuniti Ancona, Ancona, Italia.

Breve reseña del grupo de investigación

El grupo de investigación (@Food4H_Lab_UGR) tiene su base en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix Verdú” en la Universidad de Granada, donde trabaja sobre los efectos beneficiosos del aceite de oliva en la salud desde hace más de 35 años. Fue fundado por el profesor José Mataix Verdú y en la actualidad es liderado por el profesor José L. Quiles. El grupo de Investigación mantiene colaboraciones con distintos grupos nacionales e internacionales, destacando la que se lleva a cabo desde hace más de 25 años con el grupo del profesor Maurizio Battino (@Bio_Lab_UNIVPM), de la Universidad Politécnica de las Marcas en Ancona, Italia. Durante todos estos años el grupo ha profundizado en distintos aspectos relacionados con el aceite de oliva y la salud. Cabe destacar la línea de envejecimiento, a la que se dedica el presente capítulo.

5.1 Introducción

La esperanza de vida del ser humano no deja de aumentar, de modo que la población actual está experimentando un cambio demográfico hacia una sociedad cada vez más envejecida. Así, entre 2015 y 2050 se habrá duplicado el número de habitantes con más de 60 años (World Health Organization, 2018). El envejecimiento se define como un

decaimiento endógeno y progresivo de la eficacia de los procesos fisiológicos que tiene lugar tras la fase reproductiva de la vida. Supone un factor de riesgo importante para el desarrollo de enfermedades como las neurodegenerativas, cardiovasculares, diabetes o cáncer (Niccoli y Partridge, 2012), generando alteraciones específicas en los distintos tejidos del organismo (Fernández del Río y col., 2016).

El envejecimiento es un proceso complejo y multifactorial en el que influyen tanto componentes genéticos como factores ambientales. En relación a estos últimos, uno de los principales factores modificables con un papel clave en el mantenimiento de la salud y en el desarrollo de un envejecimiento saludable es la dieta (World Health Organization, 2003). Los lípidos son uno de los tres macronutrientes, destacando en su composición la presencia de ácidos grasos. Estos ácidos grasos administrados a través de la dieta, además de representar una de las principales fuentes energéticas, son incorporados a las membranas biológicas, modificando la composición de las cadenas hidrocarbonadas de sus fosfolípidos. De esta manera, contribuyen a la estructura celular y modulan las propiedades de las bicapas lipídicas de las que forman parte. Además, los ácidos grasos pueden ser convertidos en otros ácidos grasos de cadena más larga y con mayor número de insaturaciones, lo que puede derivar en la generación de una gran variedad de compuestos con capacidad para modular procesos biológicos (Desnoyers y col., 2018; Quiles y col., 2010).

Las diferencias en las propiedades químicas de los distintos ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos de membrana tienen implicaciones en mecanismos relacionados con el envejecimiento (Ramirez-Tortosa y col., 2019). El grado de insaturación de dichos ácidos grasos puede modificar la susceptibilidad de las membranas que los contienen de sufrir alteraciones oxidativas debido a la existencia de una relación directa entre la insaturación, los procesos oxidativos y el consecuente daño generado. Es decir, la resistencia a los procesos oxidativos y protección de la célula es mayor cuanto menor es el grado de insaturación, principalmente cuando éstas son ricas en ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) (Quiles y col., 2006). El alto grado de insaturación en los fosfolípidos de membrana no sólo los convierte en el blanco de agentes oxidantes, sino que también les permite participar en una larga cadena de reacciones de radicales libres (Pamplona, 2008). Las membranas de las mitocondrias son especialmente sensibles a las especies reactivas que escapan de la cadena de transporte electrónico en el proceso de fosforilación oxidativa que tiene lugar en este orgánulo. En el proceso de envejecimiento,

cambios en el perfil de ácidos grasos de la membrana mitocondrial pueden modular la susceptibilidad a la oxidación (Ochoa y col., 2003), observándose una relación inversa entre el grado de insaturación y la longevidad (Pamplona, 2008).

Dentro de los AGMI, el ácido oleico (C18:1n9) es el que se incorpora en una mayor proporción a través de la dieta, y está ampliamente presente en el aceite de oliva (Schwingshackl y Hoffmann, 2014). El aceite de oliva como principal fuente de energía obtenida a partir de grasa es una de las características más conocidas e importantes de la dieta mediterránea. En general, la dieta y estilo de vida mediterráneo se consideran protectores y compatibles con un envejecimiento más saludable y mayor longevidad. A este patrón dietético en general, y al aceite de oliva en particular, se le atribuyen efectos beneficiosos a nivel cardiovascular (Estruch y col., 2018; Schwingshackl y Hoffmann, 2014) y cognitivo (Martínez-Lapiscina y col., 2013 a y b), así como una reducción del riesgo de desarrollar ciertos tipos de cáncer (Buckland y col., 2012; Pelucchi y col., 2011). El aceite de oliva y su alto contenido en AGMI se asocian con una reducción de factores de riesgo cardiovasculares debido a su influencia sobre el perfil lipídico plasmático, el endotelio, la sensibilidad a la insulina, la presión sanguínea y marcadores inflamatorios, y a la reducción de la lipoproteína de baja densidad (LDL) de colesterol. Además, se han observado efectos antioxidantes, antiaterogénicos, y una disminución de glucemia y de requerimientos de insulina en diabéticos (Perez-Jimenez y col., 2005). Los AGMI podrían estar relacionados con el mantenimiento de la integridad estructural de las membranas neuronales, contribuyendo así a reducir el riesgo de deterioro cognitivo asociado a la vejez (Perez-Jimenez y col., 2005; Van den Brink y col., 2019). En conjunto, todos los efectos de este tipo de grasa se traducen, finalmente, en una reducción de la mortalidad por cualquier causa, según muestra un estudio realizado en la cohorte española del proyecto EPIC (Buckland y col., 2012).

La presente revisión tiene como objetivo resumir los hallazgos encontrados por nuestro grupo de investigación en relación al aceite de oliva en comparación con otras fuentes grasas en un modelo de envejecimiento en rata. Ratas wistar (*Rattus norvegicus*) macho con un peso inicial de 80-90 g se mantuvieron a 20 °C en un ciclo de 12 h luz/12 h oscuridad con acceso libre a agua y comida. Los animales se dividieron aleatoriamente en tres grupos y fueron alimentados desde el destete y durante toda su vida con una dieta isoenergética e isocalórica formulada de acuerdo con los criterios dietéticos de la AIN-93 para roedores (Reeves, 1997) excepto para la fuente de grasa. Las grasas dietéticas

estaban basadas en AGMI procedentes del aceite de oliva virgen, ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) n-6 aportados por el aceite de girasol, o AGPI n-3 proporcionados por el aceite de pescado. El perfil de ácidos grasos del aceite empleado en cada tratamiento dietético aparece recogido en la Figura 5.1. Después de 6 y 24 meses, se procedió a estudiar el efecto de la alimentación según el tipo de grasa en distintas estructuras y tejidos del organismo: hueso alveolar, fémur, páncreas e hígado. Además, se evaluó el efecto de la dieta sobre la longevidad y las causas de muerte de animales que se mantuvieron en las mencionadas condiciones hasta su muerte. Antes de proceder a estudiar parámetros específicos, se valoró si los ácidos grasos de las dietas experimentales habían sido incorporados a las membranas biológicas. Los resultados del perfil de ácidos grasos circulantes y de las membranas mitocondriales de las distintas estructuras mostraron una mayor cantidad de ácido oleico en el grupo de animales alimentados con aceite de oliva virgen, mayor porcentaje de ácido linoleico en el grupo de aceite de girasol, y mayores niveles de ácido eicosapentaenoico y docosaheptaenoico en los animales pertenecientes al grupo de aceite de pescado. Estos datos confirmaron que los animales se adaptaron de una manera adecuada a las grasas de las dietas experimentales.

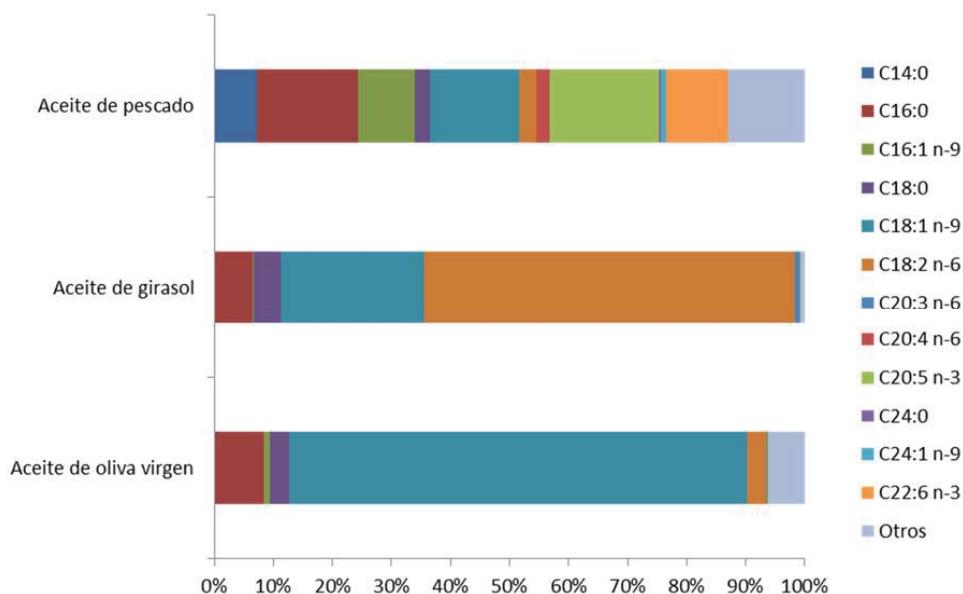


Figura 5.1 Perfil de ácidos grasos (%) de los tres tratamientos dietéticos en base a su fuente de grasa: aceite de oliva virgen, aceite de girasol, o aceite de pescado.

5.2 El aceite de oliva favorece el mantenimiento de la estructura ósea en hueso alveolar y fémur en el envejecimiento

La periodontitis es una enfermedad crónica de tipo inflamatorio estrechamente relacionada con el envejecimiento. Está causada por microorganismos específicos bucales y se caracteriza por la pérdida de soporte del ligamento periodontal y de hueso alveolar, siendo la primera causa de caída de los dientes (Varela-López y col., 2018a). Además de la importancia de la periodontitis como patología en sí misma, es relevante la vinculación encontrada entre ésta y otras enfermedades como las de tipo cardiovascular, entre las que se encuentra la aterosclerosis (Lockhart y col., 2012). Por tanto, una actuación a nivel de prevención o retraso en el desarrollo es clave en un envejecimiento saludable, y la dieta es el principal factor modulable.

El estudio realizado por Bullón y col. (2013) abarcó el análisis del hueso alveolar a nivel mesial y distal en el primer molar y segundo premolar, junto con una evaluación histológica del tejido gingival en la mucosa molar gingival. En relación a la resorción ósea, los animales alimentados con aceite de oliva virgen durante toda su vida en comparación con otras fuentes grasas (aceite de pescado o de girasol) manifestaron una menor pérdida de hueso alveolar con el envejecimiento, siendo el aceite de girasol el que más pérdida generó. A nivel histopatológico, destacó el menor grado de fibrosis y la mayor celularidad en animales de 24 meses en el tratamiento con aceite de oliva con respecto a los otros dos grupos, y la menor inflamación comparándolo con el aceite de girasol. Los niveles circulantes de citoquinas proinflamatorias y de sus respectivos ARNm en tejido gingival fueron superiores en animales viejos comparados con los jóvenes, pero no hubo diferencias entre tratamientos dietéticos. Esto hizo pensar que la inflamación observada se debía a la propia periodontitis derivada del proceso fisiológico de envejecimiento, y no a la promoción en exceso de ésta por ningún tratamiento dietético en particular. Con respecto al daño oxidativo, la peroxidación lipídica evaluada mediante la técnica de TBARS en encía fue mayor en el grupo tratado con aceite de girasol.

La masa ósea y la microarquitectura degeneran con el envejecimiento, lo que predispone a fragilidad y a fracturas. Este fenómeno se conoce como osteoporosis, donde predomina la resorción sobre la formación, resultando en una pérdida neta de hueso (Chin y Ima-Nirwana, 2016). Entre su patogénesis está cobrando especial reconocimiento la inflamación y el estrés oxidativo (Manolagas, 2010). En estos fenómenos, como ya se ha

mencionado anteriormente, el tipo de ácido graso presente en las membranas biológicas tiene un papel relevante, siendo los AGMI los que derivan en un menor nivel de estrés oxidativo en el envejecimiento comparados con los AGPI n3 y n6 (Quiles y col., 2004).

Varela-López y col. (2017) encontraron una mayor densidad mineral ósea en el fémur de ratas alimentadas con aceite de oliva como fuente de grasa dietética durante 24 meses en comparación con el aceite de girasol, lo que indica que podría prevenir su disminución asociada a la edad. Este hecho ha sido constatado también en otros estudios, manifestando el potencial del aceite de oliva virgen en la prevención de la osteoporosis (Liu y col., 2014).

Con el fin de indagar en los hallazgos encontrados a nivel resorción ósea y densidad mineral ósea en hueso alveolar y fémur respectivamente, se procedió a la medida de los niveles circulantes y de la expresión génica de dos proteínas antagonistas relacionadas con la resorción ósea: el receptor activador para el ligando del factor nuclear κ B (RANKL) y la osteoprotegerina (OPG). El incremento de la expresión local de RANKL o la disminución de OPG derivan en un predominio del proceso de resorción ósea. De hecho, se ha visto que la periodontitis cursa con un ratio RANKL/OPG elevado (Jules y col, 2010). Siguiendo en esa misma línea, en este estudio se encontró que el ratio estaba elevado en animales viejos con respecto a los jóvenes, lo que corroboró que el envejecimiento estaba favoreciendo la pérdida de hueso independientemente del tratamiento. Analizando por separado RANKL y OPG, se observó que el primer marcador fue mayor en animales jóvenes que en viejos en todos los grupos mientras que OPG estaba elevada en animales viejos tratados con aceite de oliva virgen y de pescado pero no en el grupo de girasol. Estos resultados sugieren que esos niveles elevados de OPG podrían constituir un mecanismo de defensa frente a una pérdida excesiva de hueso inducida por el exceso de estimulación de RANKL en el envejecimiento (Benatti, y col., 2009). Además, ese mecanismo podría verse modificado por la dieta, tal y como muestra este estudio.

Según los resultados obtenidos, la pérdida de hueso debida a la edad podría estar condicionada por el tipo de grasa de la dieta. Los AGMI predominantes en el aceite de oliva virgen y los AGPI n3 presentes en el aceite de pescado permiten un adecuado recambio mitocondrial mediante la inducción de biogénesis y autofagia y a través de la actuación de sistemas antioxidantes. De esta manera, una dieta adecuada podría reducir

el exceso de pérdida de hueso alveolar característico de las enfermedades periodontales, especialmente en el envejecimiento.

El daño oxidativo, evaluado mediante los niveles de isoprostanos en orina, fue menor en aceite de oliva virgen que en el grupo alimentado con aceite de girasol. Lo mismo sucedió con la densidad mineral ósea, de manera que ambos parámetros se pueden correlacionar (Sharma y col., 2015). Además, la suplementación con coenzima Q₁₀ (CoQ₁₀) en el tratamiento con aceite de girasol evitó esa pérdida de densidad mineral ósea asemejando los resultados a los obtenidos por el aceite de oliva virgen.

En resumen, el aceite de oliva y su riqueza en AGMI promueve una mayor tasa de recambio óseo y el mantenimiento de éste durante más tiempo, mejorando el mantenimiento de la estructura ósea durante el envejecimiento.

5.3 El aceite de oliva virgen como fuente grasa de elección para un envejecimiento óptimo del páncreas

El páncreas es un órgano vital para la digestión y utilización de nutrientes. Esta función dual se puede llevar a cabo gracias a la presencia de dos compartimentos diferentes: el páncreas exocrino y el endocrino. Para su correcto funcionamiento es necesaria una estructura pancreática adecuada, por lo que cambios en su masa celular son críticos en el desarrollo de trastornos (Ouyang y col., 2011). Determinados hábitos dietéticos y de estilo de vida condicionan la aparición de ciertas patologías, alterando incluso de manera diferente cada compartimento.

Como hallazgo relevante del estudio llevado a cabo por Roche y col. (2014) destacó el efecto diferente del tipo de grasa en cada compartimento del páncreas. Los AGMI predominantes en el aceite de oliva virgen generaron niveles más bajos de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y de carbonilos proteicos en tejido pancreático, lo que muestra un menor daño oxidativo. A nivel del páncreas endocrino, los animales viejos alimentados con aceite de oliva virgen presentaron un menor número y menor tamaño de células β en los islotes que los del grupo de aceite de girasol, evaluado por el menor nivel de insulina y leptina en ellos. Valores elevados de esos parámetros, entre otros, han sido descritos en alteraciones como obesidad, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina o prediabetes (Jones y col., 2010). Ese hallazgo, junto con los niveles similares de

glucemia entre grupos, hizo pensar que los AGPI n-6 presentes en el aceite de girasol podrían inducir resistencia periférica a la insulina, sobrecargando la actuación del páncreas endocrino lo cual, a largo plazo, podría derivar en muerte celular. La porción exocrina del páncreas sufrió menos alteraciones en el tratamiento con aceite de oliva virgen en comparación con la dieta rica en AGPI n-3. De este modo se observó en el grupo alimentado con aceite de pescado mayor fibrosis acinar e infiltrado de macrófagos en la región peri-insular. Por su parte, los acinos pancreáticos de los animales pertenecientes al grupo de aceite de oliva virgen mostraron una histología normal.

Como conclusión en base a los resultados observados, los AGPI n-6 afectaron principalmente al compartimento endocrino, provocando un sobre esfuerzo que podría predisponer o acelerar el paso hacia una diabetes, mientras que los AGPI n-3 alteraron sobretodo el compartimento exocrino. Por tanto, y teniendo en cuenta los tres aceites estudiados, podría concluirse que el aceite de oliva virgen, rico en AGMI, sería la fuente grasa de elección para un envejecimiento óptimo del páncreas.

5.4 Efecto protector del aceite de oliva en el envejecimiento a nivel hepático

El hígado, principal órgano metabólico del cuerpo, parece ser uno de los menos afectados por el envejecimiento. Su función se preserva relativamente bien en esa etapa de la vida, y su gran capacidad de regeneración lo hace muy susceptible a los cambios de la dieta (Anantharaju y col., 2002). A pesar de ello, en el hígado aparecen ciertas alteraciones asociadas a la edad que se han podido constatar en el estudio llevado a cabo por Varela-López y col. (2018b). En ratas de 24 meses de edad se detectó la aparición de esteatosis, inflamación centrilobular, y cierto grado de esteatopatitis no alcohólica en comparación con los animales jóvenes e independientemente del tipo de grasa administrada. A nivel histopatológico, la fibrosis también fue encontrada únicamente en animales viejos, pero, en este caso, el tipo de grasa de la dieta afectó al grado de fibrosis durante el envejecimiento. Destacó el menor grado de fibrosis en el hígado de animales viejos alimentados con aceite de oliva virgen comparados con los alimentados con aceite de girasol, mientras que los resultados del aceite de pescado fueron similares. Con respecto a la ultraestructura mitocondrial, el aceite de oliva virgen manifestó menor área y perímetro que el de girasol, y mayor densidad mitocondrial. Las mitocondrias de gran

tamaño son un marcador típico del envejecimiento relacionado con pérdida de función y de potencial de membrana (Sastre y col., 2003). En experimentos con diseño similar pero con la grasa al 8% m/m se observaron resultados en la misma línea, siendo los animales alimentados con aceite de oliva virgen en comparación con los alimentados con girasol los que presentaron una menor circularidad y más cantidad de crestas mitocondriales, lo que se relaciona con mayor funcionalidad del orgánulo (Quiles y col., 2006). Los niveles de carbonilos proteicos analizados como marcador de daño oxidativo hepático fueron menores en aceite de oliva virgen en comparación con los otros dos, probablemente por el efecto del grado de insaturación en el daño oxidativo (Quiles y col., 2004, 2006).

El análisis de la expresión de genes implicados en la función mitocondrial hepática puso de manifiesto el efecto preventivo del aceite de oliva y de pescado en el deterioro generado por el envejecimiento a través de la sobreexpresión de esos genes. Además, estos dos tipos de grasa parecían proporcionar una adecuada adaptación al estrés oxidativo asociado al proceso de envejecimiento y protección frente al acortamiento de los telómeros debido a la edad. Los marcadores de daño oxidativo corroboraron estos hallazgos. En el estudio anteriormente mencionado con grasa al 8% m/m (Quiles y col., 2006) se observó una menor aparición de la delección común del ADN mitocondrial en el aceite de oliva virgen, posiblemente derivado, nuevamente, de un menor estrés oxidativo.

En resumen, la dieta con aceite de oliva virgen fue la que mejor preservó el hígado durante el envejecimiento, siendo el tratamiento que llevó a menos alteraciones tisulares y que permitió una adaptación adecuada al envejecimiento a través de cambios a nivel de expresión génica. Por su parte, el aceite de girasol fue el que más fibrosis generó, y el de pescado, el que derivó en una situación más pro-inflamatoria.

5.5 Longevidad y causas de muerte

El rápido envejecimiento de la población suscita el interés en conocer, no sólo las causas de este fenómeno, sino también las posibles estrategias a aplicar para reducir, retrasar, parar e incluso revertir su progresión. Son numerosos los factores que influyen sobre la longevidad; entre ellos, se encuentran los ambientales, sociodemográficos, el estilo de vida y la dieta. En relación a la dieta y la grasa dietética, la evidencia sugiere que la longevidad está inversamente relacionada con el grado de insaturación de los fosfolípidos

que forman parte de las membranas biológicas (Pamplona, 2008). En ese sentido, Ramírez-Tortosa y col. (2019) llevaron a cabo un estudio para evaluar la longevidad y las causas de muerte en tres grupos experimentales según la grasa de la dieta: aceite de oliva virgen, aceite de pescado y aceite de girasol. Se observó que las causas de muerte fueron similares entre los tres grupos mencionados, destacando las neoplasias como la más frecuente, especialmente las de tipo epitelial. Sin embargo, la probabilidad de supervivencia sí varió en función del tratamiento dietético. El grupo alimentado con aceite de oliva virgen presentó una mayor probabilidad de supervivencia a todas las edades en comparación con el grupo alimentado con aceite de girasol. Los animales alimentados con aceite de pescado también presentaron mayor supervivencia que los alimentados con aceite de girasol, pero sólo en determinadas edades. La vida media en los animales tratados con aceite de girasol fue un 18% y 17% menor con respecto al de aceite de oliva virgen y al de pescado, respectivamente. Este estudio también aportó información relevante sobre el efecto de la suplementación de las tres grasas estudiadas con CoQ₁₀. Destacó que al suplementar al aceite de girasol con CoQ₁₀, se alcanzó una vida media similar al del resto de grasas. Sin embargo, no se observó efecto de esa suplementación en el caso del tratamiento con aceite de oliva virgen o pescado.

5.6 Conclusiones

El aceite de oliva virgen ejerce un efecto positivo en distintos tejidos del organismo de la rata durante el envejecimiento, principalmente cuando se compara con el grupo alimentado con aceite de girasol. De este modo, los animales alimentados con aceite de oliva virgen presentaron menor número de células β y contenido de insulina en páncreas, menor fibrosis hepática, menor pérdida de hueso alveolar, y mayor densidad de masa ósea en el fémur. En general, los marcadores de daño oxidativo a nivel hepático, pancreático, gingival y sistémico fueron también menores en animales alimentados con aceite de oliva virgen con respecto a aquellos tratados con aceite de girasol o pescado. Finalmente, aunque los animales se acabaron muriendo por causas similares independientemente del grupo experimental, el aceite de oliva virgen incrementó la supervivencia con respecto al de girasol. Este efecto podría deberse a un retraso en la aparición de las distintas enfermedades o en cambios en la velocidad de desarrollo y avance de las mismas. Aunque la longevidad fue similar entre el grupo de aceite de oliva y pescado, probablemente la

calidad de vida en este último caso fuera menor a causa de alteraciones en páncreas exocrino, mayor pérdida de hueso alveolar asociada a la edad, y mayores niveles de daño oxidativo en hígado y páncreas. Los efectos observados, al menos en parte, se pueden atribuir a la diferente susceptibilidad al daño oxidativo según el tipo de ácido graso que se incorpora a las membranas biológicas. Por tanto, este conjunto de estudios sugiere que la dieta rica en AGMI podría reducir la mortalidad en la mayoría de edades en comparación con las ricas en AGMI n6. De esta manera, se pone de manifiesto la capacidad para modular los efectos del proceso fisiológico de envejecimiento sobre el organismo por parte de la dieta y, más concretamente, de los ácidos grasos.

Agradecimientos

Los resultados que se muestran en este capítulo han sido financiados por proyectos del Ministerio de Educación y Formación Profesional de España [AGL2008-01057] y el Gobierno de Andalucía [AGR832]. María D. Navarro-Hortal y José M. Romero-Márquez son becarios de FPU del Ministerio de Educación y Formación Profesional de España. Tamara Y. Forbes-Hernández disfruta de un contrato Juan de la Cierva de Formación. Los autores quieren agradecer la ayuda prestada por la Universidad de Granada al Grupo de Investigación a través del programa *Visiting Scholars* del Plan Propio de Investigación 2018.

Referencias bibliográficas

- Anantharaju, A., Feller, A., Chedid, A. (2002). Aging Liver. A review. *Gerontology*, 48, 343-353.
- Benatti, B.B., Silvério, K.G., Casati, M.Z., Sallum, E.A., Nociti, F.H. (2009). Inflammatory and bone-related genes are modulated by aging in human periodontal ligament cells. *Cytokine*, 46, 176-181.
- Buckland, G., Mayén, A.L., Agudo, A., Travier, N., Navarro, C., Huerta, J.M., Chirlaque, M. D., Barricarte, A., Ardanaz, E., Moreno-Iribas, C., Marin, P., Quirós, J.R., M.L. Redondo, Amiano, P., Dorronsoro, M., Arriola, L., Molina, E., Sanchez, M.J., Gonzalez, C.A. (2012). Olive oil intake and mortality within the Spanish population (EPIC-Spain). *The American Journal of Clinical Nutrition*, 96, 142-149.

- Bullon, P., Battino, M., Varela-Lopez, A., Perez-Lopez, P., Granados-Principal, S., Ramirez-Tortosa, M.C., Ochoa, J.J., Cordero, M.D., Gonzalez-Alonso, A., Ramirez-Tortosa, C.L., Rubini, C., Zizzi, A., Quiles, J.L. (2013). Diets based on virgin olive oil or fish oil but not on sunflower oil prevent age-related alveolar bone resorption by mitochondrial- related mechanisms. *PLoS One*, 8, e74234.
- Chin, K.Y., Ima-Nirwana, S. (2016). Olives and Bone: A Green Osteoporosis Prevention Option. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 13.
- Desnoyers, M., Gilbert, K., Madingou, N., Gagné, M.A., Daneault, C., Des Rosiers, C., Rousseau, G. (2018). A high omega-3 fatty acid diet rapidly changes the lipid composition of cardiac tissue and results in cardioprotection. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 96, 916-921.
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.-I., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventós, R.M., Serra-Majem, L., Pintó, X., Basora, J., Muñoz, M.A., Sorlí, J.V., Martínez, J.A., Martínez-González, M.D. (2018). Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *The New England Journal of Medicine*, 378, e34.
- Fernández del Río, L., Gutiérrez-Casado, E., Varela-López, A., Villalba, J. M. (2016). Olive Oil and the Hallmarks of Aging. *Molecules*, 21, 163.
- Jones, H.B., Nugent, D., Jenkins, R. (2010). Variation in characteristics of islets of Langerhans in insulin-resistant, diabetic and non-diabetic-rat strains. *International Journal of Experimental Pathology*, 91, 288-301.
- Jules, J., Ashley, J.W., Feng, X. (2010). Selective targeting of RANK signaling pathways as new therapeutic strategies for osteoporosis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 14, 923-934.
- Liu, H., Huang, H., Li, B., Wu, D., Wang, F., Zheng, X. hua, Chen, Q., Wu, B., Fan, X. (2014). Olive oil in the prevention and treatment of osteoporosis after artificial menopause. *Clinical Interventions in Aging*, 9, 2087-2095.

- Lockhart, P. B., Bolger, A. F., Papapanou, P. N., Osinbowale, O., Trevisan, M., Levison, M. E., American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young, Council on Epidemiology and Prevention, Council on Peripheral Vascular Disease, and Council on Clinical Cardiology. (2012). Periodontal disease and atherosclerotic vascular disease: Does the evidence support an independent association?: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*, *125*, 2520-2544.
- Manolagas, S.C. (2010). From estrogen-centric to aging and oxidative stress: A revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocrine Reviews*, *31*, 266-300.
- Martínez-Lapiscina, E.H., Clavero, P., Toledo, E., San Julián, B., Sanchez-Tainta, A., Corella, D., Lamuela-Raventos, R.M., Martínez, J.A., Martínez-Gonzalez, M.Á. (2013a). Virgin olive oil supplementation and long-term cognition: The PREDIMED-NAVARRA randomized, trial. *The Journal of Nutrition, Health & Aging*, *17*, 544-552.
- Martínez-Lapiscina, E.H., Clavero, P., Toledo, E., Estruch, R., Salas-Salvadó, J., San Julián, B., Sanchez-Tainta, A., Ros, E., Valls-Pedret, C., Martínez-Gonzalez, M.Á. (2013b). Mediterranean diet improves cognition: The PREDIMED-NAVARRA randomised trial. *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry*, *84*, 1318-1325.
- Niccoli, T., Partridge, L. (2012). Ageing as a risk factor for disease. *Current Biology: CB*, *22*, R741-752.
- Ochoa, J.J., Quiles, J.L., Ibáñez, S., Martínez, E., López-Frías, M., Huertas, J.R., Mataix, J. (2003). Aging-related oxidative stress depends on dietary lipid source in rat postmitotic tissues. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, *35*, 267-275.
- Ouyang, D., Dhall, D., Yu, R. (2011). Pathologic pancreatic endocrine cell hyperplasia. *World Journal of Gastroenterology*, *17*, 137-143.
- Pamplona, R. (2008). Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: A causal role in aging and longevity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, *1777*, 1249-1262.
- Pelucchi, C., Bosetti, C., Negri, E., Lipworth, L., La Vecchia, C. (2011). Olive oil and cancer risk: An update of epidemiological findings through 2010. *Current Pharmaceutical Design*, *17*, 805-812.

- Perez-Jimenez, F., Alvarez de Cienfuegos, G., Badimon, L., Barja, G., Battino, M., Blanco, A., ... Visioli, F. (2005). International conference on the healthy effect of virgin olive oil. *European Journal of Clinical Investigation*, 35, 421-424.
- Quiles, J.L., Ochoa, J.J., Ramirez-Tortosa, C., Battino, M., Huertas, J.R., Martín, Y., Mataix, J. (2004). Dietary fat type (virgin olive vs. Sunflower oils) affects age-related changes in DNA double-strand-breaks, antioxidant capacity and blood lipids in rats. *Experimental Gerontology*, 39, 1189-1198.
- Quiles, J.L., Ochoa, J.J., Ramirez-Tortosa, M.C., Huertas, J.R., & Mataix, J. (2006). Age-related mitochondrial DNA deletion in rat liver depends on dietary fat unsaturation. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 61, 107-114.
- Quiles, J.L., Pamplona, R., Ramirez-Tortosa, M.C., Naudí, A., Portero-Otin, M., Araujo-Nepomuceno, E., López-Frías, M., Battino, M., Ochoa, J.J. (2010). Coenzyme Q addition to an n-6 PUFA-rich diet resembles benefits on age-related mitochondrial DNA deletion and oxidative stress of a MUFA-rich diet in rat heart. *Mechanisms of Ageing and Development*, 131, 38-47.
- Ramirez-Tortosa, C.L., Varela-López, A., Navarro-Hortal, M.D., Ramos-Pleguezuelos, F.M., Márquez-Lobo, B., Ramirez-Tortosa, M.C., Ochoa, J.J., Battino, M., Quiles, J.L. (2019). Longevity and cause of death in male Wistar rats fed lifelong diets based on virgin olive oil, sunflower oil or fish oil. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*.
- Reeves, P.G. (1997). Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *The Journal of Nutrition*, 127, 838S-841S.
- Roche, E., Ramírez-Tortosa, C.L., Arribas, M.I., Ochoa, J.J., Sirvent-Belando, J.E., Battino, M., Ramirez-Tortosa, M.C., González-Alonso, A., Pérez-López, M.P., Quiles, J.L. (2014). Comparative analysis of pancreatic changes in aged rats fed life long with sunflower, fish, or olive oils. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences*, 69, 934-944.
- Sastre, J., Pallardó, F.V., Viña, J. (2003). The role of mitochondrial oxidative stress in aging. *Free Radical Biology & Medicine*, 35, 1-8.

- Schwingshackl, L., Hoffmann, G. (2014). Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Lipids in Health and Disease*, 13, 154.
- Sharma, T., Islam, N., Ahmad, J., Akhtar, N., Beg, M. (2015). Correlation between bone mineral density and oxidative stress in postmenopausal women. *Indian Journal of Endocrinology and Metabolism*, 19, 491-497.
- Van den Brink, A.C., Brouwer-Brolsma, E.M., Berendsen, A.A.M., van de Rest, O. (2019). The Mediterranean, Dietary Approaches to Stop Hypertension (DASH), and Mediterranean-DASH Intervention for Neurodegenerative Delay (MIND) Diets Are Associated with Less Cognitive Decline and a Lower Risk of Alzheimer's Disease—A Review. *Advances in Nutrition*, 10, 1040-1065.
- Varela-López, A., Ochoa, J.J., Llamas-Elvira, J.M., López-Frías, M., Planells, E., Speranza, L., Battino, M., Quiles, J.L. (2017). Loss of Bone Mineral Density Associated with Age in Male Rats Fed on Sunflower Oil Is Avoided by Virgin Olive Oil Intake or Coenzyme Q Supplementation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18.
- Varela-López, A., Navarro-Hortal, M.D., Giampieri, F., Bullón, P., Battino, M., Quiles, J.L. (2018a). Nutraceuticals in Periodontal Health: A Systematic Review on the Role of Vitamins in Periodontal Health Maintenance. *Molecules*, 23, 1226.
- Varela-Lopez, A., Pérez-López, M.P., Ramirez-Tortosa, C.L., Battino, M., Granados-Principal, S., Ramirez-Tortosa, M.D.C., Ochoa, J.J., Vera-Ramirez, L., Giampieri, F., Quiles, J.L. (2018b). Gene pathways associated with mitochondrial function, oxidative stress and telomere length are differentially expressed in the liver of rats fed lifelong on virgin olive, sunflower or fish oils. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 52, 36-44.
- World Health Organization. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases: Report of a Joint WHO/FAO Expert Consultation. (2003). <http://www.fao.org/3/AC911E/ac911e00.htm> Accessed 5 July 2019.
- World Health Organization. Ageing and health. (2018). <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health> Accessed 17 July 2019.

Papel del aceite de oliva y la dieta mediterránea, en la enfermedad cardiovascular. Perfil lipoproteico

6

Álvaro Hernáez^{1,2,3}, Montserrat Fitó^{2,3} y Olga Castañer^{2,3}

¹ Instituto August Pi i Sunyer de Investigación Biomédica (IDIBAPS); ² CIBER de la Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBERObn); ³ Instituto Hospital del Mar de Investigaciones Médicas (IMIM),
Barcelona

Breve reseña del grupo de investigación

El grupo de investigación de Riesgo Cardiovascular y Nutrición (CARIN), pertenece al Programa de Investigación de Epidemiología y Salud Pública del Instituto Hospital del Mar de Investigación Médica (IMIM). Asimismo el grupo es miembro de la CIBER de Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición (CIBERObn), una red española integrada por grupos de investigación de excelencia centrados en la obesidad y la nutrición. El grupo CARIN pertenece asimismo al Centro de Estudios Catalanes en Nutrición (CCNIEC) y al Grupo del Estudio REGICOR (Registre Gironí del Cor), que ha sido reconocido como Grupo de Investigación Consolidado por AGAUR (la Agencia de Gestión de Ayudas Universitarias e Investigación de Cataluña).

El grupo CARIN es un equipo multidisciplinar formado por especialistas en nutrición, endocrinología, medicina de familia, epidemiología nutricional, farmacia, biología, estadística y análisis clínicos. El grupo está focalizado en estudios nutricionales y beneficios de un estilo de vida saludable, basado en dieta y práctica de actividad física, sobre el riesgo de enfermedades degenerativas crónicas, principalmente las enfermedades cardiovasculares. Por otra parte, la actividad del equipo se centra en el estudio de los mecanismos subyacentes al beneficio de una dieta saludable, y el estilo de vida global, sobre los factores de riesgo clásicos y biomarcadores emergentes (estado inflamatorio y oxidativo, perfil lipídico, funcionalidad de la lipoproteína de alta densidad (HDL), aterogenicidad de la lipoproteína de baja densidad (LDL), función endotelial y resistencia a la insulina), efectos nutrigenómicos promovidos por los nutrientes y la interacción de los mismos con la flora intestinal.

6.1 Enfermedad cardiovascular y factores de riesgo

Cuando se observa la incidencia de enfermedad coronaria y las tasas de mortalidad por la misma, en general son más bajas entre los países situados en el área mediterránea (Dégano y col., 2013; Tunstall-Pedoe y col., 1999). Los factores de estilo de vida, como la práctica de actividad física regular, una dieta saludable y la cohesión social existente en los países del sur de Europa, han sido reconocidos como factores candidatos a explicar la paradoja del mediterráneo. La paradoja de los países del sur de Europa, con una baja tasa de enfermedades cardiovasculares (ECV) (Gjonça y Bobak, 1997; Masiá y col., 1998; Renaud y de Lorgeril, 1992) a pesar de una alta prevalencia de factores de riesgo cardiovascular clásicos (Aravanis y col., 1970; McGovern y col., 1996), se atribuye en parte a una alta de adherencia a la dieta mediterránea (DietMed).

Entre los factores de riesgo de la ECV existen unos no modificables como son la edad, sexo y carga genética, aunque hoy en día se conoce que la herencia genética también puede ser modificable mediante los procesos epigenéticos. Y por otra parte, están los factores de riesgo modificables como el tabaquismo, sedentarismo y una alimentación no saludable. El conjunto de dichos factores puede incidir en la existencia de marcadores de riesgo clásicos, que son considerados en el manejo clínico del riesgo de la ECV, como son la hipertensión, dislipemia, diabetes y sobrepeso/obesidad. Finalmente, la existencia de estos factores de riesgo clásicos, y/u otros emergentes, puede desencadenar en el debut de la enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular, enfermedad periférica vascular, y en definitiva en la calidad de vida durante el envejecimiento. Nuestros estudios se han centrado principalmente en el papel de un patrón de dieta saludable como es la dieta mediterránea, y el aceite de oliva (AO) como uno de sus componentes clave, en el perfil lipídico.

6.2 Patrón de dieta mediterránea tradicional

La DietMed tradicional se caracterizaba por comer con moderación, una cocina elaborada con productos de temporada y proximidad y una socialización durante las comidas. Por otra parte, e influido por el clima de los países mediterráneos, la práctica de actividad

física regular también forma parte de los hábitos relacionados con el estilo de vida. El patrón de la DietMed difiere, lógicamente, en los diferentes países mediterráneos según la disponibilidad de los alimentos en las distintas regiones. Sin embargo, el uso de alimentos derivados de 3 productos, oliva, trigo y viña, es común a todos ellos, la denominada trilogía mediterránea. El AO constituye el principal aporte de grasa de la dieta mediterránea. Un consumo relativamente alto de grasa (hasta un 40% del consumo total de energía), principalmente de ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) (hasta un 20% del consumo total de energía) es característico de esta dieta (Urpi-Sarda y col., 2012). En el área mediterránea se estima que los sujetos consumen entre 25 y 50 ml de AO por día (en crudo y para cocinar). En este sentido el consumo de AO asegura un aumento de AGMI, sin un aumento significativo de ácidos grasos saturados (AGS) y garantiza una ingesta adecuada de ácidos grasos polinsaturados (AGPI). Como consecuencia, la relación AGMI/SFA es mucho mayor en las áreas donde se realiza una DietMed (Trichopoulou y Lagiou, 1997). La dieta mediterránea además se caracteriza por: 1/ un alto consumo de frutas, verduras, legumbres, frutos secos y cereales; 2/ una ingesta moderada de pescado y aves de corral, productos lácteos fermentados y huevos; y 3/ una ingesta baja de carnes rojas, derivados de las mismas, productos de leche entera y dulces. Mencionar que, en el patrón de esta dieta está contemplado el beber vino con moderación, en las comidas y siempre según las preferencias y en caso de que no esté contraindicado por alguna patología. Destacar la relevancia de la calidad del patrón de alimentación global, las interacciones entre los diferentes alimentos y nutrientes y los efectos acumulativos pueden tener, sin duda, un papel en los efectos beneficiosos de una dieta para la salud.

6.3 Efecto de la dieta mediterránea sobre las enfermedades cardiovasculares

En varios estudios, la DietMed se ha relacionado con una destacada longevidad y un riesgo reducido de morbilidad y mortalidad en general. El término DietMed fue acuñado en la década de 1960 por Ancel Keys en el marco del Estudio de los siete países. Este estudio epidemiológico con más de 12.000 individuos puso de manifiesto que las poblaciones italiana y griega presentaban tasas de mortalidad más bajas y una menor incidencia de cáncer y ECV, en comparación con la de otros países europeos, Estados

Unidos y Asia (Keys y col., 1986). Tales hallazgos condujeron a un aumento exponencial, a partir de 1999, de artículos científicos originales relacionados con la DietMed (Serra-Majem y col., 2006). La alta adherencia a este patrón de dieta se ha asociado con una reducción en el riesgo de padecer ECV y enfermedades cerebrovasculares, diabetes mellitus, síndrome metabólico, ciertos cánceres y enfermedades neurodegenerativas (Sofi y col., 2013). Asimismo, la asociación entre la adherencia a la DietMed y la reducción de la mortalidad total también se publicó (Trichopoulou y col., 2003; Trichopoulou, 2004), estando, principalmente, los beneficios más impresionantes de esta dieta ligados a una reducción de la morbilidad y mortalidad cardiovascular (Parikh y col., 2005).

Recientemente se ha publicado un estudio que engloba 13 metanálisis de estudios observacionales y 16 metanálisis de ensayos clínicos aleatorizados (n=12,800,000) que investigan la asociación entre la adherencia a la DietMed y 37 acontecimientos. Se confirma un riesgo reducido asociado a la DietMed de mortalidad general, ECV, incidencia general de cáncer, enfermedades neurodegenerativas y diabetes. Sin embargo, la evidencia es débil para sacar conclusiones firmes para la mayoría de los cánceres específicos, así como parámetros inflamatorios y metabólicos. Por otra parte, no existe evidencia respecto al cáncer de vejiga, endometrio y ovario, así como de los niveles de colesterol LDL (Dinu y col., 2018). Se observó acuerdo entre los metanálisis, en cuanto a la significación estadística del efecto y la dirección del mismo, para peso corporal, circunferencia de la cintura, índice de masa corporal, niveles de glucosa, proteína C-reactiva y niveles de colesterol total; Existiendo desacuerdo, en cuanto a magnitud del efecto pero no para la dirección, para niveles de insulina, hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}), triglicéridos, colesterol HDL y presión arterial sistólica y diastólica.

Sin embargo, la mayoría de los anteriormente mencionados estudios fueron observacionales, por lo que no es posible realizar una inferencia causal por una confusión residual por posibles sesgos. Los estudios que aportan mayor grado de evidencia científica son los ensayos clínicos aleatorizados y los metanálisis de los mismos, y en segundo lugar los estudios de cohortes. Por lo tanto, se necesitan ensayos clínicos aleatorizados a gran escala que utilicen patrones dietéticos y evalúen eventos clínicos para proporcionar un alto nivel de evidencia científica. En este sentido, se han realizado muy pocos ensayos aleatorios por la complejidad de dichos estudios. Por un lado, el Lyon Diet Heart Study, un ensayo de prevención secundaria de ECV con 605 participantes, mostró una gran reducción en las tasas de eventos de cardiopatía coronaria (muerte cardíaca y

infarto de miocardio no fatal) con un patrón de dieta tipo mediterráneo. Los pacientes se aleatorizaron a dos grupos, una MedDiet enriquecida con ácido alfa-linolénico (margarina) y una dieta occidental (prudent Western-type diet) (De Lorgeril y col., 1999) y se siguieron durante más de 5 años para registrar los casos de enfermedad coronaria. Por otro lado, el ensayo clínico “Prevención con Dieta Mediterránea” (PREDIMED) constató la protección de la DietMed tradicional frente la ECV incidente en individuos con alto riesgo cardiovascular, en prevención primaria (Estruch y col., 2018). El Estudio PREDIMED es un ensayo de intervención dietética, multicéntrico, a gran escala, aleatorizado y controlado; Se reclutaron 7447 participantes de alto riesgo cardiovascular pero sin ECV previa, en 11 centros de toda España y se siguieron aproximadamente durante 5 años. Los voluntarios se aleatorizaron en un diseño paralelo a 3 grupos: dos con DietMed tradicional, uno suplementado con frutos secos y otro con AO virgen extra y un grupo control que seguía una dieta baja en grasa. Las conclusiones fueron que una intervención con DietMed tradicional suplementada con AO virgen extra y frutos secos reduce en un 30% la incidencia de complicaciones cardiovasculares mayores (muerte de causa cardiovascular, infarto de miocardio y accidente vascular cerebral). Este estudio demostró, con evidencia científica de primer orden, la eficacia de la DietMed tradicional en la prevención primaria de la ECV en personas de edad avanzada. Ello puso en evidencia que nunca es tarde para mejorar nuestro patrón dietético. Además, el estudio PREDIMED también ha proporcionado evidencia de la eficacia de la DietMed tradicional en la prevención primaria del accidente cerebrovascular (Estruch y col., 2018), fibrilación auricular (Martínez-González y col., 2014), diabetes mellitus tipo 2 (DM2) (Salas-Salvadó y col., 2011) y enfermedad vascular periférica (Ruiz-Canela y col., 2014).

Varios autores han sugerido que la DietMed no solo es adecuada para la prevención de la diabetes tipo 2 sino que también es un patrón dietético apropiado para su manejo clínico (Esposito y col., 2015; Panagiotakos y col., 2007; Salas-Salvadó y col., 2014; Schwingshackl y col., 2015). Un metanálisis de estudios de cohorte para evaluar la asociación entre diferentes dietas y la prevención de la DM2, observó que aunque las dietas asociadas con la prevención de la diabetes pueden variar en su composición, aunque presentaban varios alimentos en común, incluidos alimentos de grano entero, frutas, verduras, frutos secos, legumbres, fuentes de proteínas como carnes blancas y mariscos, poco o moderado alcohol y consumo reducido de carnes rojas y procesadas y bebidas azucaradas, asimismo destacaba los aceites de mesa saludables (como el AO)

(Esposito y col., 2014). En este sentido, el patrón de DietMed encajaría con las características anteriormente mencionadas.

Queda por determinar si el contexto de un estilo de vida saludable global en el que además de promover un patrón de dieta saludable se promueva la práctica regular de actividad física, aporta beneficios adicionales para la salud cardiovascular. En la actualidad, se está llevando a cabo el Estudio PREDIMEDplus, un ensayo clínico aleatorizado, controlado y paralelo en sujetos con alto riesgo cardiovascular con dos grupos de intervención: un grupo con DietMed y un grupo con una intervención intensiva sobre el estilo de vida.

6.4 Beneficios del aceite de oliva y la dieta mediterránea sobre la aterogenicidad de la LDL

Los beneficios para la salud de consumir AO se conocen desde la antigüedad y se atribuyeron tradicionalmente a su alto contenido de AGMI, principalmente ácido oleico. En este sentido, un metanálisis reciente de 32 estudios de cohortes con el objetivo de estudiar el efecto de AGMI (de origen vegetal y animal), ácido oleico, ratio AGMI/AGS y el consumo de AO, indicó que, al comparar el tercil más alto con el inferior, el AO, pero no el AGMI, se asoció con un riesgo reducido de mortalidad por todas las causas, eventos de ECV y accidente cerebrovascular (Schwingshackl y Hoffmann, 2014). Por lo tanto, los constituyentes adicionales de AO también pueden tener un potencial protector (Weinbrenner y col., 2004; Covas y col., 2006 a, b).

En relación al perfil lipídico, es conocido que el reemplazo de grasa saturada (AGS) por no saturada, reduce el colesterol de LDL y aumenta el colesterol de HDL (Harland, 2012). Schwingshackl y col., (2013) publicaron un metaanálisis que incluía 32 estudios con pacientes con sobrepeso y obesos y observó una disminución del colesterol total y LDL después de dietas bajas en grasa. Por otro lado, un aumento en el colesterol HDL y una reducción en los triglicéridos fueron más pronunciados después de una dieta alta en grasas (Schwingshackl y col., 2013). Con respecto al AO, aunque varios ensayos clínicos controlados aleatorizados han constatado un aumento de colesterol HDL dependiente de la dosis de compuestos fenólicos del AO administrado (Covas y col., 2006b; Marrugat y col., 2004; Weinbrenner y col., 2004), en un metanálisis de 8 estudios sobre los efectos del AO virgen extra sobre los factores de riesgo cardiovascular, no se observaron efectos

sobre el perfil lipídico (Hohmann y col., 2015). La EFSA, en base a la evidencia disponible concluyó en el 2012 que las pruebas no eran suficientes para establecer una relación de causa-efecto entre el consumo de aceite de oliva y los niveles de colesterol HDL (EFSA Panel on Dietetic Products, 2012).

El componente mayoritario del AO es el AGMI, siendo los componentes menores un 1-2% del contenido total. Dichos compuestos menores se clasifican en dos grupos: 1) los insaponificables: escualeno y otros triterpenos, esteroides, tocoferol, carotenoides y pigmentos, y 2) la fracción soluble que incluye los compuestos fenólicos. En noviembre del 2004, la Administración Federal de Medicamentos de EEUU (FDA) autorizó una alegación en las etiquetas de AO con respecto a los beneficios sobre el riesgo de la enfermedad coronaria al tomar 2 cucharadas soperas (23 gramos) de AO diariamente y ello fue atribuido a la grasa monoinsaturada. Entonces, si el efecto del AO sólo se debe al contenido de AGMI, cualquier aceite o alimento rico en AGMI (como el aceite de colza, el aceite de canola o grasa enriquecidas con AGMI) podría proporcionar los mismos beneficios para la salud.

En este contexto se inició el estudio europeo, el Estudio EUROLIVE, un ensayo clínico, aleatorizado, con diseño cruzado y controlado, con el objetivo de establecer el efecto de 3 tipos de AO, con composición similar pero con diferencias en su contenido fenólico, sobre el perfil lipídico y estado oxidativo/antioxidante en voluntarios sanos (Covas y col., 2006b). En el Estudio EUROLIVE, con 200 participantes sanos, se les administró 25 ml/día de 3 tipos de AO en crudo: a/ con alto contenido en compuestos fenólicos (366 mg/kg); b/ contenido medio (164 mg/kg); c/ y bajo contenido de compuestos fenólicos (3 mg/kg). Los períodos de intervención tuvieron una duración de 3 semanas, en las cuales los voluntarios tuvieron que ingerir 25 ml por día de AO crudo y se realizó un período de lavado de 2 semanas antes de cada intervención con AO. La conclusión del estudio fue que el consumo de todos los AO incrementó la concentración de colesterol HDL y disminuyeron los triglicéridos y parámetros de oxidación de ADN. Además, Covas y col., (2006b) observaron una disminución del daño oxidativo de lípidos *in vivo* (reflejado concretamente en los marcadores de LDL oxidada, dienos conjugados no inducidos y ácidos grasos hidroxilados) de manera lineal con el contenido fenólico de AO administrado. Por último, también el incremento del colesterol HDL se observó en relación directa con el contenido de compuestos fenólicos del AO consumido. Además, las concentraciones séricas de apoproteína B100 y el número de partículas de LDL totales

y pequeñas disminuyeron después de la intervención con AO virgen versus la intervención con el AO control pobre en compuestos fenólicos (Hernández y col., 2015). Como posibles mecanismos para explicar este beneficio, podríamos considerar un aumento en el contenido de vitamina E y compuestos fenólicos de AE en las LDL que pueden contrarrestar las modificaciones oxidativas locales (Gimeno y col., 2002, 2007). Por otra parte, el efecto reductor de los compuestos fenólicos sobre las LDL oxidadas podría deberse a la generación de anticuerpos (Castañer y col., 2011).

A este respecto, la EFSA, basándose en los resultados principales del Estudio EUROLIVE entre otros trabajos, emitió una alegación de salud en el 2011 en relación a la protección conferida por los compuestos fenólicos del AO sobre la oxidación de las LDL (EFSA Panel on Dietetic Products, 2011). El panel de expertos consideró que para conseguir los efectos de la alegación, se deben tomar diariamente 5 mg de hidroxitirosol/día mediante el consumo de AO, y que estas cantidades son fácilmente asumidas mediante el consumo moderado de AO virgen en el contexto de una dieta equilibrada. En concordancia, en un estudio de metanálisis en el 2015, se relacionó una disminución de niveles de LDL oxidada con el consumo de AO con un alto contenido fenólico (Hohmann y col., 2015). Asimismo, y en el contexto de una DietMed, se observó una disminución de los niveles circulantes de LDL oxidada después de una intervención de 3 meses (Fitó y col., 2007) y de 1 año, en pacientes de alto riesgo cardiovascular (Fitó y col., 2014).

Las modificaciones oxidativas de la partícula LDL, a parte de la concentración de colesterol transportado por las partículas de LDL, pueden desempeñar un papel clave en el inicio y avance de la aterosclerosis y por consiguiente en la ECV, tanto en población general (Holvoet y col., 2001; Gómez y col., 2009; Meisinger y col., 2005) como en pacientes con enfermedad coronaria ya establecida (Fraley y col. 2009).

6.5 Beneficios del aceite de oliva y la dieta mediterránea sobre la funcionalidad de la HDL

Aunque los niveles bajos de colesterol de lipoproteína de alta densidad (HDL) se consideran un factor de riesgo cardiovascular independiente (Castelli y col., 1986), presentar niveles altos de colesterol HDL no siempre confieren una disminución del

riesgo cardiovascular (Barter y col., 2007; Keene y col., 2014; Voight y col., 2012). En este sentido, se ha demostrado que la funcionalidad de HDL puede tener también un papel relevante en el riesgo cardiovascular (Rosenson y col., 2016). Es conocido que niveles reducidos de la función o calidad de la HDL están relacionados con una alta incidencia de aterosclerosis subclínica (Khera y col., 2011) y eventos coronarios (Rohatgi y col., 2014).

Las lipoproteínas son un tipo de micelas en las que los lípidos circulantes polares (colesterol libre y fosfolípidos) se encuentran en una superficie hidrófila y los lípidos apolares (triglicéridos y colesterol esterificado) se sitúan en el núcleo hidrófobo. La partícula de HDL, y a diferencia de la LDL que sólo presenta en su superficie la apoproteína B100, puede presentar varios tipos de apoproteínas, siendo mayoritaria la apoproteína A1. La propiedad funcional más característica de la HDL es la promoción del eflujo de colesterol desde macrófagos, y células periféricas, siendo el primer paso del denominado "transporte inverso de colesterol" (Rosenson y col., 2012). Además, las HDL desempeñan un papel crucial en la inhibición de la oxidación de lípidos plasmáticos (principalmente, de las LDL) y también destacan propiedades antiinflamatorias y vasoprotectoras (Besler y col., 2012). Las modificaciones oxidativas de las partículas de HDL pueden afectar los lípidos y/o proteínas de la misma y consecuentemente alterar sus propiedades fisiológicas (Besler y col., 2012; Norata y col., 2006; Rosenson y col., 2016; Shao, 2012).

Hernández y col. (2014) publicaron, por primera vez, un aumento del eflujo de colesterol de macrófagos humanos THP-1 promovido por HDL *ex vivo*, después de la ingesta diaria de 25 ml de AO virgen (366 mg/kg) en voluntarios sanos en el marco del Estudio EUROLIVE. Paralelamente, se observó un aumento de los metabolitos de compuestos fenólicos del AO virgen-extra unidos a las HDL (sulfato de hidroxitirosol, sulfato y glucuronato del ácido homovanílico). La mejora de la fluidez de la monocapa de la HDL y un núcleo más pobre en triglicéridos también puede explicar que la partícula de HDL sea más funcional (Hernández y col., 2014). En este sentido, un AO funcional complementado con compuestos fenólicos de oliva y tomillo, versus una intervención con un AO virgen con un contenido bajo en compuestos fenólicos, produjo: 1/ una preservación del contenido de vitamina E, antioxidante principal de la lipoproteína de la partícula de HDL (Farràs y col., 2018); y 2/ un aumento en la concentración de la lecitina-colesterol acil-transferasa que esterifica el colesterol libre y produce su incorporación al

núcleo de la partícula, dentro del ciclo natural de las HDL (Farràs y col., 2015). Por otro parte, a parte de un posible efecto directo antioxidante de los compuestos fenólicos del AO en las partículas de HDL, estos compuestos pueden modular la expresión génica relacionada con la función de la HDL (Farràs y col., 2013). En concordancia con los efectos promovidos por el AO virgen sobre la calidad de la HDL, una intervención con DietMed durante un año aumentó la capacidad de eflujo de colesterol y, en particular, la DietMed suplementada en AO virgen-extra estimuló la síntesis de óxido nítrico por células endoteliales promovida por la HDL, disminuyó la actividad de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol y aumentó la capacidad de la HDL de esterificar colesterol y la actividad arilesterasa de la paraoxonasa-1 (Hernández y col., 2017).

6.6 Conclusiones

Como conclusión, destacar que la dieta mediterránea es útil para la prevención de enfermedades degenerativas crónicas, especialmente en el caso de las cardiovasculares. Se debe considerar el tipo de aceite de oliva cuando se realizan recomendaciones nutricionales a la población, ya que se pueden conferir beneficios adicionales, cuando el contenido en compuestos fenólicos del aceite de oliva es alto, sobre el estado funcional de las lipoproteínas HDL y particularmente sobre la oxidación de las LDL.

Conviene resaltar la importancia de las interacciones y sinergias entre nutrientes y alimentos, en el contexto global de una dieta y establecer en qué sujetos y en qué condiciones se podrían obtener especialmente efectos beneficiosos. Asimismo, queda pendiente determinar en ensayos clínicos aleatorizados a gran escala los beneficios de una dieta cardiosaludable en el contexto global de un estilo de vida saludable en que se consideren también las recomendaciones de actividad física.

Agradecimientos

Instituto de Salud Carlos III (CB06/03/0028, CD17/00122, CES12/025, JR17/00022, and PI15/00047), Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (2017 SGR 222, 2015 FI_B 01042, 2017 BP 00021), Fundació La Marató de TV3 (201512.31). CIBERobn es una iniciativa del ISCIII.

Referencias bibliográficas

- Aravanis, C., Corcondilas, A., Dontas, A.S., Lekos, D., Keys, A. (1970) Coronary heart disease in seven countries. IX. The Greek islands of Crete and Corfu. *Circulation*, 41, 188–100.
- Barter, P.J., Caulfield, M., Eriksson, M., Grundy, S.M., Kastelein, J.J.P., Komajda, M., Lopez-Sendon, J., Mosca, L., Tardif, J.C., Waters, D.D., Shear, C.L., Revkin, J.H., Buhr, K.A., Fisher, M.R., Tall, A.R., and Brewer, B. (2007) Effects of torcetrapib in patients at high risk for coronary events. *The New England Journal of Medicine*, 357, 2109–22.
- Besler, C., Lüscher, T.F., Landmesser, U. (2012). Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease. *EMBO Mol Med* 4:251–68.
- Castañer, O., Fitó, M., López-Sabater, M.C., Poulsen, H.E., Nyssönen, K., Schröder, H., Salonen, J.T., De la Torre-Carbot, K., Zunft, H.F., De la Torre, R., Bäuml, H., Gaddi, A.V., Saez, G.T., Tomás, M., Covas, M.I., EUROLIVE Study Group. (2011) The effect of olive oil polyphenols on antibodies against oxidized LDL. A randomized clinical trial. *Clinical Nutrition*, 30, 490–3.
- Castelli, W.P., Garrison, R.J., Wilson, P.W., Abbott, R.D., Kalousdian, S., and Kannel, W.B. (1986) Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA*, 256, 2835–8.
- Covas, M.I., de la Torre, K., Farré-Albaladejo, M., Kaikkonen, J., Fitó, M., López-Sabater, C., Pujadas-Bastardes, M.A., Joglar, J., Weinbrenner, T., Lamuela-Raventós, R.M., de la Torre, R. (2006). Postprandial LDL phenolic content and LDL oxidation are modulated by olive oil phenolic compounds in humans. *Free Radical Biology and Medicine*, 40, 608–16.
- Covas, M.I., Nyssönen, K., Poulsen, H.E., Kaikkonen, J., Zunft, H.F., Kiesewetter, H., Gaddi, A., de la Torre, R., Mursu, J., Bäuml, H., Nascetti, S., Salonen, J.T., Fitó, M., Virtanen, J., Marrugat, J. (2006). The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. *Annals of Internal Medicine*, 145, 333–41.

- Dégano, I. R., Elosua, R., Marrugat, J. (2013). Epidemiología del síndrome coronario agudo en España: estimación del número de casos y la tendencia de 2005 a 2049. *Revista Española de Cardiología*, 66, 472-481.
- De Lorgeril, M., Salen, P., Martin, J.L., Monjaud, I., Delaye, J., Mamelle, N. (1999) Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation*, 99, 779-85.
- Dinu, M., Pagliai, G., Casini, A., Sofi, F. (2018) Mediterranean diet and multiple health outcomes: an umbrella review of meta-analyses of observational studies and randomised trials. *European Journal of Clinical Nutrition*, 72, 30-43.
- EFSA Panel on Dietetic Products N and A (NDA) (2011). Scientific opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive oil and protection of LDL particles from oxidative damage. *EFSA J* 20119.
- EFSA Panel on Dietetic Products N and A (NDA) (2012) Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to polyphenols in olive and maintenance of normal blood HDL cholesterol concentrations (ID 1639, further assessment) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J* 10:2848.
- Esposito, K., Chiodini, P., Maiorino, M.I., Bellastella, G., Panagiotakos, D., Giugliano, D. (2014). Which diet for prevention of type 2 diabetes? A meta-analysis of prospective studies. *Endocrine*, 47, 107-16.
- Esposito, K., Maiorino, M.I., Bellastella, G., Chiodini, P., Panagiotakos, D., Giugliano, D. (2015). A journey into a Mediterranean diet and type 2 diabetes: A systematic review with meta-analyses. *BMJ Open*, 5, e008222.
- Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M.I., Corella, D., Arós F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventos, R.M., Serra-Majem, L., Pintó, X., Basora, J., Muñoz, M.A., Sorlí, J.V., Martínez, J.A., Fitó, M., Gea, A., Hernán, M.A., Martínez-González, M.A. (2018). Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet Supplemented with Extra-Virgin Olive Oil or Nuts. *The New England Journal of Medicine*, 378, e34.

- Farràs, M., Valls, R.M., Fernández-Castillejo, S., Giralt, M., Solà, R., Subirana, I., Motilva, M.J., Konstantinidou, V., Covas, M.I., Fitó, M. (2013). Olive oil polyphenols enhance the expression of cholesterol efflux related genes in vivo in humans. A randomized controlled trial. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 24, 1334–9.
- Farràs, M., Castañer, O., Martín-Peláez, S., Hernáez, Á., Schröder, H., Subirana, I., Muñoz-Aguayo, D., Gaixas, S., de la Torre, R., Farré, M., Rubió, L., Díaz, Ó., Fernández-Castillejo, S., Solà, R., Motilva, M.J., Fitó, M. (2015). Complementary phenol-enriched olive oil improves HDL characteristics in hypercholesterolemic subjects. A randomized, double-blind, crossover, controlled trial. The VOHF study. *Molecular Nutrition and Food Research*, 59, 1758–1770.
- Farràs, M., Fernández-Castillejo, S., Rubió, L., Arranz, S., Catalán, Ú., Subirana, I., Romero, M.P., Castañer, O., Pedret, A., Blanchart, G., Muñoz-Aguayo, D., Schröder, H., Covas, M.I., de la Torre, R., Motilva, M., Solà, R., Fitó, M. (2018). Phenol-enriched olive oils improve HDL antioxidant content in hypercholesterolemic subjects. A randomized, double-blind, cross-over, controlled trial. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 51, 99-104.
- Féart, C., Samieri, C., Rondeau, V., Amieva, H., Portet, F., Dartigues, J.F., Scarmeas, N., Barberger-Gateau, P. (2009) Adherence to a Mediterranean diet, cognitive decline, and risk of dementia. *JAMA*, 302, 638–48.
- Fitó, M., Guxens, M., Corella, D., Sáez, G., Estruch, R., de la Torre, R., Francés, F., Cabezas, C., López-Sabater, M^a del C., Marrugat J., García-Arellano A., Arós F., Ruiz-Gutierrez, V., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Fiol, M., Solá, R., Covas, M.I. (2007). Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. *Archives of Internal Medicine*, 167, 1195-203.
- Fitó, M., Estruch, R., Salas-Salvadó, J., Martínez-Gonzalez, M.A., Arós, F., Vila, J., Corella, D., Díaz, O., Sáez, G., de la Torre, R., Mitjavila, M.T., Muñoz, M.A., Lamuela-Raventós, R.M., Ruiz-Gutierrez, V., Fiol, M., Gómez-Gracia, E., Lapetra, J., Ros, E., Serra-Majem, L., Covas, M.I. (2014). Effect of the Mediterranean diet on heart failure biomarkers: a randomized sample from the PREDIMED trial. *European Journal of Heart Failure*, 16, 543-50.

- Fraleay, A.E., Schwartz, G.G., Olsson, A.G., Kinlay, S., Szarek, M., Rifai, N., Libby, P., Ganz, P., Witztum, J.L., Tsimikas, S. (2009). Relationship of oxidized phospholipids and biomarkers of oxidized low-density lipoprotein with cardiovascular risk factors, inflammatory biomarkers, and effect of statin therapy in patients with acute coronary syndromes: Results from the MIRACL (Myocardial Ischemia Reduction With Aggressive Cholesterol Lowering) trial. *Journal of the American College of Cardiology*, 53, 2186-96.
- Gimeno, E., Fitó, M., Lamuela-Raventós, R.M., Castellote, A.I., Covas, M., Farré, M., de la Torre-Boronat, M.C., López-Sabater, M.C. (2002). Effect of ingestion of virgin olive oil on human low-density lipoprotein composition. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56, 114–20.
- Gimeno, E., de la Torre-Carbot, K., Lamuela-Raventós, R.M., Castellote, A.I., Fitó, M., de la Torre, R., Covas, M.I., López-Sabater, M.C. (2007). Changes in the phenolic content of low density lipoprotein after olive oil consumption in men. A randomized crossover controlled trial. *British Journal of Nutrition*, 98, 1243–50.
- Gjonça, A., Bobak, M. (1997). Albanian paradox, another example of protective effect of Mediterranean lifestyle?. *Lancet*, 350, 1815–7.
- Gómez, M., Valle, V., Arós, F., Sanz G., Sala, J., Fiol, M., Bruguera, J., Elosua, R., Molina, L., Martí, H., Covas, M.I., Rodríguez-Llorián, A., Fitó, M., Suárez-Pinilla, M.A., Amezcaga, R., Marrugat, J. (2009). Oxidized LDL, lipoprotein (a) and other emergent risk factors in acute myocardial infarction (FORTIAM study). *Revista Española de Cardiología*, 62, 373-82.
- Harland J.I. (2012). Food combinations for cholesterol lowering. *Nutrition Research Reviews*, 25, 249–66.
- Hernández, Á., Fernández-Castillejo, S., Farràs, M., Catalán, Ú., Subirana, I., Montes, R., Solà, R., Muñoz-Aguayo, D., Gelabert-Gorgues, A., Díaz-Gil, Ó., Nyssönen, K., Zunft, H.J.F., de la Torre, R., Martín-Peláez, S., Pedret, A., Remaley, A.T., Covas, M.I., Fitó, M. (2014). Olive oil polyphenols enhance high-density lipoprotein function in humans: a randomized controlled trial. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34, 2115–9.

- Hernández, Á., Remaley, A.T., Farràs, M., Fernández-Castillejo, S., Subirana, I., Schröder, H., Fernández-Mampel, M., Muñoz-Aguayo, D., Sampson, M., Solà, R., Farré, M., de la Torre, R., López-Sabater, M.C., Nyssönen, K., Zunft, H.J.F., Covas, M.I., Fitó, M. (2015). Olive Oil Polyphenols Decrease LDL Concentrations and LDL Atherogenicity in Men in a Randomized Controlled Trial. *Journal of Nutrition*, 145, 1692–7.
- Hernández, Á., Castañer, O., Elosua, R., Pintó, X., Estruch, R., Salas-Salvadó, J., Corella, D., Arós, F., Serra-Majem, L., Fiol, M., Ortega-Calvo, M., Ros, E., Martínez-González, M.Á., de la Torre, R., López-Sabater, M.C., Fitó, M. (2017). Mediterranean Diet Improves High-Density Lipoprotein Function in High-Cardiovascular-Risk Individuals: A Randomized Controlled Trial. *Circulation*, 135, 633–643.
- Hohmann, C.D.D., Cramer, H., Michalsen, A., Kessler, C., Steckhan, N., Choi, K., Dobos, G. (2015). Effects of high phenolic olive oil on cardiovascular risk factors: A systematic review and meta-analysis. *Phytomedicine*, 22, 631–640.
- Holvoet, P., Mertens, A., Verhamme, P., Bogaerts, K., Beyens, G., Verhaeghe, R., Collen, D., Muls, E., and Van de Werf, F. (2001). Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 21, 844–8.
- Hooper, L., Martin, N., Abdelhamid, A., Davey Smith, G. (2015). Reduction in saturated fat intake for cardiovascular disease. *Cochrane database Syst Rev* CD011737.
- Keene, D., Price, C., Shun-Shin, M.J., Francis, D.P. (2014). Effect on cardiovascular risk of high density lipoprotein targeted drug treatments niacin, fibrates, and CETP inhibitors: meta-analysis of randomised controlled trials including 117,411 patients. *BMJ*, 349, g4379.
- Khera, A.V., Cuchel, M., de la Llera-Moya, M., Rodrigues, A., Burke, M.F., Jafri, K., French, B.C., Phillips, J.A., Mucksavage, M.L., Wilensky, R.L., Mohler, E.R., Rothblat, G.H., Rader, D.J. (2011). Cholesterol efflux capacity, high-density lipoprotein function, and atherosclerosis. *The New England Journal of Medicine*, 364, 127–135.

- Keys, A., Mienotti, A., Karvonen, M.J., Aravanis, C., Blackburn, H., Buzina, R., Djordjevic, B.S., Dontas, A.S., Fidanza, F., Keys, M.H., Kromhout, D., Nedeljkovic, S., Punsar, S., Seccareccia, F., Toshima, H. (1986). The diet and 15-year death rate in the seven countries study, *American Journal of Epidemiology*, Volume 124, Issue 6, December 1986, Pages 903–915,
- Marrugat, J., Covas, M.I., Fitó, M., Schröder, H., Miró-Casas, E., Gimeno, E., López-Sabater, M.C., de la Torre, R., Farré M., SOLOS Investigators. (2004). Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and LDL oxidation--a randomized controlled trial. *European Journal of Nutrition*, 43, 140–7.
- Martínez-González, M.Á., Toledo, E., Arós, F., Fiol, M., Corella, D., Salas-Salvadó, J., Ros, E., Covas, M.I., Fernández-Crehuet, J., Lapetra, J., Muñoz, M.A., Fitó, M., Serra-Majem, L., Pintó, X., Lamuela-Raventós, R.M., Sorlí, J.V., Babio, N., Buil-Cosiales, P., Ruiz-Gutierrez, V., Estruch, R., Alonso, A., PREDIMED Investigators. (2014). Extravirgin olive oil consumption reduces risk of atrial fibrillation: the PREDIMED (Prevención con Dieta Mediterránea) trial. *Circulation*, 130, 18–26.
- Masiá, R., Pena, A., Marrugat, J., Sala, J., Vila, J., Pavesi, M., Covas, M., Aubó, C., Elosua, R. (1998). High prevalence of cardiovascular risk factors in Gerona, Spain, a province with low myocardial infarction incidence. REGICOR Investigators. *Journal of Epidemiology and Community Health*, 52, 707–15.
- McGovern, P.G., Pankow, J.S., Shahar, E., Doliszny, K.M., Folsom, A.R., Blackburn, H., Luepker, R.V. (1996). Recent trends in acute coronary heart disease--mortality, morbidity, medical care, and risk factors. The Minnesota Heart Survey Investigators. *The New England Journal of Medicine*, 334, 884–90.
- Meisinger, C., Baumert, J., Khuseyinova, N., Loewel, H., Koenig, W. (2005). Plasma oxidized low-density lipoprotein, a strong predictor for acute coronary heart disease events in apparently healthy, middle-aged men from the general population. *Circulation*, 112, 651–7.
- Norata, G.D., Pirillo, A., Catapano, A.L. (2006). Modified HDL: biological and pathophysiological consequences. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 16, 371–86.

- Panagiotakos, D.B., Tzima, N., Pitsavos, C., Chrysohoou, C., Zampelas, A., Toussoulis, D. (2007). The association between adherence to the mediterranean diet and fasting indices of glucose homoeostasis: The attica study. *Journal of the American College of Nutrition*, 26, 32–8.
- Parikh, P., McDaniel, M.C., Ashen, M.D., Miller, J.I., Sorrentino, M., Chan, V., Blumenthal, R.S., Sperling, L.S. (2005). Diets and cardiovascular disease: an evidence-based assessment. *Journal of the American College of Cardiology*, 45, 1379–87.
- Renaud, S., de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet*, 339, 1523–6.
- Rohatgi, A., Khera, A., Berry, J.D., Givens, E.G., Ayers, C.R., Wedin, K.E., Neeland, I.J., Yuhanna, I.S., Rader, D.R., de Lemos, J.A., Shaul, P.W. (2014). HDL cholesterol efflux capacity and incident cardiovascular events. *The New England Journal of Medicine*, 371, 2383–2393.
- Rosenson, R.S., Brewer, H.B., Davidson, W.S., Fayad, Z.A., Fuster, V., Goldstein, J., Hellerstein, M., Jiang, X.C., Phillips, M.C., Rader, D.J., Remaley, A.T., Rothblat, G.H., Tall, A.R., Yvan-Charvet, L. (2012). Cholesterol efflux and atheroprotection: advancing the concept of reverse cholesterol transport. *Circulation*, 125, 1905–19.
- Rosenson, R.S., Brewer, H.B., Ansell, B.J., Barter, P., Chapman, M.J., Heinecke, J.W., Kontush, A., Tall, A.R., Webb, N.R. (2016). Dysfunctional HDL and atherosclerotic cardiovascular disease. *Nature Reviews Cardiology*, 13, 48–60.
- Ruiz-Canela, M., Estruch, R., Corella, D., Salas-Salvadó, J., and Martínez-González, M.A. (2014). Association of Mediterranean Diet With Peripheral Artery Disease. *JAMA*, 311, 415.
- Salas-Salvadó, J., Bulló, M., Babio, N., Martínez-González, M.Á., Ibarrola-Jurado, N., Basora, J., Estruch, R., Covas, M.I., Corella, D., Arós, F., Ruiz-Gutiérrez, V., Ros, E., PREDIMED Study Investigators. (2011). Reduction in the incidence of type 2 diabetes with the Mediterranean diet: results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. *Diabetes Care*, 34, 14–9.

- Salas-Salvadó, J., Bulló, M., Estruch, R., Ros, E., Covas, M.I., Ibarrola-Jurado, N. (2014). Prevention of Diabetes With Mediterranean Diets: A subgroup Analysis of Randomized Trial. *Annals of Internal Medicine*, 160, 1–11.
- Schwingshackl, L., Hoffmann, G. (2013). Comparison of effects of long-term low-fat vs high-fat diets on blood lipid levels in overweight or obese patients: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 113, 1640–61.
- Schwingshackl, L., Hoffmann, G. (2014). Monounsaturated fatty acids, olive oil and health status: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Lipids in Health and Disease*, 13, 154.
- Schwingshackl, L., Missbach, B., König, J., Hoffmann, G. (2015). Adherence to a Mediterranean diet and risk of diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Public Health Nutrition*, 18, 1292–9.
- Serra-Majem, L., Roman, B., Estruch, R. (2006). Scientific evidence of interventions using the Mediterranean diet: a systematic review. *Nutrition Reviews*, 64, S27–47.
- Shao, B. (2012). Site-specific oxidation of apolipoprotein A-I impairs cholesterol export by ABCA1, a key cardioprotective function of HDL. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821, 490–501.
- Sofi, F., Macchi, C., Abbate, R., Gensini, G.F., Casini, A. (2013). Mediterranean diet and health. *Biofactors*, 39, 335–42.
- Trichopoulou, A., Lagiou, P. (1997). Worldwide patterns of dietary lipids intake and health implications. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 66, 961S–964S.
- Trichopoulou, A., Costacou, T., Bamia, C., Trichopoulos, D. (2003). Adherence to a Mediterranean diet and survival in a Greek population. *The New England Journal of Medicine*, 348, 2599–608.
- Trichopoulou, A. (2004). Traditional Mediterranean diet and longevity in the elderly: a review. *Public Health Nutrition*, 7, 943–7.

- Tunstall-Pedoe, H., Kuulasmaa, K., Mähönen, M., Tolonen, H., Ruokokoski, E., Amouyel, P. (1999). Contribution of trends in survival and coronar y-event rates to changes in coronary heart disease mortality: 10-year results from 37 WHO MONICA Project populations. *The Lancet*, 353, 1547-1557.
- Urpi-Sarda, M., Casas, R., Chiva-Blanch, G., Romero-Mamani, E.S., Valderas-Martínez, P., Arranz, S., Andres-Lacueva, C., Llorach, R., Medina-Remón, A., Lamuela-Raventos, R.M., Estruch, R. (2012). Virgin olive oil and nuts as key foods of the Mediterranean diet effects on inflammatory biomarkers related to atherosclerosis. *Pharmacological Research*, 65, 577–83.
- Voight, B.F., Peloso, G.M., Orho-Melander, M., Frikke-Schmidt, R., Barbalic, M., Jensen, M.K., Hindy, G., Hólm, H., Ding, E.L., Johnson, T., Schunkert, H., Samani, N.J., Clarke, R., Hopewell, J.C., Thompson, J.F., Li, M., Thorleifsson, G., Newton-Cheh, C., Musunuru, K., Pirruccello, J.P., Saleheen, D., Chen, L., Stewart, A.F.R., Schillert, A., Thorsteinsdottir, U., Thorgeirsson, G., Anand, S., Engert, J.C., Morgan, T., Spertus, J., Stoll, M., Berger, K., Martinelli, N., Girelli, D., McKeown, P.P., Patterson, C.C., Epstein, S.E., Devaney, J., Burnett, M.S., Mooser, V., Ripatti, S., Surakka, I., Nieminen, M.S., Sinisalo, J., Lokki, M.L., Perola, M., Havulinna, A., de Faire, U., Gigante, B., Ingelsson, E., Zeller, T., Wild, P., de Bakker, P.I.W., Klungel, O.H., Maitland-van der Zee, A.H., Peters, B.J.M., de Boer, A., Grobbee, D.E., Kamphuisen, P.W., Deneer, V.H.M., Elbers, C.C., Onland-Moret, N.C., Hofker, M.H., Wijmenga, C., Verschuren, W.M.M., Boer, J.M.A., van der Schouw, Y.T., Rasheed, A., Frossard, P., Demissie, S., Willer, C., Do, R., Ordovas, J.M., Abecasis, G.R., Boehnke, M., Mohlke, K.L., Daly, M.J., Guiducci, C., Burt, N.P., Surti, A., Gonzalez, E., Purcell, S., Gabriel, S., Marrugat, J., Peden, J., Erdmann, J., Diemert, P., Willenborg, C., König, I.R., Fischer, M., Hengstenberg, C., Ziegler, A., Buyschaert, I., Lambrechts, D., Van de Werf, F., Fox, K.A., El Mokhtari, N.E., Rubin, D. (2012). Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: a mendelian randomisation study. *Lancet*, 380, 572–80.
- Weinbrenner, T., Fitó, M., de la Torre, R., Saez, G.T., Rijken, P., Tormos, C., Coolen, S., Albaladejo, M.F., Abanades, S., Schroder, H., Marrugat, J., Covas, M.I. (2004). Olive oils high in phenolic compounds modulate oxidative/antioxidative status in men. *Journal of Nutrition*, 134, 2314–21.



Universidade de Vigo

AAI-Grupo de Investigacións Agroambientais e Agroalimentarias

CTACA: Clúster de Investigación e Transferencia Agroalimentaria do Campus da Auga

Facultade de Ciencias

Vicerreitoría do Campus de Ourense
Campus da Auga

Vicerreitoría de Comunicación e Relacións Institucionais

Entidades financiadoras



Entidades patrocinadoras

